

# 安徽省高等学校科学研究项目 (自然科学类)

## 计划任务书

项目名称	脂蛋白(a)调控 M1 型巨噬细胞分化 促进慢性非细菌性前列腺炎的机 制研究
项目类别	重大项目 <input type="checkbox"/> 重点项目 <input checked="" type="checkbox"/>
申请人	孟佳林
所属单位	安徽医科大学第一附属医院
邮政编码	230032
通讯地址	安徽省合肥市绩溪路 218 号
电 话	18256921822
申请日期	2022-09-18

安徽省教育厅 制

2022 年 7 月

## 一、基本信息

项目名称	脂蛋白(a)调控 M1 型巨噬细胞分化促进慢性非细菌性前列腺炎的机制研究				
项目类别	重点项目		学 科	外科学（泌尿外）	
是否依托平台	是		研究类型	基础研究	
依托平台	泌尿生殖系统疾病安徽省重点实验室				
是否产学研项目	否		发明专利号	无	
负责人姓名	孟佳林	性 别	男	身份证号	341224199304060435
民 族	汉族	出生日期	1993.4.6	研究专长	泌尿系统疾病诊疗
行政职务	无	职 称	校聘副教授	担任导师	否
最后学历	研究生	最后学位	博士	手 机 号	18256921822
起始年月	2023.01	截止年月	2024.12	联系电话	0551-62922334
所属单位	安徽医科大学第一附属医院		电子邮件	mengjialin@ahmu.edu.cn	
通讯地址	安徽省合肥市绩溪路 218 号		邮政编码	230022	
申请经费(单位: 万元)	10				
预期成果	<ol style="list-style-type: none"> <li>1、利用临床病例数据及 CNP 动物模型，明确 Lp(a)在 CNP 的作用；</li> <li>2、在 CNP 患者中评估 Lp(a)表达水平与 CNP 严重程度的关系；</li> <li>3、在高脂饮食条件下，利用 Lp(a)抑制剂 PCSK9 确认其在 CNP 中的重要作用；</li> <li>4、在高水平期刊上发表学术论文 1 篇，参加专科学术年会 1 次，联合培养硕士 1 名。</li> </ol>				
研究内容和意义	摘 要	<p>慢性非细菌性前列腺炎（chronic non-bacterial prostatitis, CNP）复发率高、治愈率低，发病机制尚不明确，是临床上亟待解决的问题。申请人前期研究发现，CNP 患者外周血脂蛋白(a)[LP(a)]等指标显著升高，且与症状严重程度正相关。预实验发现，高脂饮食组 CNP 小鼠较对照组 LP(a)水平显著增加，并伴有加剧的慢性前列腺炎反应及盆腔疼痛，这些症状可以被 LP(a)抑制剂明显减轻。基于预实验结果，申请人提出科学假说“脂蛋白(a)调控 M1 型巨噬细胞分化促进慢性非细菌性前列腺炎的进展”。本项目从临床问题入手，以动物模型及基础实验作为支持，拟解决以下问题：①在 CNP 患者和健康对照中评估外周血 Lp(a)的差异表达；②在 CNP 患者中评估 Lp(a)表达水平与疾病发生风险、疾病严重程度的关系；③在 CNP 患者和动物实验水平验证 Lp(a)对 M1 巨噬细胞分化的调控作用。最终明确 Lp(a)对于 CNP 的作用及机制，以期为 CNP 的临床治疗提供新的策略。</p>			

## 二、项目参加人员简表

姓名	性别	身份证号	年龄	专业职务	学历	学位	工作单位	研究分工	签字
孟佳林	男	341224199304060435	29	校聘副教授、医师	研究生	博士	安徽医科大学第一附属医院	项目负责人	孟佳林
廖贵益	男	422722197302191411	49	副教授、主任医师	研究生	博士	安徽医科大学第一附属医院	项目联合设计、样本收集	廖贵益
周骏	男	340204197811191514	44	副教授、主任医师	研究生	博士	安徽医科大学第一附属医院	项目联合设计、样本收集	周骏
张蒙	男	342523199102168510	31	校聘副教授、医师	研究生	博士	安徽医科大学第一附属医院	项目联合设计、数据分析	张蒙
陈晶	女	371424199203270026	30	医师	研究生	博士	安徽医科大学第一附属医院	实验验证	陈晶
梁前俊	男	342401198903134072	33	主治医师	研究生	硕士	安徽医科大学附属六安医院	样本收集	梁前俊
关煜	男	341125199208073798	30	未取得	研究生	博士在读	安徽医科大学第一附属医院	实验验证	关煜
李佳蔚	男	510503199712227017	24	未取得	研究生	硕士在读	安徽医科大学第一附属医院	数据分析、实验验证	李佳蔚

### 三、经费预算

预算科目		总经费（万元）	申请经费（万元）		
			财政拨款	单位配套	其它来源
经费预算	1.设备费	0	0	0	0
	(1)购置设备费	0	0	0	0
	(2)试制设备费	0	0	0	0
	(3)设备改造与 租赁费	0	0	0	0
	2.业务费	9	9	0	0
	3.劳务费	1	1	0	0
合计		10	10	0	0
备注（若需购入单价超过5万的设备，请在此列出详细名单）：					

## 四、报告正文

拟开展的研究工作：拟开展的研究工作的科学意义和创新性；研究内容及方案；技术路线。（建议不超过 2000 字）

### 一、拟开展的研究工作的科学意义和创新性

**立项新颖、基于临床：**申请人通过分析约 1.5 万例临床样本发现，超过 50% 的男性都曾经罹患 CNP，CNP 患者血液中 Lp(a) 水平较健康人明显升高，且 Lp(a) 水平与 CNP 患者排尿症状评分显著相关。另一方面，高 Lp(a) 已被证实可以促进多种促炎细胞及促炎因子的分泌，加重免疫系统的紊乱，高 Lp(a) 水平的人群有着 3 倍以上的心脑血管疾病发生风险。基于此，申请人发现临床问题：Lp(a) 与 CNP 的发展及临床症状的加重相关。

**技术成熟、方法前沿：**基于业已成熟的 CNP 小鼠模型构建方法，申请人确认高脂饮食会加重 CNP 小鼠前列腺局部炎性浸润及盆腔疼痛水平，且这一加重过程可以通过抑制 Lp(a) 来改善；进一步的研究中，为了明确高脂饮食通过 Lp(a) 影响 CNP 中 M1 巨噬细胞的分化，我们将利用免疫组织化学技术分析了四组小鼠组织中 M1 巨噬细胞生物标志物 CD63、iNOS 表达的情况。综上，申请人的目标是验证临床发现：Lp(a) 对 M1 巨噬细胞分化的调控作用导致 CNP 症状加重。

**多维度实验、探寻机制：**已有研究证明 Lp(a) 促进促炎 M1 型巨噬细胞的分化，申请人团队前期工作已发现减少 Th1 细胞分化和抑制巨噬细胞 M1 表型活化，可以改善 EAP 小鼠的炎症变化和盆腔疼痛。申请人计划进一步研究中：① 利用 Lp(a) 抑制剂 PCSK9，验证高脂饮食通过 Lp(a) 促进 M1 巨噬细胞分化加重 CNP 的机制；② 利用 LPA 敲除小鼠 (LPA<sup>-/-</sup>)，验证高脂饮食通过 Lp(a) 促进 M1 巨噬细胞分化加重 CNP 的机制；③ 获取小鼠 Raw264.7 单核细胞细胞系，诱导分化为 M1 型巨噬细胞，在 Lp(a) 抑制剂 PCSK9 处理和不处理条件下，检测 CD68 及 iNOS 表达差异。因此，本项目重点关注：脂蛋白 (a) 调控 M1 型巨噬细胞分化促进慢性非细菌性前列腺炎的作用机制。

### 二、研究内容及方案

## 1.1 CNP 患者的纳入及数据收集

### ① 患者情况

选取安徽医科大学第一附属医院泌尿外科门诊 CNP 样症状 >3 月的患者，依据纳入/排除标准初步招募 60 例患者，签署知情同意书，在门诊进行 ESWT。收集基本信息、完成问卷调查并按时随访。

### ② 入选标准：

i. 男性，年龄 18-65 岁；ii. 慢性疼痛出现在膀胱、腹股沟、生殖器、下腹部、会阴、肛周的区域且尿路检查未见明显异常超过 3 个月；iii. NIH-CPSI 总分 >15 且疼痛域分数 >4；iv. 前列腺液（expressed prostatic secretion, EPS）检查白细胞计数 <10 个，细菌培养阴性；v. 能够理解试验内容，签署知情同意书并有能力定期回访检查。

### ③ 排除标准：

i. 有凝血功能障碍或正在使用抗凝药物；ii. 有前列腺增生、前列腺癌、膀胱癌、泌尿系结石、坐骨神经痛、腰椎间盘突出等合并症；iii. 合并全身或局部感染性疾病；iv. 泌尿系、骨盆区手术术后；v. 依从性差。

### ④ 数据收集

所有患者需要进行基本信息、调查问卷以及 NIH-CPSI、IPSS、IIEF、VAS、PPSS 评分量表填写，记录基线信息，分析可比性。

## 1.2 建立 CNP 小鼠高脂饮食动物模型

① 实验分组及 CNP 小鼠动物模型的建立：造模选用 6-8 周大小雄性 NOD 小鼠。对于 CNP 造模，采用两次免疫造模法：第一次免疫造模后 4 周，再次进行免疫造模。具体操作：在无菌条件下获取 SD 大鼠前列腺组织，用生理盐水冲洗干净，剪碎，用 0.5% TritonX-100 的生理盐水溶液重悬组织，用匀浆器制成匀浆，离心，吸取上清，获得大鼠前列腺蛋白提纯液。将大鼠前列腺蛋白提纯液和弗氏完全佐剂按照 1:1 比例混匀，乳化匀浆，获得前列腺蛋白和弗氏佐剂的匀浆液。正常组每只鼠皮下多点注射生理盐水 0.2ml，模型组每只鼠皮下多点注射弗氏佐剂匀浆液，建立 CNP 小鼠模型。对于高脂饮食组及 CNP 高脂饮食组，所有小鼠采用 MD2032 啮齿动物 45% 高脂饲料饲喂。各组老鼠在第二次免疫造模 2 周后处死，处死前收集相关数据。

② 盆腔疼痛测量：在造模前（基线测量）及之后的每隔 10 天对小鼠下腹进行触

觉痛测试。实验仪器为 Von Frey 机械刺痛测试包。实验方法：将力度大小为 0.04g, 0.16g, 0.40g, 1.00g 和 4.00g 的纤维丝按升序逐个对每只小鼠进行刺激。每根纤维丝戳 1-2 秒，然后停 5 秒，共 10 次。阳性反应表现为：(1) 小鼠被戳后立即回缩腹部；(2) 小鼠对被戳区域立即舔或抓；(3) 被戳后小鼠跳跃。疼痛测量由两名对实验设计不知情的人员完成。计算响应频率变化百分比，即响应频率变化百分比 = (阳性反应次数值 - 基线测量值) / 基线测量值 × 100%。

③ 标本收集及处理：在到达实验终点后，选择过量戊巴比妥钠注射法处死小鼠，并在无菌条件下迅速取出前列腺组织，镊子仔细去除前列腺被膜及周围组织，每只小鼠取部分前列腺组织石蜡包埋切片，行 HE 及免疫组化染色验证 CNP 模型是否成功建立，另取部分前列腺组织 -80℃ 冻存备用；取小鼠脾脏组织和前列腺组织制作单细胞悬液，采用 Procoll 离心，获得淋巴细胞悬液备用。

### 1.3 检测 Lp(a)、ApoA-I、ApoB 的血清水平

#### ① 受检者的准备

病人空腹 12h，不饮酒 24h 后采集血样。体检对象抽血前应有两周的正常状况记录。注意有无应用影响血脂的药物，如降血脂药、避孕药等。此外，采血的季节都应做相关记录，因为血脂水平有季节性变动，为了前后比较应在每年同一季节检验，应嘱体检对象在抽血前 24 小时内不做剧烈运动。在采血前至少应静坐 5 分钟，使用止血带的时间不超过 1 分钟，穿刺成功后立即松开止血带。

#### ② 检测原理

样本中的脂蛋白 (a) 与包被有特异脂蛋白 (a) 抗体的胶乳颗粒反应，发生凝聚反应。凝聚反应使反应溶液中的浊度增加，并在一定范围内与样本中的脂蛋白 (a) 的浓度成正比，通过在 600nm 波长处测定吸光度的变化值，即可测得样本中脂蛋白 (a) 的浓度。

#### ③ 试剂

本检测使用上海复星长征医学科技有限公司 LP(a)试剂盒，为液体双试剂。各组分如下：

---

#### 试剂 1 (R1)

叠氮化钠	1.0 g/L
甘氨酸缓冲液	40 mmol/L
<b>试剂 2 (R2)</b>	
脂蛋白 (a) 抗体致敏胶乳颗粒	
叠氮化钠	1.0 g/L

#### ④ Lp(a)浓度计算

$$\text{脂蛋白浓度(mg/L)} = \frac{\Delta A (\text{样本})}{\Delta A (\text{校准液})} \times \text{校准液浓度(mg/L)}$$

### 1.4 流式细胞学、ELISA、qPCR、WB 检测 Th17 细胞及相关细胞因子

① 采用流式抗体双标记 CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T 淋巴细胞后，流式细胞荧光分选技术 (fluorescence activated cell sorting, FACS) 检测 CNP 模型外周血 PBMC、脾脏及前列腺组织 Th17 细胞，并计算其细胞比例和数量。具体操作：制备淋巴细胞悬浮液并计数，孵育抗 CD4<sup>+</sup>的表面抗体，流式液洗涤后，加培养刺激液 37°C，5%CO<sub>2</sub> 刺激 4h，洗涤后，再加固定剂，4°C 过夜，第二天加破膜剂两遍，洗涤后，再孵育抗 IL-17 和抗 Foxp3 胞内抗体，洗涤后，用 400ul 流式液重悬，上机检测，获得数据用 Flow JO 软件进行分析。

② 动态分析 Th17 细胞活化状态：在不同时间段对 CNP 小鼠模型进行处死，利用 FACS 检测上述组织中 Th17 的比例变化，同时分选上述组织中 Th17 细胞，进行培养，ELISA 检测相关炎症因子 IL-17、IL-6、IL-10、和 TGF-β 等表达。

③ 采用 qPCR 及 WB 检测 Th17 细胞的相关转录因子 RORγt 和 Foxp3 等 mRNA 及蛋白的表达。

### 1.5 Lp(a)关键功能验证，研究 Lp(a)对 M1 巨噬细胞分化及 CNP 加重的作用

① 利用 Lp(a)抑制剂 PCSK9，验证高脂饮食通过 Lp(a)升高加重 CNP 的机制：选取 Lp(a)特异性磷酸化抑制剂 C188-9，分为阴性对照组，高脂饮食对照组，高脂饮食+CNP 组，高脂饮食+CNP+ PCSK9 组，检测各组小鼠前列腺组织炎症评分表达，记录 Von Frey 机械刺痛阳性比例，免疫荧光检测 M1 巨噬细胞标记物 CD68 及 iNOS，检测外周血 Lp(a)

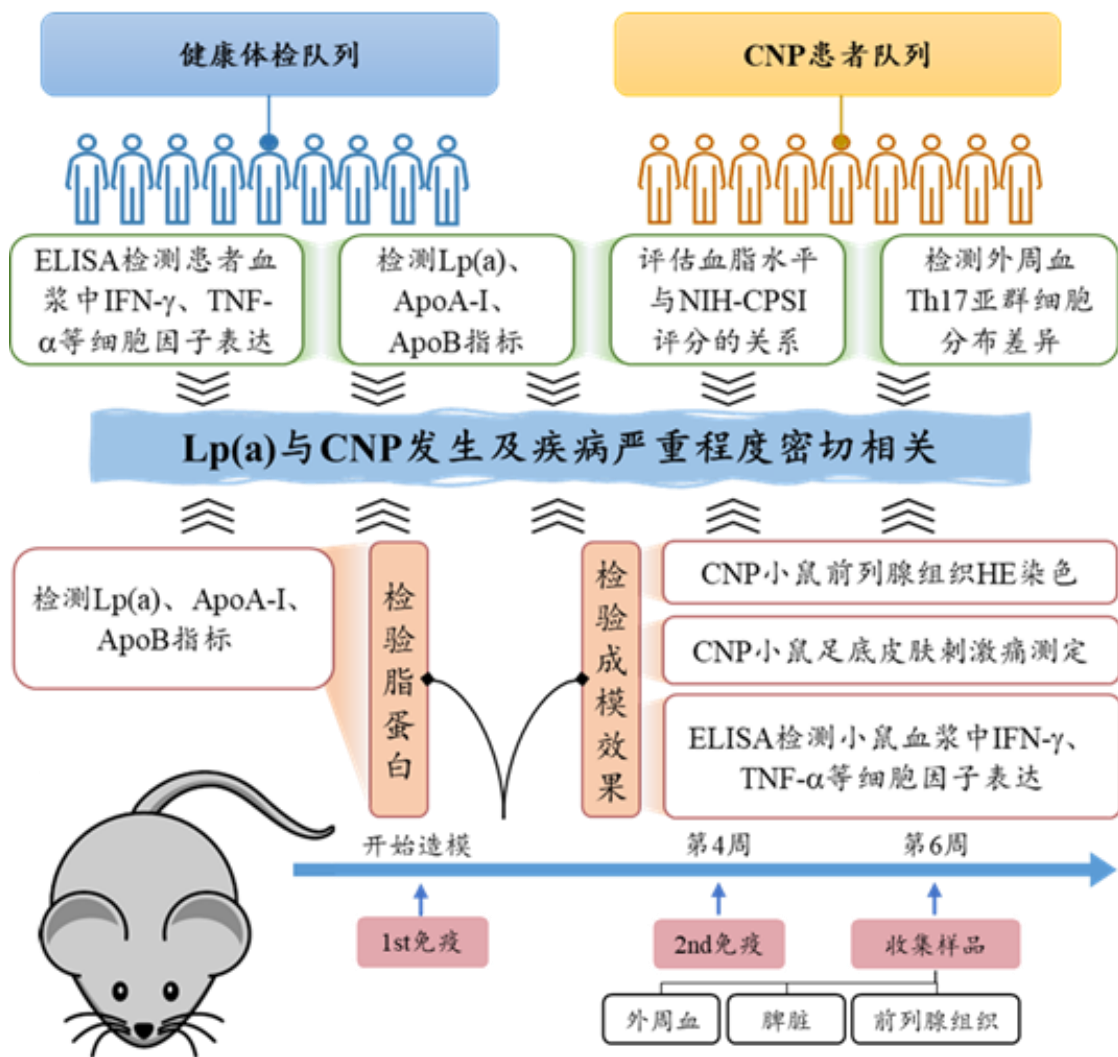
水平。

② 利用 LPA 敲除小鼠 ( $LPA^{-/-}$ ), 验证高脂饮食通过 Lp(a)加重 CNP 的机制: 选取  $LPA^{-/-}$ 小鼠, 分组设定为 CNP 组,  $LPA^{-/-}$ +CNP 组,  $LPA^{-/-}$ +高脂饮食+CNP 组, 检测各组小鼠前列腺组织炎症评分, 记录 Von Frey 机械刺痛阳性比例, 免疫荧光检测 M1 巨噬细胞标记物 CD68 及 iNOS, 检测外周血 Lp(a)水平。

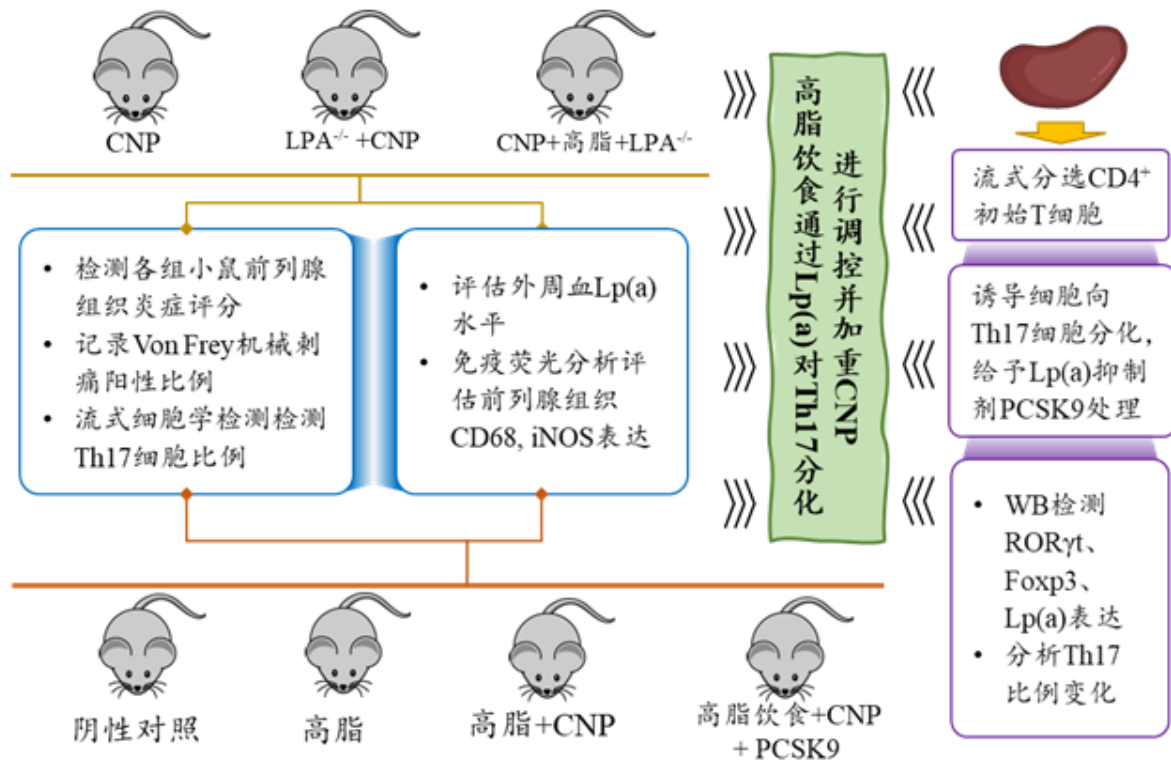
③ 获取小鼠 Raw264.7 单核细胞细胞系, 诱导分化为 M1 型巨噬细胞, 在 Lp(a)抑制剂 PCSK9 处理和不处理条件下, 检测 CD68 及 iNOS 表达差异。

### 三、技术路线图

技术路线图一: 明确 Lp(a)在 CNP 患者及健康对照中的差异, 揭示 Lp(a)的表达水平与 CNP 患者临床症状严重程度的关系



技术路线图二：阐明高脂饮食通过 Lp(a)对 M1 巨噬细胞分化的调控作用



## 五、预期目标

### 1、预期研究成果

(1) 拟通过本项目明确Lp(a)在CNP加重中的作用及机制；延续前期研究发现，利用Lp(a)抑制剂PCSK9确认其在CNP中的重要作用，并探索Lp(a)调控M1巨噬细胞分化的具体分子机制，为难治型CNP患者的药物研发提供新思路；

(2) 在高水平期刊上发表学术论文1篇，参加专科学术年会1次，联合培养硕士1名。

## 六、年度研究计划

说明项目进度，包括实施方案、实施地点、阶段性成果等内容

### 第一阶段：2023.01~2023.06

**阶段工作：明确Lp(a)在CNP患者及健康对照中的差异，揭示Lp(a)的表达水平与CNP患者临床症状严重程度之间的关系**

①在临床上收集排除CNP诊断的健康人，以及诊断为CNP的患者的外周血，评估了NIH-CPSI、IPSS评分，通过生化检查进一步确认了CNP患者外周血中Lp(a)的水平。

②我们将在临床上收集CNP的患者的外周血，并记录匹配的NIH-CPSI、IPSS评分，通过ELISA对患者的血液样本进行Lp(a)浓度检测，评估Lp(a)基因分型与CNP患者临床症状严重程度之间的关系。

③构建Lp(a)敲除小鼠，检测小鼠血浆中Lp(a)等指标的表达情况；ELISA检测各组小鼠血浆中IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 等细胞因子表达；通过HE染色各组小鼠前列腺组织判断炎症水平；通过盆腔疼痛测量判断小鼠CNP相关表型严重程度；检测小鼠前列腺组织中M1巨噬细胞生物标志物CD63、iNOS表达的情况。

### 第二阶段：2023.07~2024.06

**阶段工作：阐明高脂饮食通过Lp(a)对M1巨噬细胞分化的调控作用**

①利用Lp(a)抑制剂PCSK9，验证高脂饮食通过Lp(a)升高加重CNP的机制：选取Lp(a)特异性磷酸化抑制剂C188-9，分为阴性对照组，高脂饮食对照组，高脂饮食+CNP组，高脂饮食+CNP+PCSK9组，检测各组小鼠前列腺组织炎症评分表达，记录Von Frey机械刺痛阳性比例，免疫荧光检测M1巨噬细胞标记物CD68及iNOS，检测外周血Lp(a)水平。

②利用LPA敲除小鼠(LPA<sup>-/-</sup>)，验证高脂饮食通过Lp(a)加重CNP的机制：选取LPA<sup>-/-</sup>小鼠，分组设定为CNP组，LPA<sup>-/-</sup>+CNP组，LPA<sup>-/-</sup>+高脂饮食+CNP组，检测各组小鼠前列腺组织炎症评分，记录Von Frey机械刺痛阳性比例，免疫荧光检测M1巨噬细胞标记物CD68及iNOS，检测外周血Lp(a)水平。


③获取小鼠Raw264.7单核细胞细胞系，诱导分化为M1型巨噬细胞，在Lp(a)抑制剂PCSK9处理和不处理条件下，检测CD68及iNOS表达差异。

### 第三阶段：2024.07~2024.12

#### 阶段工作：整理相关实验数据，撰写论文，发表文章

- ① 整理各部分实验相关数据，串联起数据结果，规划实验结果故事逻辑。
- ② 完善论文 Introduction、Methods、Results、Conclusion 等部分内容书写。
- ③ 根据文章内容，筛选适合投稿的专科杂志，进行论文投稿。

七、依托单位学术委员会签章

学术委员会主任签字  学术委员会 (盖章)

年 月 日



八、所在单位党委对申请者的科研业绩、发展潜力、预期目标、工作表现、科研作风和意识形态等审查意见

单位 (盖章)

年 月 日

