

密级：不涉密

江苏省卫生健康委科研项目合同书

项目编号：M2024096

项目名称：基于肠道菌群及代谢多组学研究紫绀型先天性心脏病慢性缺氧致脑损伤的发生机制

主持部门：江苏省卫生健康委员会

主管部门：南京市卫生健康委员会

承担单位：南京市儿童医院

地址：江苏省南京市建邺区江东南路8号 邮政编码：210019

项目负责人：蒋岚 单位电话：025-52862937

电子邮箱：jianglan0426@163.com 手机号码：17326120426

起止日期：2025-03-01 至 2028-02-29

结题时间：2028-12-31

江苏省卫生健康委员会制
二零二五年

M2024096



一、主要研究内容和预期的技术指标:

1.主要研究内容

(1) 基于血清代谢组学探讨 CCHD 患儿代谢因子与脑损伤发生的相关性，建立代谢因子预测 CCHD 患儿脑损伤的预测模型

基于江苏地区开展病例-病例对照研究。CCHD 患儿入院当天进行神经发育量表评估，以及脑部 MRI 检测。病例组为伴有神经发育损伤的 CCHD 患儿，病例对照组为没有神经发育损伤的 CCHD 患儿，收集相关生物样本和社会人口学信息、临床信息等。收集患儿入院后第一天的血液样本，送生物公司进行代谢组学检测，分析显著差异代谢物。结合神经发育评估、临床资料及脑核磁共振临床分析，建立代谢因子预测模型，通过特征曲线（receiver operator characteristic curve, ROC 曲线）评价所建立模型的诊断性能。并开展前瞻性队列研究，检测新入院 CCHD 患儿临床样本中目标代谢因子水平、神经发育量表以及脑 MRI 检测，验证代谢因子预测模型的可靠性。

(2) 建立模拟 CCHD 慢性缺氧的大鼠动物模型，探明目标代谢因子在动物模型中的作用

对 P3.5-P14.5 天 SD 野生型大鼠进行慢性缺氧处理（O₂ 浓度为

M2024096



10.5±0.5%)，模拟 CCHD 患儿的慢性缺氧所致脑损伤，对照组大鼠在正常环境饲养。模型组与对照组大鼠分别在 P14 天进行动物 MRI 和血清代谢组检测，同时收集脑组织以及各组织器官，-80℃冻存备用，分析脑损伤发生情况与血清代谢改变的关系，检测目标代谢因子与大鼠脑部 MRI、神经元迁移分化等指标，明确代谢因子在慢性缺氧所致脑损伤中的作用规律。同时，收集脑组织进行转录组检测，结合代谢组学进行关联分析，寻找目标代谢因子与基因的潜在关系。

(3) 探明代谢因子在脑损伤发生中的具体作用靶点和机制，为 CCHD 患儿脑损伤提供潜在治疗靶点

通过基因水平干预，结合体内外实验研究目标代谢因子在慢性缺氧所致脑损伤中的作用及其对神经元行为的作用靶点和潜在通路。**体内实验：**侧脑室注射过表达/沉默慢病毒，构建基因特异性慢性缺氧大鼠模型。进行颈部静脉注射目标代谢因子持续 10 天，构建不同干预组。干预结束后，与未经干预的模型组，以及正常对照组，检测比较大鼠脑部 MRI，目标通路基因的表达与定位，血清中目标因子水平，脑组织损伤标记物，神经元迁移分化等指标的变化与改善情况。同时开展**体外研究**，利用过表达/沉默慢病毒干预的大鼠原代神经元细胞，并

构建慢性缺氧模型，通过不同目标代谢因子干预，检测神经元微管蛋白、神经元电生理、树突复杂性、突触可塑性及神经递质等相关情况。以明确目标代谢因子在慢性缺氧所致脑组织损伤中的潜在靶点和机制。

（4）探究肠道菌群组成影响关键代谢因子的作用机制，建立基于肠道菌群的潜在无创干预新策略

通过将正常大鼠的粪便菌群，以及前期肠道微生物组学分析的差异菌群，移植给模型大鼠，来研究不同肠道菌群组成对慢性缺氧条件下代谢因子的作用，并筛选 FMT 疗效组中参与的炎症细胞因子和相关的信号通路，进一步研究优良肠道菌群的组成规律及对慢性缺氧代谢扰动的影响机制，为通过调节肠道菌群建立潜在的无创干预 CCHD 患儿慢性缺氧脑损伤策略提供理论基础。

2、预期的技术指标

（1）探究 CCHD 患儿机体代谢物变化及代谢通路的扰动与神经发育的相关性，寻找代谢因子特征标志物；并建立代谢因子预测 CCHD 患儿脑损伤的预测模型，为早期诊疗和干预提供新思路。

（2）研究目标代谢因子影响神经发育的作用途径及分子机

M2024096



制，探寻 CCHD 患儿脑损伤潜在治疗靶点，开发利用肠道菌群进行 CCHD 患儿神经发育障碍早期干预的潜在新策略。



二、合同期内的研究进度计划，分年度达到的目标和研究方法及技术路线，包括时间进度安排、研究地点、规模（参加人数、经费投入），阶段成果，所采取的主要方法和技术路线：

第一年度

【预期目标】

- 1) 收集 100 例临床血液样本，以及患儿神经发育量表及脑部核磁检测。
- 2) 送测血清代谢组学，初步分析差异代谢因子以及脑损伤之间的关联性，确定潜在预测因子；同时，对先前 CCHD 患儿建立随访，进行神经发育量表及脑部核磁分析，记录神经发育情况，验证预测因子可靠性。
- 3) 构建慢性缺氧细胞和动物模型，检测慢性缺氧下动物血清代谢组学，验证关键代谢因子在动物模型中的影响和表达；
- 4) 撰写阶段性研究成果，参加学术会议 1 次，力争获大会发言。

【研究方法及技术路线】

第一部分：基于血清代谢组学探讨 CCHD 患儿代谢因子与脑损伤发生的相关性

（1）研究对象

拟从南京医科大学附属儿童医院心胸外科就诊的 1 岁以内紫绀

M2024096



型先心病患儿进行人群样本的筛选。术前完善听诊、体格检查及心脏超声、心脏大血管电子计算机断层扫描(Computed Tomography, CT)检查等明确诊断。

纳入标准：①诊断为紫绀型（完全型肺静脉异位引流、肺动脉闭锁、法洛四联症等）先心病；②神经发育量表及脑部MRI显示有异常；③小于等于12个月；④足月顺产；⑤入院前人工喂养；⑥入院前1个月内未使用过抗生素、益生菌。

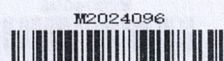
排除标准：①合并严重消化道疾病如新生儿坏死性小肠结肠炎等；②免疫性疾病；③术前重症感染；④染色体异常；⑤明确神经系统疾病，以及有既往脑损伤；⑥二次手术或死亡。

(2) 资料收集

收集符合纳入标准患儿：①一般情况：如性别、年龄等；②体格检查：入院时、术后1月、3月、6月的身长、体重、BMI、三头肌皮褶厚度(选择肩峰和尺骨鹰嘴连线的上臂中点上1cm处，左手拇指、食指、中指夹提起皮肤及皮下组织，用皮褶计测量三次，取平均值)；③常规生化指标。

(3) 知情同意和伦理审查

受试者需要自愿接受调查，受试者具有项目的知情权、选择权和退出权，并且签署知情同意书。



(4) 临床血液样本的收集与检测分析

对已收集的 2020 年 5 月至 2022 年 12 月时间段内于南京医科大学附属儿童医院心胸外科住院的 12 月龄内紫绀型先心病患儿术前符合测序要求的血液标本（共 56 例），进行代谢组学分析，依据脑部 MRI 和神经发育量表评估后，分为 CCHD 患儿神经发育损伤组，CCHD 患儿神经发育正常组进行比较分析。同时，对上述患儿建立随访档案，为开展长期神经发育评估和监测，以验证代谢因子预测模型的准确性。

① 血清代谢组学检测

将血清样本送至上海美吉公司进行代谢组学分析，寻找差异代谢产物。

建立数据矩阵：经 LC-MS/GC-MS 仪器分析后，利用代谢组学处理软件 Progenesis QI (Waters Corporation, Milford, USA) 进行基线过滤、峰识别、积分、保留时间校正、峰对齐，最终得到一个保留时间、质荷比和峰强度的数据矩阵，数据矩阵，用 80% 规则来去除缺失值，，即保留至少一组样品中非零值 80% 以上的变量，再进行填补空缺值（原始矩阵中最小值填补空缺值），为减小样品制备及仪器不稳定带来的误差，用总和归一化法对样本质谱峰的响应强度进行归一化，得到归一化后的数据矩阵。同时删除 QC 样本相对标准偏差（RSD）> 30%



的变量，并进行 log10 对数化处理，得到最终用于后续分析的数据矩阵。同时将 MS 和 MS-MS 质谱信息与代谢公共数据库 HMDB(<http://www.hmdb.ca/>)和 Metlin(<https://metlin.scripps.edu/>)进行匹配，得到代谢物信息。

差异代谢物分析：R 软件包 ropls(Version1.6.2)进行主成分分析 (PCA) 和正交最小偏二乘判别分析 (OPLS-DA)，并使用 7 次循环交互验证来评估模型的稳定性。此外，进行 student's *t* 检验和差异倍数分析。基于 OPLS-DA 模型得到的变量权重值 (VIP) 和 student's *t* 检验 *p* 值， $VIP > 1$ ， $p < 0.05$ 的代谢物为显著差异代谢物。

生物信息学分析：差异代谢物通过 KEGG 数据库 (<https://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>) 进行的代谢通路注释，获得差异代谢物参与的通路。Python 软件包 scipy.stats 进行通路富集分析，并通过 Fisher 精确检验获得与实验处理最相关的生物学途径。

② 血液中细胞因子及脑损伤标志物检测

提取血液中总 RNA，将 RNA 样品与试剂盒（广州复能基因有限公司，货号 AOMD-Q050）提供的反应液混合，离心后在 37°C 下反应 60min，后 85°C 5 min 灭活处理，T100TM Thermal Cycter PCR 仪（美国 Bio-Rad 公司）进行逆转录。将



获得的 cDNA 稀释 10 倍，以 U6 作为内参基因，应用 7500 型实时 PCR 仪（美国 Applied Biosystems 公司）进行 Real-time PCR 反应和数据收集。分析比较 CCHD 神经发育障碍患儿和正常对照组中炎症因子如：IL-6、IL-17、TNF- α 、IFN- γ ，IL-4 和 IL-10 等的表达；以及神经损伤标志物的水平：如星形胶质细胞损伤标志物 S100 β ，GFAP；轴索损伤标志物 Alpha-II 血影蛋白降解产物（alpha-II spectrin breakdown products, SBDPs）、Tau 蛋白和神经细丝（neurofilament, NF）；神经元损伤标志物 UCH-L1 和神经元特异性烯醇化酶（neurone specific enolase, NSE）。

（5）影像组学特征的获取与筛选

对所有参与者签署同意书后，使用 3.0T 磁共振成像机（Siemens Magnetom Avanto, Erlangen, Germany），配备标准的 12 通道头线圈。T1 加权 MRI 数据采用如下参数：重复时间（Repetition time, TR）=1900ms，回波时间（Echo time, TE）=2.48ms，图像矩阵=256 \times 256 \times 176，体素分辨率=1 \times 1 \times 1。扫描全程时长为 6 分钟。所有受试者使用海绵耳塞防止扫描过程中的噪音，并要求受试者安静地躺着，闭上眼睛，避免思考。在扫描过程中，受试者的头部被泡沫垫支撑，以减少运动伪影。原始的 DICOM 数据通过 MRIcron 转换为



NIfTI 文件格式 (<https://www.nitrc.org/projects/mricron>)。随后使用 3D-slicer (版本 4.8.0; <http://www.slicer.org>) 半自动勾画感兴趣区 (region of interest, ROI)。特征提取使用开源 Pyradiomics 软件包 (<http://www.radiomics.io/pyradiomics.html>)。对于 T1WI, 每个 ROI 提取 851 个影像组学特征 (18 个一阶特征、14 个基于形状的特征、75 个纹理特征和 744 个基于变换的特征)。采用套索 (The least absolute shrinkage and selection operator, LASSO) logistic 回归算法, 通过 10 倍交叉验证进行惩罚参数调整, 选择先心病相关特征。

(6) 神经发育评估及围手术期临床资料筛选

采用韦氏智力量表 (Wechsler Intelligence Scale for Children-Chinese revised edition, WISC-CR) 评价儿童神经发育能力。学龄期儿童中使用 WISC-CR, 该量表由 6 个语言和 6 个操作分量表组成。全量表智商 (The full-scale intelligence quotient, FSIQ) 是由这 12 个分量表计算出的语言智商 (verbal intelligence quotient, VIQ) 和操作智商 (performance intelligence quotient, PIQ) 推导出来的。

(7) 关联与模型预测分析

除代谢组分析外, 所有实验数据均采用 GraphPad Prism 8 进行

处理、分析。连续性数据结果以均数 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示, 两组间的比较采用 t 检验, 多样本间的比较采用双因素的方差分析。性别的比较采用卡方检验。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。根据代谢组学分析结果, 结合神经发育评估、临床资料及脑核磁共振临床分析, 使用 RDA/CCA、相关性 Heatmap 图、Network 网络等构建多重相关性分析, 筛选代谢物中与脑发育损伤显著相关的因子。建立代谢因子预测模型, 通过特征曲线 (receiver operator characteristic curve, ROC 曲线) 评价所建立模型的诊断性能。

第二部分: 建立模拟 CCHD 慢性缺氧的大鼠动物模型, 探明目标代谢因子在动物模型中的作用

(1) 模拟 CCHD 慢性缺氧大鼠动物模型的建立

将出生后 3 天(P3)的 SD 新生大鼠及其母鼠放置缺氧箱进行慢性缺氧处理 (氧气浓度为 $10.5 \pm 0.5\%$), 在大鼠 P14 天时取出缺氧箱, 放置正常环境继续饲养, 模拟 CHD 患儿的慢性缺氧所致脑损伤。对照组大鼠在正常环境饲养, 干预组大鼠为在缺氧条件下静脉注射目标代谢因子。

(2) 大鼠 MRI 自适应模版的建立及检测

①格式调整: 大鼠 MRI 数据由 ParaVision360 导出后, 使用



dcm2niigui 软件进行格式转化, 转换为 nii 文件, 用于后续分析。

②大鼠 MRI 数据预处理: 基于 Matlab 平台, 激活 SPM。Toolbox:spmAnimallHEP。type of animals: Mouse; Preprocess: Structural; Load N1, Run segmentation.

③Input files to make template, 选择初始参考模板: Run make user temmplate。

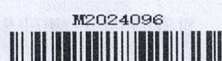
④使用 itknap 去除脑外高亮像素, 保存图像为 nii 文件。Image calculator-input image 为去除脑外高亮像素模板-output filename 为 output-expression: $i1 > 0.5$ 。

⑤打开 Image calculator-input image 为 output 以及参考模板-output filename 为 mmask-expression: $i1.*i2$ 。

⑥Standardize of the user template, source image 为 mask,nii, image to write 为所有纳入分析的图像, reference image 为 fsingle-brain。

(3) 大鼠血液及组织样本收集

血液样本收集: 造模结束后, 将大鼠置于封闭麻醉罐中, 内含



30%氧气+70%二氧化碳，用异氟醚进行麻醉，诱导浓度为3%，维持浓度为1%-1.5%。麻醉满意后，颈总动脉取血，至于室温静置60 min，3000 转/分钟，离心20 min，取上层血清，至于-80℃保存，备用。

脑组织取材和染色：将大鼠开颅，完整取出大脑及小脑，部分多聚甲醛固定，部分-80℃保存，备用。**HE 染色：**取材组织块，经固定后，常规石蜡包埋，切片。石蜡切片二甲苯中脱蜡2次，每次5-10 min。系列乙醇(100%、95%、85%、75%)复水，每梯度3 min。蒸馏水2 min。苏木素染液染色10 min，蒸馏水洗去浮色。分化液分化3 min，流水冲洗2次，每次2 min。伊红染液1 min，蒸馏水快洗2-3 s，快速脱水。脱水，透明，封片：A. 75%乙醇、85%乙醇、95%乙醇和100%乙醇各浸洗2-3 s。B. 100%乙醇浸洗1 min，二甲苯透明两次，每次1 min，中性树胶封固，镜下观察。使用 Image J 软件测量回肠部分的绒毛长度、绒毛宽度、隐窝深度。

尼氏染色：常规脱同 HE 染色。1%甲苯胺蓝染，置于56℃恒温箱染色20 min。流水冲洗，不褪色后蒸馏水洗3次，每次5 min。分色液分色15 s。用70%、80%、90%乙醇各浸洗2 min。100%乙醇 I、II 中脱水各5 min。二甲苯 I、II 中透明各



15 min。中性树脂封片，镜下观察。

(4) 血清代谢组检测，以及脑组织转录组学检测

血清代谢组方法同第一部分相同，此处省略。大鼠脑组织样本送至上海美吉公司进行转录组学分析，寻找关键差异基因。

脑组织转录组样本制备：从组织样品中提取 total RNA，利用 Nanodrop2000 对所提 RNA 的浓度和纯度进行检测琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性，Agilent2100 测定 RIN 值。单次建库要求 RNA 总量 $> 1 \mu\text{g}$ 浓度 $> 35 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ，OD260/280 > 1.8 ，OD260/230 > 1.0 。3.1.1.2 Oligo dT 富集 mRNA。真核生物 mRNA 3'末端具有 polyA 尾的结构，利用带有 Oligo(dT)的磁珠与 polyA 进行 A-T 碱基配对，可以从总 RNA 中分离出 mRNA，用于分析转录组信息。在逆转录酶的作用下，加入六碱基随机引物(random hexamers)，以 mRNA 为模板反转合成一链 cDNA，随后进行二链合成，形成稳定的双链结构。加入 End Repair Mix 将其补成平末端，随后在 3'末端加上一"A"碱基，用于连接 Y 字形的接头。PCR 扩增 15 个 cycles，2%琼脂糖胶回收目的条带，TBS380(Picogreen)定量，按数据比例混合上机，cBot 上进行桥式 PCR 扩增，生成 clusters；最后 Illumina 平台测序。



差异基因水平分析：使用软件分别对基因的表达水平进行定量分析,以便后续分析不同样本间基因的差异表达情况，并可通过结合序列功能信息，揭示基因的调控机制。获得基因的 Read Counts 数后,对多组样本(> 2 组)项目进行样本间基因的表达差异分析,鉴定出样本间差异表达的基因，进而研究差异表达基因的功能。利用靶基因预测软件对所有已知及新预测的 ncRNA 进行靶基因预测，并对靶基因进行 GO、KEGG 功能注释及功能富集研究，通过功能富集分析，获得该基因集中的基因主要具有哪些功能或主要参与哪些代谢通路。

(5) 分子验证大鼠脑组织中差异基因表达水平以及 Occludin、Claudin 1 表达量

脑组织 RNA 提取、浓度测定：选取脑白质区域组织 50 mg，加入 1 ml TRIzol，反复吹匀。加入 200 μ l 氯仿，剧烈震荡 15s，室温放置 3 min。离心 12000 转/分钟，15 min。取上清至新 EP 管，按 500 μ l/ml 加入异丙醇，沉淀 RNA，震荡均匀。离心：12000 转/分钟，离心 15min，弃去上清。加入 1 ml 75% 乙醇(DEPC 水配制)，洗涤 RNA 沉淀，离心 7500 转/分钟，10 min,弃去上清。置于空气中 5-10 min，干燥 RNA 沉淀。DEPC 水重悬 RNA(一般 20-30 μ l)。OneDrop RNA 浓度检测，将浓



度配置在 500-1000 ng/ml。逆转录和 qPCR: 将 RNA 板和 5xAll-In-One RT MasterMix 至于冰上, 轻柔并彻底混合。按试剂盒说明书步骤进行操作。

Western Blot 检测脑组织差异基因表达水平以及 Occludin、Claudin 1 表达量:

a.取脑组织蛋白: 切除大脑皮层,选取脑白质区域 50 mg, 加入 1 ml 裂解液(按 1000:10:1 比例, 分别加入 RIPA, 磷酸酶抑制剂, 蛋白酶抑制剂)。冷冻匀浆机中进行组织匀浆, 设定频率 60 Hz, 30 s/min 间隔, 共计 4 组, 共 4 分钟。冰上静置 30 min, 每 10 min 震荡一次。离心: 4°C 离心机离心, 12000 转/分钟, 离心 30 min。收集上清至新的 1.5 ml 的 EP 管中。

b. BCA 法测定蛋白浓度: 建立蛋白标准曲线: 分别为 0 mg/ml, 0.025 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.3 mg/ml, 0.4 mg/ml 和 0.5 mg/ml。每孔加入 200 μ l 工作液(A 液: B 液=50:1 配置), 37°C 恒温箱孵育 30 min。酶标仪 562 nm 波长测定吸光度, 并计算相应蛋白浓度。

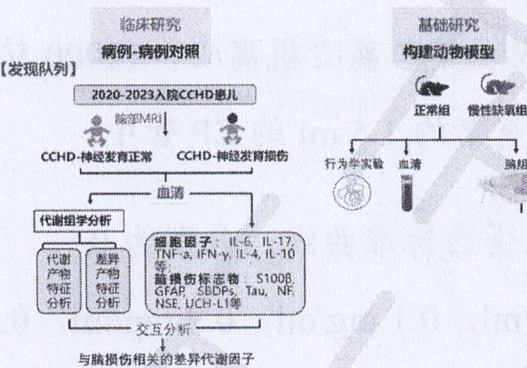
c.蛋白定量 60 μ g, 按 4:1 比例依次加入样品液、SDS 上样缓冲液, 100°C 金属浴 5 min, -20°C 冻存。凝胶电泳后转膜, 提前配置好 5% 脱脂奶粉溶液, PVDF 室温摇床封闭 1 h。按试剂



公司配比条件，用 1 抗稀释液稀释 β -actin、Occludin、Claudin1 抗体，4℃孵育过夜。TBST 洗膜 3 次，每次 10 min。按试剂公司配比条件，稀释二抗，室温孵育 1~2 h。TBST 洗膜 3 次，每次 10 min。

d.曝光。按 1:1 配置 ECL 显影试剂盒中的 A、B 液，每张 PVDF 膜滴加 500 μ l 显影液，至曝光仪由曝光，Image Lab 软件进行定量分析。

【技术路线图】



第二年度

【预期目标】

- 1) 结合动物脑 MRI 以及脑组织转录组学结果，多组学联合分析代谢因子的潜在作用靶点和信号通路相关分子表

达情况;

2) 收集大鼠肠脑组织和血液样本,检测脑组织中神经突触、少突胶质细胞分化、小胶质细胞活化等状态,明确代谢因子在慢性缺氧致白质损伤中的调控作用和机制,探寻新的潜在作用靶点。

3) 完成项目中期报告,研发 CCHD 脑损伤的早期诊断生物标志物试剂盒,申请相关专利 1 项;撰写论文,发表相关学术论文 1-2 篇

【研究方法及技术路线】

第三部分: 探明代谢因子在脑损伤发生中的作用靶点和机制

(1) 代谢因子作用机制的在体验证

靶基因过表达/抑制的慢性缺氧大鼠模型: 选取 SD 野生型大鼠, 5%水合氯醛腹腔麻醉(0.007ml/g), 大鼠头顶部去毛后固定于脑立体定位仪上, 头顶部皮肤消毒、正中切开, 暴露前囟, 在前囟后 2.0mm, 中线右(左)侧 2.5mm 处, 微量注射器自脑表面垂直进针约 3.0mm, 缓慢注入过表达慢病毒, 每侧注射时间不少于 5min, 留针 2min, 缓慢退针。72h 后提取脑组织, Western Blot 验证靶标基因的表达情况, 证明过表达/抑制



大鼠构建成功。

根据前述方法构建目标基因过表达/抑制的慢性缺氧大鼠模型，同时给与静脉注射代谢因子干预，干预 10 d 结束后检测大鼠 MRI，并处死大鼠：1) 检测血液及脑组织中目标代谢因子含量；2) Wester Blot 检测潜在靶标基因的表达情况；3) ELISA 检测炎症相关分子 II-1、INF-a 和 MCP-1 等的表达情况；4) Western Blot 检测 Caspase-3、Bad 等凋亡因子的蛋白表达；5) 尼氏染色观察神经元形态结构，吖啶橙和溴乙锭双染色荧光显微镜检测大鼠神经元坏死和凋亡情况；6) 分离神经元线粒体，评价其功能 (mtDNA 定量、线粒体膜电位、线粒体细胞色素 C 释放、线粒体呼吸氧耗率、线粒体呼吸链氧化酶活性等)。

(2) 体外验证

大鼠原代神经细胞提取：将出生 24 h 内的新生大鼠断颈，剥离脑膜，去除小脑和延脑，将大脑皮层置于含预冷 DMEM/F12 的小培养皿中，用眼科剪将其剪碎，加入适量 0.25% 的胰蛋白酶和 0.2% 的胶原酶，37℃ 消化 20 min 后用胎牛血清终止消化，轻轻吹打组织，充分混匀，1000r/min，离心 5min，弃上清，加入适量含 20% FBS 的 DMEM/F12 液重悬细胞，用 74μm 的筛

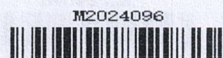


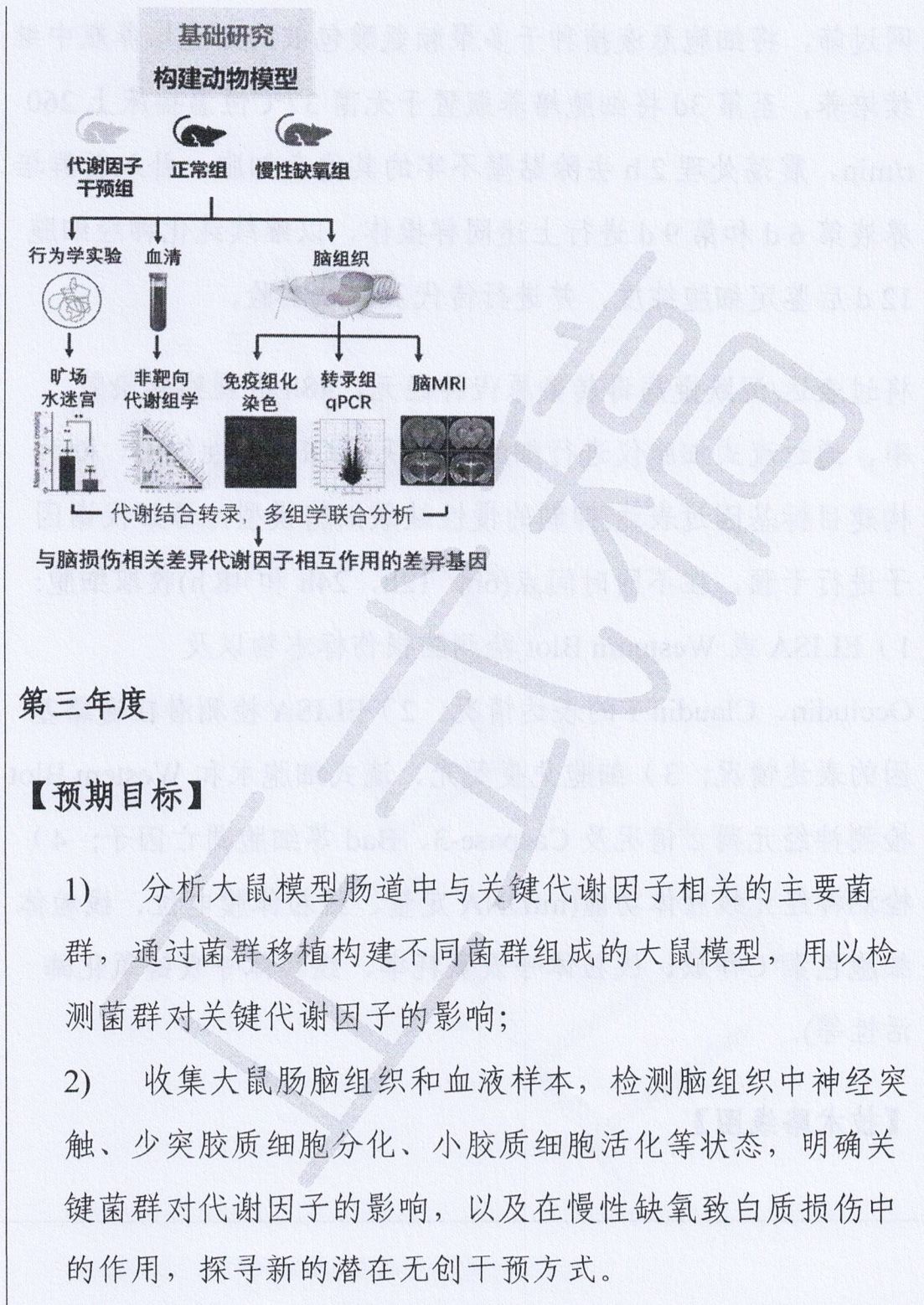
网过筛，将细胞悬液接种于多聚赖氨酸包被的细胞培养瓶中继续培养，至第 3d 将细胞培养瓶置于无菌 37℃ 恒温摇床上 260 r/min，震荡处理 2 h 去除贴壁不牢的其他杂细胞，补入新鲜培养液第 6 d 和第 9 d 进行上述同样操作，以继续纯化神经细胞 12 d 后鉴定细胞纯度，并进行传代及后续实验。

将过表达/沉默慢病毒转染原代神经元，48h 后观察转染效率，通过流式细胞仪进行细胞分选获得 GFP 阳性细胞，随后构建目标基因过表达/抑制的慢性缺氧细胞模型，添加代谢因子进行干预，在不同时间点(6h, 12h, 24h 和 48 h)收取细胞：

1) ELISA 或 Western Blot 检测脑损伤标志物以及 Occludin、Claudin 1 的表达情况；2) ELISA 检测潜在通路基因的表达情况；3) 细胞免疫荧光、流式细胞术和 Western Blot 检测神经元凋亡情况及 Caspase-3、Bad 等细胞凋亡因子；4) 检测神经元线粒体功能(mtDNA 定量、线粒体膜电位、线粒体细胞色素^c释放、线粒体呼吸氧耗率、线粒体呼吸链氧化酶活性等)。

【技术路线图】





3) 撰写项目结题报告, 发表相关学术论文 2-3 篇, 力争高质量论文 1 篇; 研发干预 CCHD 脑损伤的菌群制剂, 申请相关专利, 争取成果转化。

【研究方法及技术路线】

第四部分: 探究肠道菌群组成对代谢全局扰动的影响和作用机制

(1) 正常对照组大鼠粪便菌液制作

①选取正常组 SD 大鼠作为正常大鼠粪便菌群供体; ②灌肠当天采用刺激大鼠肛门的方法收集新鲜排出的大鼠粪便, 用电子天平对大鼠新鲜粪便进行称重; ③向称重后的大鼠粪便中加入约 5 倍的无菌生理盐水, 搅拌混匀得到混悬液; ④使用滤网过滤混悬液, 滤去残渣, 用 10 mL 离心管收集悬液; ⑤将悬液置于离心机中, 以 1200 转/分的速率离心 3 min; ⑥弃去上清液, 加入无菌生理盐水至原悬液的量, 上下颠倒混匀, 按上述方法再次离心, 重复离心、洗涤 3 次; ⑦最后的沉淀加入无菌生理盐水至原悬液的量即为提纯的粪菌液。

(2) 灌肠法构建 FMT 干预组

将慢性缺氧大鼠按体重随机分组: 慢性缺氧对照组和不同组成



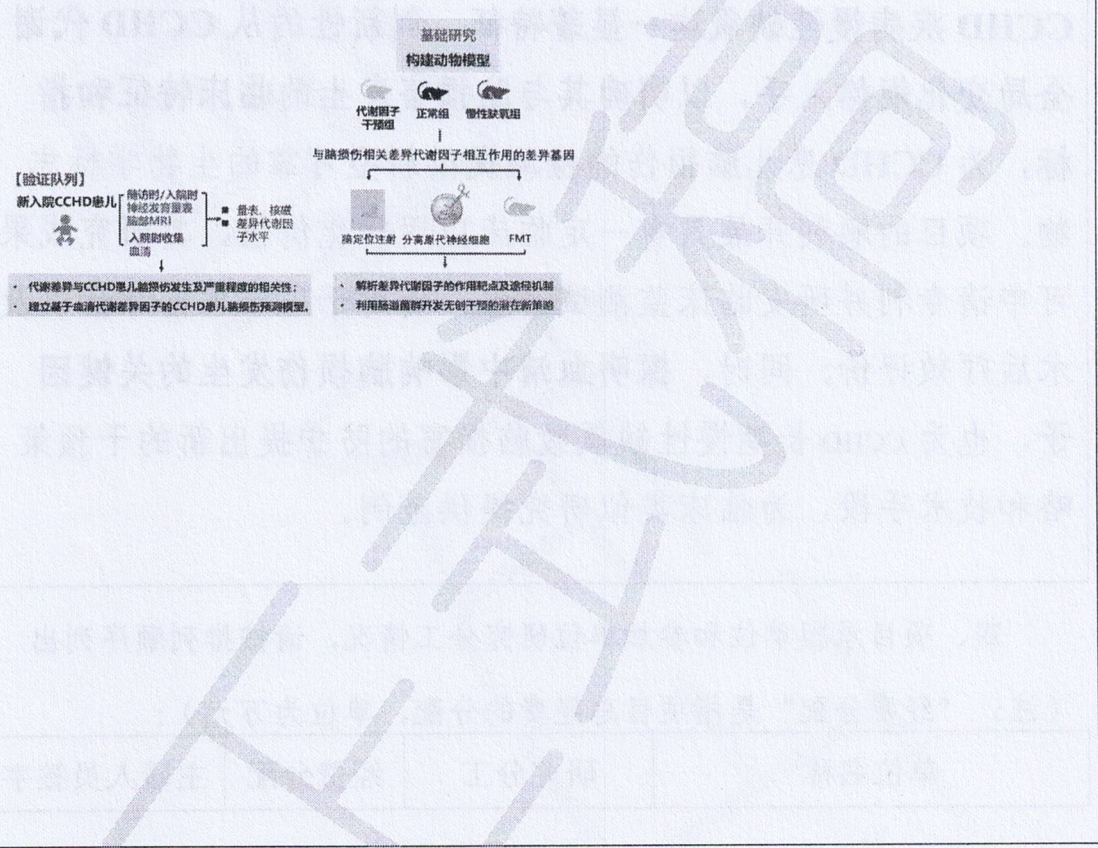
的粪菌移植组。粪菌移植组给予粪菌液隔天灌肠一次，每次 0.3 ml，总计灌六次；慢性缺氧对照组按相同方式给予无菌生理盐水灌肠。大鼠灌肠前 8 小时禁食、4 小时禁水，使用提纯的新鲜类菌液，立即进行 FMT 具体操作如下：①灌肠前轻柔按摩大鼠腹部，促其排出残余粪便；②用自制灌肠针抽取粪菌液，并用石蜡油润滑灌肠针；③抓持大鼠，使其头朝下、尾朝上将灌肠针轻轻送入肠腔约 2~3 cm 处，然后将粪菌液缓慢注入大鼠体内并保持约 1 min，防止粪菌液溢出；④缓慢退出灌肠针，将大鼠继续倒置约 1 min，防止粪菌液流出；⑤灌肠结束后，观察大鼠无异常后将其放回。

(3) 标本采集及组织病理及生化指标检测

粪菌液灌肠结束后第 3 天处死大鼠采集标本。用 10%水合氯醛（0.03 mL/10 g）对大鼠行腹腔注射麻醉，麻醉后摘除眼球，取眼底静脉血约 1.0 mL，置于 1.5 mL 无菌干燥 EP 管中，以 3000 转/分的速率离心 3 min 分离血清，吸取约 0.5 mL 血清用于生化检测，剩余血清冻存于 -80℃低温冰箱采血完成后脱颈椎处死大鼠，固定于手术台上，沿腹中线打开腹腔，摘取两侧肾脏，用 PBS 冲洗干净后置于 10%的福尔马林溶液中固定。然后收集大鼠结肠内的粪便冻存于 -80℃低温冰箱中。

同时剪取远端结肠约 2 cm，用 PBS 冲洗干净后置于 10% 的福尔马林溶液中进行固定。组织病理及生化指标检测方法同第三部分，此处省去详细描述。

【技术路线图】




三、预期达到的技术经济效益和社会效益:

由于长期慢性低氧导致认知功能损伤早期往往无明显不适，而且目前对于认知损伤的筛查临床尚未普及，患者尚未重视，通常发现时已经发生不可逆的损害。血清代谢组谱的早期测量可以用作预测结果的敏感和特异性生物标志物。本项目紧扣 CCHD 疾病慢性缺氧这一显著特征，创新性的从 CCHD 代谢全局变化规律入手，以明确其与脑损害发生的临床特征和指标，为 CCHD 患儿脑损伤的检测提供新型可靠的生物学标志物。项目的顺利开展具有一定临床应用转化价值，其研究成果可申请专利并研发临床监测试剂盒，有助于用于术前评估以及术后疗效评价；同时，探明血清中影响脑损伤发生的关键因子，也为 CCHD 长期慢性缺氧致脑损害的防护提出新的干预策略和技术手段，为临床类似研究提供范例。

四、项目承担单位和参加单位研究分工情况，请按排列顺序列出
(注：“经费分配”是指项目总经费的分配，单位为万元)：

单位名称	研究分工	经费分配	主研人员签字
------	------	------	--------



南京市儿童医院	负责项目全部 研究内容执行	10	 蒋崑 庞弘利 寸跃璇 马恩雨
---------	------------------	----	--

M2024096



五、甲方确认在合同规定的研究期间拨付给乙方研究经费如下：

单位：万元

研究经费 总 额	省卫生健康委 拨款	其它部门 拨款	自筹	贷款	其它
10	5		5		

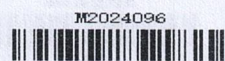
如有其它部门拨款，请在下面按要求说明。

拨款单位名称	拨款总额 (万元)	拨款时间	其它说明

M2024096



项目经费支出情况（单位：万元）	
省拨款金额：10	
科目	预算金额
一、直接费用	9.5
1、设备费	0
(1) 购置设备费	
(2) 试制设备费	
(3) 设备改造与租赁费	
2、材料费	2
3、测试化验加工费	6
4、燃料动力费	
5、差旅费	0.5
6、会议费	
7、出版/文献/信息传播/知识产权事务费	1
8、专家咨询费	
9、其他	
二、间接费用	0.5
10、管理费	0.5
11、绩效考核支出	
合计	10



六、各类型项目须按照省财政资助额度,项目承担单位给予不低于1:1比例的资金配套。项目经费须专款专用,按合同中的预算开支,不得挪用或截留,如发生此类情况,一经查实,甲方有权终止项目;并追回所拨项目经费。

七、在项目实施过程中,甲方主要负责组织协调解决重大问题。根据合同执行情况,必要时在专家论证的基础上,与丙方协商对合同进行调整。乙方负责组织完成合同所规定的各项研究任务,丙方负责监督检查,保证合同的实施。各方应保证合同中计划经费的投入。

八、在项目实施过程中,如乙方根据研究情况要对合同进行修改,需及时向甲方或丙方书面提出,经甲、丙方组织讨论同意后方有效,并按修改后的合同执行。乙方自行修改无效,并负责赔偿所有损失。

九、合同期满后,由甲方组织专家进行统一结题,未按合同要求完成者,取消日后申请委科研项目资格,同时甲方有权追回拨款。

十、验收后的项目,如需进行临床试验的要在有关部门批准后方可进行。

十一、签约各方对秘密资料负有保密责任,未经甲方批准,不得在公开发表的论文中引用保密数据,试验结果或其它有关资料,也不得泄露给甲、乙、丙三方之外的单位和个人。

十二、本合同必须经过项目主持部门(甲方)——江苏省卫生健康委员会、项目承担单位(乙方)、项目保证单位(丙方)——当地卫生健康委员会三方共同签字盖章才有效。

十三、本合同正式文本一式四份,甲方留存一份,乙、丙方及负责人各存一份。

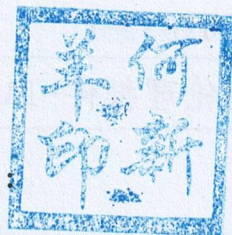


十四、签约各方:

主持部门 (甲方): 江苏省卫生健康委员会



主管处室负责人 (签章):
2025 年 02 月 13 日



承担单位 (乙方): 南京市儿童医院



开户银行: 中国农业银行南京市广州路支行

帐号:

10100301040000177

开户名: 南京市儿童医院

法定代表人或委托
代理人 (签章):

张爱华

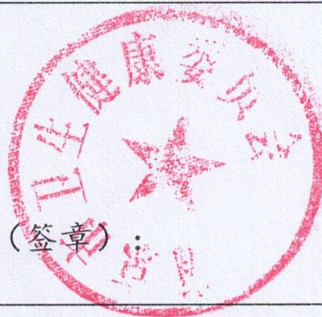
2025 年 02 月 13 日

张新

项目负责人 (签章): 蒋岚

2025 年 02 月 13 日

保证单位 (丙方): 南京市卫生健康委员会



法定代表人或委托代理人 (签章):

M2024096



附件信息

附件名称
202502033-1
动物伦理批件-IACUC 2502043（签字版）

M2024096

