

医学科学研究的特点

- 医学科研的科学性
 - 科学是运用范畴、定理、定律等思维形式反映现实世界各种现象的本质的规律的知识体系。
 - 医学科研方法的科学性。
- 医学科研的实用性
 - 基础理论研究：以问题为导向，实现理论创新
 - 临床技术研究：以需求为导向实现技术创新、集成创新
- 医学科研的人道特点
- 医学科研的发展趋势
 - 整合研究
 - 个体化研究

医学研究的选题原则

- 重要性原则：
 - 选题从国家经济建设和社会发展的需要出发
- 创新性原则：
 - 科学思想，研究方法
- 科学性原则：
 - 符合现代医学科学理论和伦理的
- 可行性原则：
 - 技术方法、客观条件、工作积累、课题组
- 实用性原则
 - 疾病的预防、诊断和治疗；新产品、新药物、新设备；社会效益(提高疾病防治水平、增强人类体质和提高人口素质)；现有技术和产品的新的医学适用范围

选题的来源

- 从招标范围中选题
- 从临床实际中选题
- 从理论研究和学术争论中选题
- 通过文献启发选题
- 从已有课题延伸中选题
- 从改变研究要素组合中选题
- 在学科交叉和移植中选题

科研选题的基本程序

- 提出问题
 - 发现科学问题
- 查阅文献
 - 明确针对这个问题学术界的研究历史和现状
- 建立假说
 - 针对这个问题提出自己的看法
- 确定题目、研究目标和研究内容
 - 明确解决问题的骨干思路
- 撰写开题报告、申报基金资助

课题可行性分析与评估

- 选题范围大小要适当，主攻方向要明确
- 立论论据要充分
- 预期目标和研究内容要明确统一
- 研究方法和技术路线要先进可行
- 要有一定的工作基础

做个多大的课题(面上, 重点, 重大)?

一项肿瘤相关分子的研究

人类健康: 人群的流行病学研究, 询证医学研究



肿瘤: 对全身的影响, 包括对心理的影响



肿瘤细胞/肿瘤微环境细胞



细胞的产生、增殖、凋亡、分化、迁移、侵袭



信号途径: 某个信号途径的意义和**Crosstalk**



个别分子: 某个分子的意义和分子间相互作用

基础医学研究vs临床医学研究

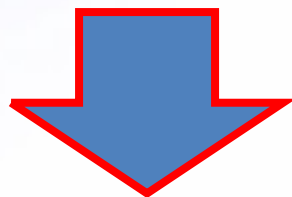
- 基础医学研究：
 - 探讨健康与疾病的共性问题和机制
- 临床医学研究
 - 解决临床问题：工程问题转化为理论问题，从发明的原理、方案可行性、实施后果等方面开闸研究
 - 例如：降低**Survivin**对肿瘤进行基因治疗
 - 原理：Survivin降低能否抑制肿瘤？为什么（肿瘤细胞过表达Survivin吗）？机制是什么？
 - 方案可行性：输送系统？表达方法？靶向措施？实验研究模型？疗效观察指标？
 - 实施后果：体外模型中的效果？实验动物模型中的效果？临床观察中的效果？

申请书内容的构思

- 找到一个问题：立论依据
 - 工作中遇到的问题？
 - 社会公众关心的热点？
 - 读书思考的结果？
- 规划出一个解决问题的逻辑方案：研究内容
 - 现象的确认：形态变化、基因表达的观察，临床研究
 - 机制的解析：细胞、信号途径、分子
 - 假说的验证：转染、KO、临床应用
- 建立了可靠的研究信誉和资质：研究基础和条件
 - 个人背景：前期研究业绩
 - 研究团队

制定写作提纲

拟定题目（反映核心科学问题）



确定研究目标内容
（如何解决核心科学问题？）



设计立论依据
（为什么是核心科学问题？）

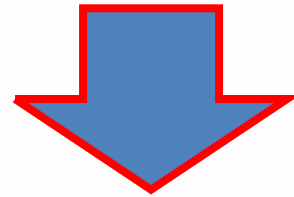


建立基础和团队
（凭什么解决核心科学问题？）

怎么撰写？面上项目

- **（一）立项依据与研究内容：**
 - 1、项目的立项依据
 - 2、项目的研究内容、研究目标,以及拟解决的关键科学问题
 - 3、拟采取的研究方案及可行性分析
 - 4、本项目的特色与创新之处。
 - 5、年度研究计划及预期研究成果
- **（二）研究基础与工作条件**
 - 1、工作基础
 - 2、工作条件
 - 3、申请人简介
 - 4、承担科研项目情况
 - 5、完成自然科学基金项目情况
- **（三）经费申请说明**
- **（四）其他附件清单**

摘要



- xxx是xxx，但是存在xxx问题(科学问题)。
- 文献和我们以往的研究工作表明，xx可能是xx(基本思路)。
- 在此基础上，本课题拟xxx, xxx, xxx(研究内容)。
- 这些研究具有xx理论意义和xxx实际意义(研究意义)。

摘要撰写举例

Notch信号途径通过miRNA调控神经干/祖细胞的增殖和分化

- 在哺乳类神经发育中，神经干细胞（**NSC**）以特定的时空顺序进行增殖、分化和迁移，最终形成具有高级结构和功能的神经系统。大量文献和我们最近发表的研究证明，经典**Notch**途径对**NSC**的增殖和分化发挥关键调控作用，但其下游分子和调控机制尚不完全清楚。我们最近在**Notch**途径关键转录因子**RBP-J**条件性基因剔除小鼠用神经球培养对比了正常和**Notch**信号阻断的**NSC**的**miRNA**表达谱，鉴定出一组在正常和**Notch**缺陷**NSC**中差异表达的**miRNA**，并对其中个别分子在**Notch**信号调控**NSC**中的作用进行了初步探讨。本课题拟在此基础上，深入研究**Notch**信号调控这组候选**miRNA**的分子机制；揭示候选**miRNA**在**NSC**增殖分化中的作用和机制；阐明候选**miRNA**在**Notch**信号途径中的功能意义。这些研究可以拓展对**Notch**信号调控机制的认识，还可以发现神经发育中**NSC**增殖分化调控的新机制，具有重要的理论意义。

(一)立项依据与研究内容(4000-8000字)

立项依据

- 1、研究意义
- 2、国内外研究现状及发展动态分析
- 3、主要参考文献目录

1、研究意义：

- 结合科学研究发展趋势来论述科学意义
- 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应用前景

怎么写研究意义？

放大、修改版的摘要

- (1) 阐述课题针对的**科学问题有什么意义**：从更广泛的层面上对研究意义进行阐述，如某种疾病对公众健康的影响，某一个现象或问题对学科发展的意义，等等
- (2) 通过分析现在存在的问题、自己的前期结果，引伸到自己的研究内容：针对具体科学问题，本课题开展的**研究内容**
- (3) 本课题的研究有什么**科学意义、应用前景**

常见问题

研究意义撰写举例

脊椎动物神经系统的高度有组织的基础是其正常行使功能的基础，而正常有序的发育则是其复杂结构形成的基础。哺乳类的神经干细胞(NSC)是……；组装成神经结构而发挥其功能。正确理解NSC……对……具有重要的意义。

Notch信号途径是神经发育调节的关键信号途径之一。最近，我们……发现(Gao F et al. Mol Cell Neurosci. 2009; 40:442-450); 还发现……(Gao F et al. Unpublished)。然而，这些工作和国际上本领域的相关研究都还未能阐明Notch信号途径是通过哪些下游分子、如何调控神经干细胞的增殖和分化的。

近几年发现的miRNA……参与了NSC的分化。Notch信号途径作为神经系统发育调控的关键信号途径之一，是否可通过调控某些miRNA影响NSC及其下游细胞的增殖分化？针对这一问题，本课题组利用……获得了一组（7个）在RBP-J剔除神经球和对照神经球之间有明显差异表达并可能具有潜在功能的miRNA(见工作基础)。本项目拟在此基础上……深入研究其调控机制，尤其与Notch信号的关系。这些研究：①可以明确参与调控NSC自我更新和分化的新的miRNA，并初步阐明其作用的机制；②就我们掌握的文献，到目前为止还没有报道在哺乳类Notch信号可以通过miRNA调控发育过程，所以本课题有望揭示Notch信号调控中枢神经系统发育的新机制，具有重要意义。

2、国内外研究现状及发展动态分析

研究领域的
基本知识的
介绍

存在问题

针对这个问题，
我们打算做什么？然后围绕我们的思路，逐一进行深入的文献回顾

1. 研究现状；存在问题；我们将……

2. 研究现状；存在问题；我们将……

3. 研究现状；存在问题；我们将……

总之，围绕……，我们打算……，有……意义。

常见问题

- 1、综述不全面、没有很好地阅读、忽略了重要进展（尤其是国内专家）
- 2、逻辑思路不清晰，没有围绕一个中心问题进行综述
- 3、自说自话，只是以自己的前期研究为依据，仅介绍自己知道的
- 4、过多引用未发表的Data
- 5、以未见报道为依据（在其他的肿瘤已有结论，现在换个肿瘤）

国内外研究现状撰写举例

Notch信号途径通过**miRNA**调控神经干/祖细胞的增殖和分化

NSC增殖分化调控的一般知识(存在问题 and 意义)

1、**Notch**信号途径及其对**NSC**增殖分化的调控：

- 1.1 **Notch**信号途径
- 1.2 **Notch**信号对神经分化的调控(存在问题?)

2、**miRNA**对**NSC/INP**增殖分化的调控作用：

- 2.1 **miRNA**在中枢神经系统的表达
- 2.2 **miRNA**对**NSC**分化具有的重要作用(存在问题?)

3、**Notch**途径和**miRNA**的关系(存在问题?)

4、**Summary**(本课题如何解决这些问题，有何意义)

3、主要参考文献：（显示科学态度!）

（显示科学态度、对同行的尊重!）

准确，全部作者，你是第几？通讯？

及时更新

格式规范一致：年、卷、起止页码

与正文对应

国内科学家、中文论文引用

Yao-Chun Wang, Fei He, Xiao-Wei Liu, Guang-Ying Dong, Hong-Yan Qin, Xing-Bin Hu, Fan Feng, Min-Hua Zheng, Liang Liang, Lei Feng, Ying-Min Liang, Hua Han. Notch signaling determines the M1 versus M2 polarization of macrophages in anti-tumor immune responses. Cancer Res. 2010; 70:4840-4849. (封面标题)

研究目标、研究内容和拟解决的关键问题

研究目标的撰写

- ✓明确本课题的总体研究目的和达到的程度，要一目了然。
- ✓用一句话讲出：通过xxx，阐明xxx，为xxx奠定基础。

常见问题

研究目标太大/太小

研究目标与研究内容混淆

研究内容的撰写

围绕着上述研究目标，（1）打算开展几个方面的实验研究？
（2）每个方面都进行哪些实验？

例如对一个新基因的功能研究：

- 1、表达：生物信息学预测，进行表达范围分析（Northern, RT-PCR, 原位杂交）、细胞内定位分析（免疫荧光染色、融合蛋白表达）
- 2、功能：在体外对细胞功能的影响：转染、干扰；增殖、凋亡、分化、迁移、形态变化？体内功能研究：KO？转基因小鼠？病例相关的分析？
- 3、作用机制：转录调控？信号转导？上、下游分子？相互作用蛋白？
- 4、表达调控：启动子结构？表观遗传修饰？翻译后调控？

常见问题

- 层次条理不清楚：针对一个问题需要做哪几个方面的研究？逻辑关系
- 内容简繁不得当：生物信息学、构建质粒；筛选、构建小鼠、转录调控
- 和研究方案混淆：罗列具体的实验步骤

研究目标撰写举例

- 在前期工作已经获得RBP-J基因剔除NSC与正常NSC差异miRNA的基础上，检测这些候选miRNA在小鼠CNS发育过程中的表达特点，在培养的细胞中和小鼠体内分析重要候选miRNA对NSC自我更新、增殖和分化的调控作用，继而进一步深入研究其调控机制，尤其与Notch信号的关系，以期明确miRNA参与介导Notch信号调控NSC自我更新增殖和分化的信号通路、作用机制和意义，为揭示哺乳类中枢神经系统发育的调控机制提供新的实验依据。

研究内容撰写举例

1、候选miRNA在中枢神经系统发育过程中的表达。利用miRNA提取和反转录

系统明确候选miRNA在不同胎龄小鼠的相关脑区的时空表达特征；利用LNA修饰的寡核苷酸探针进行原位杂交（Kloosterman, W.P. et al. 2006, Nat. Methods. 3, 27-29），在体检测候选miRNA在中枢神经系统内的时空表达情况。

2、候选miRNA对NSC增殖分化的调控作用。利用生物合成的miRNA mimics和inhibits分别转染神经细胞系细胞和培养的原代神经球（Sathyan, P. et al. 2007, J. Neurosci. 27, 8546-8557），初步观察候选miRNA对NSC增殖分化等生物学行为的影响；利用病毒感染体系构建含有EGFP的针对候选miRNA的过表达载体，以及反义序列的表达载体，感染原代培养的神经球，观察NSC增殖分化等细胞生物学行为的变化；用胚胎电转染的方法将上述过表达载体和反义载体转染至不同阶段小鼠胚胎的室管膜（下）带，结合NSC增殖分化相关的标记物的免疫荧光染色，用激光共聚焦显微镜观察被转染的NSC的变化。

研究内容撰写举例(续)

3、候选miRNA调控NSC增殖分化的分子机制。首先探讨差异表达的miRNA与Notch信号的关系，研究这些差异miRNA是否是Notch信号途径的下游分子，包括其启动子区的生物信息学分析（RBP-J或Hes家族识别序列的存在与否），以及用体外和体内实验方法证实这些miRNA的表达是否受Notch/RBP-J信号的调控。其次是借助生物信息学方法分析miRNA靶分子，并综合使用Luciferase报告基因实验、基因转染和定量RT-PCR、定位突变等方法分析miRNA对靶分子的调控作用，再根据靶分子的特征进行更加深入的分子机制的研究。

4、体内验证Notch途径和候选miRNA之间的调控关系。对于经过分子水平验证的miRNA，用过表达或是抑制表达的病毒载体来感染RBP-J剔除胚胎小鼠，观察我们前期观察到的NSC增殖分化异常(Gao F, et al. Mol Cell Neurosci. 2009, 40: 442-450)是否能够被挽救，以验证Notch途径和候选miRNA两者在体内的调节关系。

拟解决的关键科学问题的撰写

从以下两个方面论述：

（1） 什么是自己研究的领域的关键科学问题？为什么？

（2） 本研究解决这个问题的逻辑思路是什么？解决这个问题有何意义？

拟解决的关键科学问题撰写举例

本课题拟回答的根本科学问题是**Notch**信号调控**NSC**增殖分化的分子机制问题。文献报道和我们的前期工作得出了**Notch**信号调控**NSC**的一致结论，但进一步的分子机制是有待回答的进一步问题。而**Notch**通路和**miRNA**分子在**NSC**发育过程中都发挥着重要的作用，但是他们之间是否存在**cross-talk**？如果有，各自在调控网络中又分别扮演着什么角色？两者之间是如何相互影响相互调控的？这种相互调控最终对**NSC**的增殖分化又会是怎样的影响？这些调控和调控间的相互作用可能贯穿着神经系统发育的全过程。阐明这些调控因素之间的相互作用，不仅对于我们理解**NSC**发育的基本过程有着重要的意义，而且对于我们将来利用**NSC**进行疾病治疗也具有至关重要的意义。本课题前期通过**miRNA**芯片在**Notch**途径阻断的小鼠中检测到一组发生改变的**miRNA**分子，我们拟在此基础上重点观察**Notch**途径对**miRNA**的调控，以明确这两个在**NSC**发育过程中都十分重要的因素之间的相互作用，以及他们的相互作用对于**NSC**增殖分化的调控。

拟采取的研究方案及可行性分析

医学研究课题设计的原则

- 对照原则：
 - 医学研究主要是通过对比实验组和对照组的差别来回答干预因素的效应，所以完美的对照组设计十分重要
- 重复原则：
 - 医学研究是设计的实验，差别的真实性需要经过统计学检验，所以保质保量的重复实验是发现真理的保证

研究方法、技术路线、实验方案

研究方法：依据观察指标，阐明所用方法，突出实验技术高度和先进性（用xxx观察分析xxx；……）

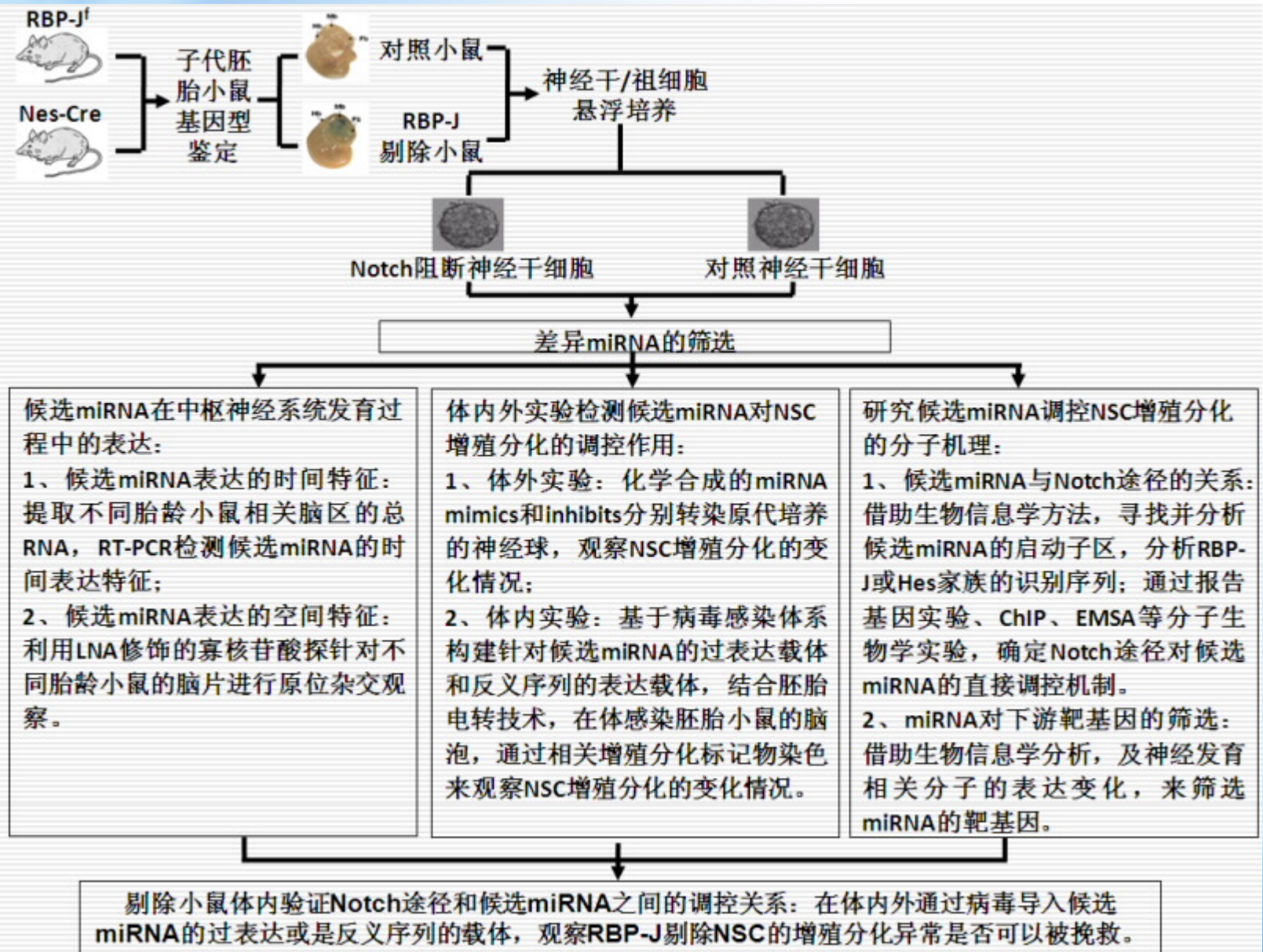
技术路线：用一张图把研究内容及其逻辑关系展示出来

实验方案：结合技术路线，把研究内容里的各项实验具体化（步骤、分组、……对照、重复）

常见问题

- （1）技术路线图太复杂
- （2）研究方案与研究内容不吻合，只是简单地罗列方法和Protocol
- （3）研究方案过于繁琐或过于简单，尤其是过分简单
- （4）方案不完善、出错：该做的实验没有写；用人组织样品杂交小鼠芯片；购买某公司的试剂，而该公司已倒闭；写的是别的课题的方案；……

技术路线举例



可行性分析和关键技术说明

可行性分析：

(1) 理论可行性

(2) 条件可行性

(3) 研究基础可行性、……

关键技术说明：课题可能遇到的技术难点，容易让人怀疑的研究内容和方案，**需要特别说明解决的办法**

什么是关键技术：难以一概而论，需要根据课题和研究条件来定，考研课题负责人是不是懂具体研究

关键技术说明举例

1) **miRNA靶基因的筛选将可能是本课题面临的重要的技术问题。**miRNA的靶分子预测显示动物全部基因中有多于1/3的基因都可能受到miRNA的调控 (Lewis BP et al. 2005, Cell. 120, 15–20)。而且一个miRNA可能抑制多个靶分子mRNA的翻译, 一个mRNA又会受到多个miRNA的调节 (Bartel DP. 2004, Cell. 116, 281–297)。这为候选miRNA靶基因的筛选带来很大的困难。因此, 充分利用生物信息学分析方法, 并结合已知的调节NSC增殖分化的分子信息知识, 在本课题中显得十分重要。

2) **对候选miRNA进行体内的功能研究也将有一定难度。**主要是如何提高特定miRNA在原代培养神经细胞和在体转染的效率。这一点我们拟通过构建病毒载体, 来进行原代培养细胞的转染; 而在体的转染, 我们拟通过构建病毒载体结合胚胎电转染的方法进行。课题组成员郑敏化博士在中国科学院上海神经科学研究所工作期间已经针对本技术接受了专门训练, 并已将此方法成功应用于关于视网膜发育的研究 (Zheng et al. 2009, Mol Brain 2:38)。

项目特色与创新之处的撰写

项目特色：研究过程中的研究思路、目标、内容、方案、关键问题、可行性与现有研究相比有哪些**不一样**（特色）

具有不一样的研究意义？

抓住了不一样的研究问题？

从不一样的角度研究问题？

采用了不一样的实验平台和方法？

创新之处：研究结束后会产生哪些**新知识**（创新）

新理论、新机制、新解释、新功能

新分子、新通路、新靶点、新型相互作用

新方法、新技术、新疗法、新研究平台

项目特色撰写举例

- 本课题组研究Notch信号途径功能的突出特色在于课题组建立的RBP-J条件性基因剔除小鼠平台。由于RBP-J是Notch四种受体的共同下游分子，较之以往Notch1剔除等模型，RBP-J条件性剔除的最大优势在于实现经典Notch信号的条件性完全阻断，全面反映经典Notch信号途径的调控作用。在此基础上获得候选miRNA，在本研究中经过细胞和分子水平的研究后再在RBP-J条件性剔除小鼠上证实其作用，可以最大限度地获得Notch-miRNA相互关系的体内证据，有明显特色。

项目创新点撰写举例

- 本课题在以往工作的基础上提出“**Notch**信号通过**miRNA**调控哺乳类**NSC**增殖分化”，并在前期工作中筛选到一组在**Notch**信号途径关键转录因子**RBP-J**基因剔除后差异表达的**miRNA**。在此基础上进一步阐明其在**NSC**中的作用及其与**Notch**信号的关系。这些研究：①可以明确参与调控**NSC**自我更新和分化的新的**miRNA**，并初步阐明其作用的新机制；②就我们掌握的文献，虽然已知多种**miRNA**可以调控**Notch**信号某些分子的表达，但到目前为止还没有报道在哺乳类**Notch**信号可以通过**miRNA**调控发育过程，所以本课题的研究有望揭示**Notch**信号调控中枢神经系统发育的新机制，具有明显的理论创新性。

年度研究计划和预期结果

年度计划：

合理划分：**四年(起止年月经常出错！)**

研究内容：分散在四年，不能只写题目

国际合作与交流计划

预期结果：

- 1、理论成果：阐明xxx，解决xxx问题
- 2、发表论文
- 3、可能产生的专利
- 4、人才培养

工作基础的撰写

按研究内容的“故事”逻辑归纳，突出重点，避免罗列

相关研究工作积累：

项目相关

已经发表的工作的核心内容

没有发表的实验结果图表：一定要有足够详细的**Legend!**

已取得的研究工作成绩：

1、理论成果：获奖

2、发表论文

3、已经产生的专利

4、人才培养

工作条件的撰写

1、已经具备的实验条件：全校都可写，注意与研究方法吻合

2、尚缺少的实验条件：动物、仪器设备

解决途径：动物购买合同、仪器设备使用协议、合作协议

3、国家重点实验室和部门开放实验室

肿瘤生物学国家重点实验室

教育部XX重点实验室

军队XX重点实验室

申请人简历的撰写

申请人和主要参与者：

(1) 学历和研究工作经历：主要学历和简历，强调与本课题相关的

(2) 论著： Yao-Chun Wang, Fei He, Xiao-Wei Liu, Guang-Ying Dong, Hong-Yan Qin, Xing-Bin Hu, Fan Feng, Min-Hua Zheng, Liang Liang, Lei Feng, Ying-Min Liang, Hua Han. Notch signaling determines the M1 versus M2 polarization of macrophages in anti-tumor immune responses. Cancer Res. 2010; 70:4840-4849. (封面文章)

(3) 奖励： 韩骅，秦鸿雁，王冀姝，杨曦，梁英民，孙强，李军林，李军锋： Notch信号途径对细胞分化的调控及其机理的研究，陕西省科学技术奖一等奖，2006年

课题组： 真实性、职称均衡、合理分工、研究生参与……

承担科研项目情况

完成国家自然科学基金情况：

申请者和项目组主要成员正在承担的科研项目情况，包括自然科学基金的项目，要注明项目的名称和编号、经费来源、起止年月、负责的内容等。

强调与本课题的关系和区别！

评委可以随时查阅！

细节决定成败

未能强调工作基础、思路的创新点、关键技术平台等重要事项

文字失误：错别字、标点符号、英文拼写、参考文献格式

科学问题过分虚幻（比如：修改牛顿定律）

自大，用太多的形容词修饰自己，整个立论依据完全基于自己的工作

夸大研究意义（比如，征服癌症）

参考文献引用不当：少引，没有和正文对照

个人资料及时**update**：比如**2005**年的论文现在仍然在**E-pub**阶段

个人资料不诚实

思路不清晰，研究目标/内容/方案混淆或者错误

综述超长、离题、甚至和自己的研究设想矛盾：**favor/against your idea?**

一开始使评委产生负面印象（摘要失败：论述不清楚、太短或太长、错别字）

重点项目立项的思考

- 核心科学问题（题目与依据）

- 重大学科前沿问题、国家发展重大问题（遵照指南）
- 有足够的普遍性和代表性

- 解

同一方向完成**3项**左右的面上项目后可考虑

- 研究工作基础（基础和团队）

- 前期的创新性发现：
 - 负责人的**5篇**代表作，至少**1篇**发表在学科主流以上的杂志
 - 必须与本课题相关：可以作为本课题的直接工作基础/条件
- 好的研究平台

新生血管形态形成及其分子调控机理的研究

2008年招标方向：形态发育的调控机制

• 血管的形态发生是胚胎和成年个体新生血管网形成的核心步骤，形态完整的血管网不仅是胚胎发育的需要，还参与成年个体创伤修复及组织再生等生理过程，而形态异常的血管结构与肿瘤、糖尿病眼底损害等疾病密切相关。我们发现，在成年小鼠条件性剔除Notch信号途径的关键转录因子RBP-J，可以引起动物广泛而严重的自发新生血管形成，但形成的新生血管不具有正常的血管形态和功能。结合文献报道，这些结果提示Notch信号途径是正常血管形态形成的必需信号。本课题拟在此基础上，深入探讨Notch信号途径在血管形态形成中对血管内皮细胞、血管平滑肌细胞以及内皮祖细胞的调控作用；明确Notch信号途径阻断引起自发新生血管形态形成异常的细胞基础；阐明Notch信号途径调控新生血管形成的分子机理及其与其他信号途径的相互作用。这些研究对于深入了解血管形态形成的分子调控机理，以及在此基础上开发血管靶向药物，具有重要的理论和实际意义。

立论依据

- 血管发育及其调控

- 血管发生
- 血管形成
- 动脉形成

调控机制不完全清楚；
都与**Notch**有关（下文）

- **Notch**与血管发育

- **Notch**信号途径
- **Notch**与血管发育

融入自己的工作

- **Notch**与血管形态形成的关系不明确，机制不清楚

研究目标

研究内容(=3~4个面上的工作量)

- **Notch**信号途径在血管形态形成中对内皮细胞的作用：利用血管内皮细胞特异性可诱导**Cre**转基因小鼠（**Tie2-ERTCre**，见工作基础），与**RBP-J^{floxed}**小鼠交配后，诱导在血管内皮细胞条件性剔除**RBP-J**基因。观察体内自发新生血管形成和创伤、肿瘤等诱导的新生血管形成。通过体内的组织学分析和免疫组织化学染色分析，观察血管内皮细胞在**Notch/RBP-J**信号阻断后的增殖、凋亡、伪足生长、以及动-静脉标志表达等的变化，以全面了解**RBP-J**基因剔除引起的血管内皮细胞的形态和功能变化。通过体外血管内皮细胞培养，分析**RBP-J**剔除后小鼠内皮细胞增殖和凋亡的改变以及细胞周期时相和调控分子的改变；观察血管内皮细胞伪足生长和迁移黏附的改变；通过体外的三维培养分析**RBP-J**基因剔除后小鼠内皮细胞形成血管网的能力的变化。

研究内容(续)

- **Notch信号对血管平滑肌细胞的影响：**利用Mx-Cre转基因小鼠和RBP-J^{flox}小鼠在血管平滑肌中剔除RBP-J以阻断Notch信号途径。在上述新生血管形成模型中观察新生血管形态形成中血管平滑肌细胞的募集和迁移黏附等细胞生物学变化，观察其与血管内皮细胞的相互作用。建立体外血管内皮细胞-血管平滑肌细胞的共培养，然后分别以RBP-J剔除的内皮细胞与野生型平滑肌细胞共培养、或RBP-J剔除的平滑肌细胞与野生型内皮细胞共培养，判断Notch信号途径在内皮细胞-平滑肌细胞相互作用中的意义。
- **Notch信号途径对内皮祖细胞的影响：**利用Mx-Cre转基因小鼠和RBP-J^{flox}小鼠在骨髓中剔除RBP-J以阻断Notch信号途径。用流式细胞仪分析骨髓和外周血中内皮祖细胞的水平的变化。在MxCre-RBP^{flox}小鼠中进一步引入GFP转基因，然后将GFP⁺RBP-J剔除的骨髓细胞移植到正常受体小鼠，观察GFP⁺内皮祖细胞在受体小鼠中的分化以及参与新生血管形态形成的变化。

研究内容(续)

- **Notch信号调节血管形态形成的下游分子**：利用小鼠基因芯片，分析RBP-J剔除的内皮细胞和正常对照内皮细胞之间基因表达的差异，寻找RBP-J调控内皮细胞增殖分化的下游分子；利用Western blot分析培养的内皮细胞中MAPK信号途径和PI-3-K/Akt信号途径主要分子的水平 and 磷酸化水平的改变；利用相应信号途径的特异抑制剂分析其在Notch信号阻断引起的内皮细胞变化中的意义。
- **Notch信号途径调节血管形态形成中与其他信号途径的相互作用**：利用报告基因实验、蛋白质相互作用实验、染色质免疫共沉淀实验等分子生物学方法，重点研究Notch信号途径与VEGFR信号途径、EphrinB2/EphB4信号的相互调控关系及其在新生血管形态形成中的意义。

拟解决的关键问题

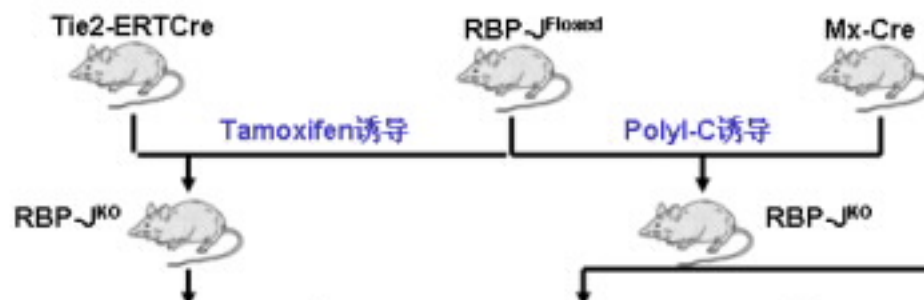
- 拟解决的**关键科学问题**：本项目拟解决的关键科学问题是血管形态形成的分子调控机理。与其他器官的形态形成一样，血管的形态形成受到多个信号途径的多阶段调控。大量的文献和我们的研究结果都提示Notch信号途径在血管形态形成的分子调控网络中可能发挥核心作用，但其作用的细胞和分子机理并不清楚。本课题拟在以往工作的基础上，利用已经建立的条件性基因剔除小鼠模型，结合其他细胞和分子生物学手段进行深入研究，可望以Notch信号途径为核心，阐明血管形态形成的分子调控机理。

关键技术说明

- 形态发育的研究离不开动物模型。既往对**Notch**在哺乳类血管形态发育中的作用的研究主要使用**Notch**信号途径的主要分子的常规基因剔除模型，观察早期胚胎中血管的形态形成缺陷和细胞改变。此外，**Dll4**基因剔除的杂合子小鼠或部分非纯系纯合子小鼠可发育到出生，观察这些小鼠的视网膜血管网也能更好地反映血管网的生长和**EC**的变化。但这些小鼠模型存在不同的缺陷。比如，**Notch**信号的主要分子的基因剔除往往引起早期胚胎死亡，限制了对其形态变化的深入研究尤其是在成体动物研究中的应用；其次，哺乳动物有四种**Notch**受体，分布重叠而且有功能代偿。单纯剔除一种受体或配体难以反映整个信号途径作用的全貌。申请人建立的转录因子**RBP-J**条件性基因剔除小鼠模型可以基本解决这些问题。我们的前期研究证实，利用这一系统可以在成年动物内皮细胞剔除**RBP-J**，同时由于**RBP-J**介导全部四种**Notch**受体的转录激活作用，所以这一系统可以在成年动物内皮细胞中完全阻断**Notch**信号，从而反映出**Notch**信号在小鼠血管形态生成中的作用。
- 利用**Cre-LoxP**系统进行条件性基因剔除，关键是**Cre**转基因小鼠的建立。我们在前期研究中采用了**MxCre**。虽然可以在内皮细胞中进行有效的剔除，但该系统同时可在其他组织如骨髓中表达**Cre**。为了提高在内皮细胞中表达**Cre**的专一性，我们进一步构建了**Tie2-ERTCre**，已经得到**Founder**小鼠。该小鼠可以在**Tamoxifen**诱导后，可以特异地在血管内皮细胞中特异性表达**Cre**，实现组织特异性可诱导剔除。

技术路线

动物模型的建立



体内研究

内皮细胞:

- 1、观察: 视网膜、角膜、肝血窦、脉络膜CNV、肿瘤血管
- 2、方法: 免疫组化、激光共聚焦、超微结构
- 3、内容: 细胞增殖、凋亡、伪足、标志变化

血管平滑肌细胞:

- 1、观察: 视网膜、角膜、肝血窦、脉络膜CNV、肿瘤血管
- 2、方法: 免疫组化、激光共聚焦、超微结构
- 3、内容: 细胞增殖、凋亡、趋化、标志变化

内皮祖细胞:

- 1、流式细胞仪分析
- 2、引进GFP转基因后进行骨髓移植, 进一步进行流式细胞仪和免疫荧光分析
- 3、内皮祖细胞表面标志和参与分化的观察

体外研究

内皮细胞培养: 增殖凋亡的改变; 伪足生长和黏附迁移的改变; 三维培养观察血管网的生成变化

平滑肌细胞培养: 增殖凋亡的改变; 伪足生长和黏附迁移的改变; 与内皮细胞共培养, 观察与内皮细胞的相互作用

分子机理的研究

下游基因的分析: 利用小鼠基因芯片, 分析RBP-J剔除的内皮细胞和正常对照内皮细胞之间基因表达的差异; 利用Western blot分析培养的内皮细胞中MAPK信号途径和PI-3-K/Akt信号途径主要分子的水平 and 磷酸化水平的改变; 利用信号途径抑制剂分析在Notch信号阻断引起的内皮细胞变化中的意义

与其他信号途径的相互作用: 利用报告基因实验、蛋白质相互作用实验、染色质免疫共沉淀实验等分子生物学方法, 重点研究Notch信号途径与VEGFR信号途径、EphrinB2/EphB4信号的相互调控关系及其在新生血管形态形成中的意义

项目的特色

- (1) 由于RBP-J介导四种Notch受体的转录激活活性, 本课题所得结果可以回答Notch在体内对血管形态形成中的作用。本项目利用已经建立的RBP-J条件性基因剔除小鼠研究Notch信号途径在成体血管生成中的作用, 具有可靠的工作基础和前期研究成果。结合深入的分子生物学研究, 可阐明血管形态形成的细胞和分子机理。
- (2) 以往文献中多采用胚胎期血管形成模型(包括新生小鼠的视网膜血管发生)进行关于血管形态的發生的研究。本研究采用成年动物新生血管形态形成作为模型进行研究, 研究成果可能直接具有医学意义。

项目的创新之处

- (1) 虽然有关血管形成中血管形态形成已经进行了大量的研究，但到目前位置参与血管形态形成的信号途径、作用机理和相互作用还没有内完全阐明。本课题组首先在成年个体血管内皮细胞中剔除**RBP-J**，发现血管形成虽然明显增加但血管形态结构和功能异常。本课题在以往工作的基础上，以**Notch-RBP-J**信号途径为核心研究血管形态形成中的信号网络，结合进一步的细胞和分子生物学研究，可以实现在血管形态形成的细胞和分子调控机理研究领域的知识创新。
- (2) 虽然以往的研究认为**Notch**信号途径在血管祖细胞的分化中作用不大，但本课题组的前期研究却提示在成年小鼠**Notch**信号途径有可能调控血管祖细胞的分化。本课题在此基础上对这一现象进行进一步研究和确认，并探讨其分子调控机理。有关研究尚未见报道。
- (3) 以血管为靶向的药物开发是治疗包括肿瘤在内的多种人类疾病的研究方向。本课题的研究将为这类应用研究建立新的平台并奠定进一步研发的理论基础。

研究基础和条件：研究基础

- 申请人近年来主要从事**Notch**信号途径的功能和调控的研究。主要研究成就可概括为以下几个方面：
- （1）首次建立了转录因子**RBP-J**的条件性基因剔除**小鼠**。表型分析表明，**RBP-J**可以介导**Notch**信号途径对淋巴祖细胞、转换**B**细胞、辅助性**T**细胞以及表皮干细胞的分化的调节。（论文5篇）
- （2）筛选**RBP-J**结合蛋白了**KyoT2**的相互作用**分子**，并对**KyoT2**相互作用分子对**RBP-J**的调控作用进行了研究，发现**KyoT2**可以将转录共抑制物**PcG**蛋白募集到**RBP-J**，从而抑制**RBP-J**的转录活性，提示**PcG**蛋白可对**Notch**的转录活性进行表观遗传学“记忆”。利用酵母双杂交系统筛选得到了新**MINT**相互作用蛋白，发现**MINT**可以和多种信号转导分子和转录因子相互作用。（论文7篇）
- （3）研究了**Notch**信号途径分子在肿瘤和**B**细胞分化中的作用。建立了**B**细胞受体转基因小鼠模型，用**基因芯片**对比了外周**B**细胞亚群之间的基因表达差异，鉴定了二者在表面标志和分化调控方面的部分分子。（论文5篇）

研究基础和条件：前期工作

- 利用RBP-J^{floxed}小鼠和Mx-Cre小鼠，得到RBP-J条件性剔除小鼠(RBP^{f/f}-MxCre)，通过注射干扰素诱导剂诱导成年小鼠RBP-J的剔除。分析诱导后的RBP^{floxed}-MxCre小鼠，得到以下发现（具体结果参见Dou GR, Han H, et al. FASEB J. 2008; Epub ahead of print）：
 - 与对照小鼠相比，剔除小鼠有明显的自发新生血管形成。
 - Notch信号可能调控血管祖细胞的增殖和分化。
 - Notch信号可抑制内皮细胞的增殖，并且抑制VEGFR2但促进VEGFR1的表达。
- 克隆了人Notch配体DII1胞外段的N端片断（hDII1），插入原核表达载体，在大肠杆菌中得到高效表达。建立了复性和纯化原核表达的hDII1的方法。用报告基因实验等方法证实纯化得到的hDII1蛋白具有刺激Notch受体的活性（具体结果见Shi ZX, et al, *Protein Expr. Purif.* Accepted.）。
- 发现RBP-J基因剔除可引起肝血窦内皮细胞功能异常，引起肝血窦阻塞综合症，进一步提示Notch-RBP-J信号途径对于血管内皮细胞分化和结构的作用（Wang L, Han H, et al, manuscript in preparation）。
- 构建了Tie2-ERTCre转基因小鼠。按常规方法克隆了小鼠Tie2启动子，在其下游插入ERTCre融合基因，在内皮细胞中证实其受Tamoxifen诱导表达后，经受精卵显微注射引入小鼠基因组。目前已经得到转基因的基因组整合和传递（Feng L, Han H, et al, unpublished）。

血管稳态与重构的调控机制重大研究计划

□科学目标：以解决重大心脑血管疾病具有共性的前沿科学问题为导向，以血管稳态与重构的调控机制的基础研究为中心，利用分子生物学、病理生理学、生物力学、基因组学、系统生物学、分子影像学、化学、材料学、生物信息学等学科交叉手段，阐明血管结构与功能稳态和疾病过程中重构调控的关键信号通路和网络模式。以期揭示以血管功能与结构病理改变为基础的重大疾病的发病机制；寻找疾病早期诊断和疾病转归的预警标志。

□科学问题：血管稳态与重构的调控网络 and 关键节点。

□内容：

□血管稳态调节的信号通路、调控网络及其动态变化规律。

□内外环境因素对血管稳态与重构的调控机制。

摘要

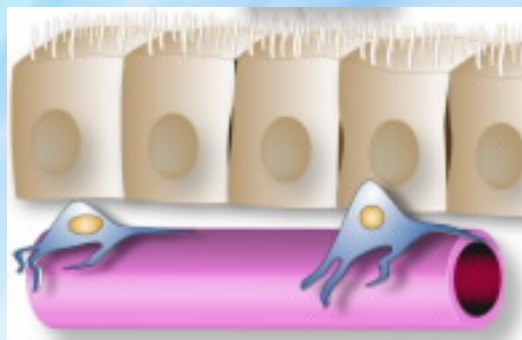
- 肝硬化门脉高压的形成不仅由于纤维堆积造成的循环阻力增加，还由于微血管内皮失稳态和重塑造成的血管功能和结构异常，但其分子机制不清。**Notch**途径调控血管发育。前期研究中我们利用**Notch**下游关键转录因子**RBP-J**条件性剔除小鼠证实**Notch**信号调控全身血管稳态。同时，诱导性阻断**Notch**信号引起小鼠的肝血窦淤塞综合征；进而预实验表明，激活内皮**Notch**信号可使肝血窦变宽，窗孔增多，提示**Notch**信号调控肝内血管内皮稳态和重塑。但门脉高压中**Notch**信号对微血管内皮稳态和重塑有何作用？分子机制如何？对此，本课题拟采用遗传修饰小鼠和门脉高压模型，结合细胞和分子生物学方法，阐明**Notch**信号在肝硬化门脉高压中对血管内皮细胞稳态和重塑的调控作用；揭示其机制；探讨通过**Notch**信号干预门脉高压发生的可能性。这些研究将进一步发现门脉高压中血管内皮功能失稳态和结构重塑的分子机制，为其干预提供新靶点。

国内外研究现状

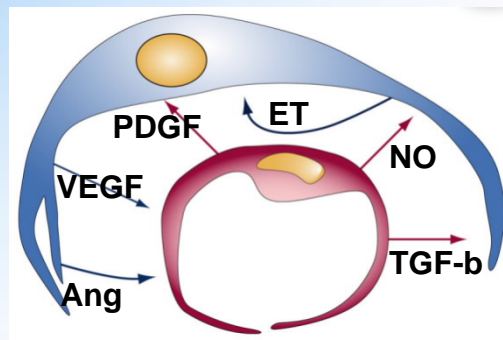
肝硬化门脉高压

- 1、血管内皮细胞失稳态和重塑参与肝硬化门脉高压发生的机制：
 - 1.1 肝硬化门脉高压中内皮细胞失稳态的机制：
 - 1.2 肝硬化门脉高压中的血管重塑：
- 2、Notch信号途径及其对血管发育的调控：
- 3、Notch信号与血管内皮功能和重塑的调控：
- 4、Summary

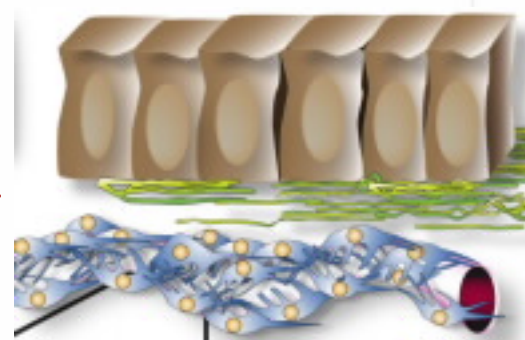
正常肝血窦



内皮失稳态



肝血窦重塑



毒素, 感染, 药物, 低氧, 血流

氧化, 基因表达, TLR

内皮细胞功能失稳态

肝内循环阻力

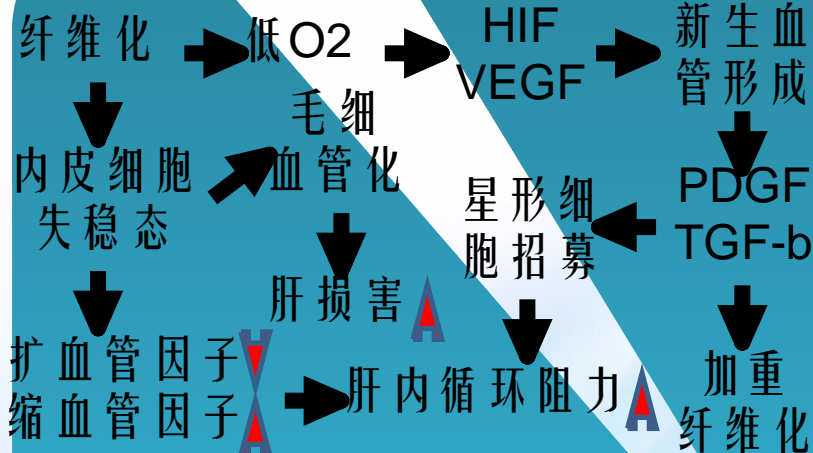
门脉高压

内脏循环和体循环
内皮细胞失稳态

血管
炎症
去
管
孔

肝血供

肝血窦:



内脏循环和体循:

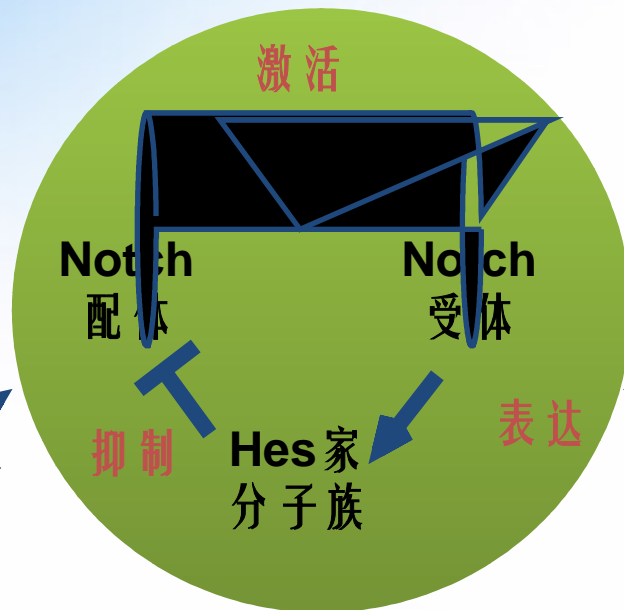


毒素,感染,药物,低氧,血流

氧化应激、基因表达、TLR、细胞因子

信号途径:
MAPK
PI3K/AKT
NF-kB
STATs
.....

上调
调控



血管重塑:

新生血管形成
肝血窦重塑
体循环血管重塑

上调

调控

各自受体的
信号转导通路

VEGF信号;
PDGF信号;
TGF- β 信号

细胞外基质产生;
粘附分子表达
内皮细胞分化
周细胞募集
.....

损伤因素持续存在

内皮细胞失稳态:

血管活性物质异常;
趋化因子异常;
炎症因子异常;
.....

研究目标

✓ 在整体动物、细胞和分子层面上，阐明肝硬化门脉高压中**Notch**信号对血管内皮细胞稳态和重塑的调控作用及其机制，验证通过**Notch**信号干预门脉高压发生的可能性，以期进一步揭示门脉高压中血管内皮功能失稳态和结构重塑的分子机制，为其干预提供新靶点。

研究内容

1. **Notch**信号在肝硬化门脉高压发生中的作用。（1）在正常小鼠建立门脉高压模型，分离血窦内皮细胞，用定量**RT-PCR**观察**Notch**配体、受体和下游分子的表达变化；（2）在成年小鼠血管内皮特异性敲除或激活**Notch**信号，通过组织学检测和门脉压测定，观察对肝硬化门脉高压发生的影响；（3）收集临床肝硬化门脉高压患者肝组织标本**30**例和正常对照肝组织**30**例，用免疫荧光染色判断**Notch**信号的激活状态。

2. 肝硬化门脉高压中**Notch**信号对血管内皮细胞功能稳态和重塑的调控作用。（1）对内皮细胞功能的影响；（2）对肝血窦内皮细胞毛细血管化的作用；（3）对内皮细胞与星形细胞作用的影响；（4）对内皮细胞基因表达标记(**gene expression signature**)的影响。

研究内容（续）

3.肝硬化门脉高压中**Notch**信号调控内皮细胞功能和重塑的分子机制。

（1）对血管保护和损伤因子的表达的调控机制；（2）调控内皮细胞**ECM**产生的分子机制；（3）调控星形细胞招募和功能的分子机制。

4.干预**Notch**信号对肝硬化门脉高压的治疗作用研究。在正常小鼠建立门脉高压模型，在不同时间点注射内皮特异性**Notch**信号激活蛋白**mD1R**，观察（1）肝血窦内皮细胞中**Notch**信号的激活；（2）对门脉压和肝硬化的影响；（3）对内皮细胞功能和重塑的影响；（4）对内皮细胞基因表达标记的影响。

关键科学问题

✓本课题拟解决的大的科学问题就是肝硬化门脉高压中血管内皮细胞功能异常和结构重塑的分子机制。

✓本课题拟解决的具体科学问题就是肝硬化门脉高压中**Notch**信号对血管内皮细胞稳态和重塑的调控作用及其机制，以及可否通过**Notch**信号干预门脉高压。

Notch 阻断

对照

Notch 激活



内皮细胞特异性RBP-J遗传修饰小鼠

肝硬化门脉高压小鼠模型建立

门脉压的检测；组织学检测

分离不同小鼠的肝血窦内皮细胞和肝星形细胞

①内皮细胞功能检测：

②内皮细胞重塑检测：

③内皮细胞对星形细胞影响：

④内皮细胞基因表达标记检测

①对血管保护和损伤因子的表达的调控机制；

②调控内皮细胞ECM产生的分子机制；

③调控星形细胞募集和功能的分子机制

肝硬化门脉高压患者肝血窦内皮细胞
肝硬化门脉高压小鼠肝血窦内皮细胞

WB、RT-PCR检测Notch相关基因表达

原核表达、纯化内皮细胞靶向可溶性Notch配体（已完成）

野生型小鼠建肝硬化门脉高压模型

腹腔注射可溶性Notch配体

肝硬化门脉高压的变化；内皮细胞功能和重塑的变化；基因表达标记的变化。

特色与创新

- 肝血窦研究的特色
- 以 **Notch** 为切入点
- 以 **RBP-J** 敲除为基本平台

特色与创新

- 本课题采用已经完善的Notch信号途径关键转录因子RBP-J的失去功能和Notch获得功能遗传修饰小鼠和小鼠门脉高压模型，结合细胞和分子生物学方法，探讨Notch信号在肝硬化门脉高压中对微血管内皮细胞稳态和重塑的调控作用，有望揭示肝硬化门脉高压发生和发展的新的分子作用机制。
- 肝硬化门脉高压中血管内皮细胞功能失稳态和结构重塑涉及多种活性分子和信号途径，如NO、ROS、炎症因子和其他细胞因子及其下游信号、TLR及其下游信号等，但肝硬化门脉高压中血管内皮细胞功能失稳态和结构重塑的分子机制尚未完全明确，限制了相应药物靶点的发现和治疗药物研发。本课题可望回答Notch信号途径在肝硬化门脉高压中血管内皮细胞功能失稳态和结构重塑中的作用和机制，并在此基础上探讨通过Notch信号干预门脉高压的可能性。这将为门脉高压中血管内皮功能失稳态和结构重塑的干预提供新的靶点。
- Notch信号作为经典的发育调控信号，在包括血管在内的多种组织细胞的分化发育中发挥关键调控作用。近年来，关于Notch信号在多种疾病如肿瘤、炎症、组织损伤修复等中的作用也逐渐被揭示，但Notch信号途径在肝硬化门脉高压中血管内皮细胞功能失稳态和结构重塑中的作用和机制尚未见报道。因此本课题的研究成果可以丰富Notch信号的作用和调控机制的基础理论。