

江苏省卫生健康委员会文件

苏卫科教〔2026〕3号

关于公布省卫生健康委 2025 年度医学科研 立项项目和医学引进新技术评估结果的通知

各设区市及昆山、泰兴、沭阳县(市)卫生健康委,各有关单位:

根据《关于组织开展省卫生健康委 2025 年度医学科研项目申报和医学引进新技术评估工作的通知》(苏卫科教〔2025〕9号)精神,按照委科研管理的程序和要求,在各地各单位遴选推荐的基础上,我委组织专家开展评审。根据专家评审结果,经公示无异议,确定南京市疾病预防控制中心丁洁的“基于组学技术探究发热伴血小板减少综合征(SFTS)重症机制及关键生物标志物研究”等 304 个项目为立项项目(附件 1);对东部战区总医院王忍等人完成的“儿童原发性膜性肾病精准诊疗及预后预测模型的研

究与应用”等 314 个医学引进新技术评估确定等次（附件 2）。

希望各项目依托单位高度重视医学科研工作，按规定落实项目研究配套经费，严格规范管理，并督促各项目负责人认真完成研究任务，积极推动科研成果转化应用。各级各类医疗卫生机构要高度重视医学新技术引进工作，加快安全、高效新技术的应用，进一步增强疾病防治能力，为推动全省卫生健康事业高质量发展提供科技支撑。

本次评审确认的所有项目，均需与我委签订《江苏省卫生健康委科研项目合同书》。合同书签订须登录“江苏省卫生健康委科研管理平台”（<https://kygl.jsehealth.com:8000/wskj/>）在线填报（网络开放时间为 2026 年 1 月 30 日—2 月 9 日），经我委审核通过后，打印含水印的正式合同书。纸质合同书一式四份于 2 月 28 日前寄送我委科教处（地址：南京市中央路 42 号）。

联系人：王舒心、王译辉，电话：025-83620706、83620512。

- 附件：1. 省卫生健康委 2025 年度医学科研立项项目
2. 省卫生健康委 2025 年度医学引进新技术评估结果

江苏省卫生健康委员会

2026 年 1 月 7 日

（信息公开形式：依申请公开）

11	基于超级增强子 RNA CASC15 介导的肝细胞铜稳态调控脂代谢重塑的 NAFLD 诊疗技术研发	苏北人民医院	王磊	重点项目
12	ZIF-H2S-SDSSD 骨靶向递送系统通过 VEGFR3/CXCL12 轴构建淋巴管-骨再生微环境促进骨质疏松骨折愈合新机制	东南大学附属中大医院	毛路	重点项目
13	关节内注射承载 Runx1 基因的 Exosome 对骨关节炎治疗作用机制及临床应用的研究	徐州医科大学附属医院	左韬	重点项目
14	替罗非班序贯双联抗血小板治疗对比双联抗血小板治疗轻型急性缺血性卒中患者的有效性和安全性研究：一项前瞻性、多中心、开放标签、随机对照临床试验	苏州大学附属第二医院	石际俊	重点项目
15	铜死亡诱导的肠屏障损伤触发 $\gamma\delta$ T 细胞炎症极化：炎症性肠病的新机制研究	苏州大学附属第一医院	石通国	重点项目
16	卵巢癌谱系特异性血浆标志物的筛选与应用	南京市妇幼保健院	叶春萍	重点项目
17	sgACC-脑岛双靶点时间干涉刺激治疗抑郁症自杀意念的随机对照试验：从临床疗效到脑磁源性机制	南京脑科医院（南京医科大学附属脑科医院）	史家波	重点项目
18	Akk-EVs 通过肠道菌群-FXR-胆汁酸-肝脏巨噬细胞重编程缓解胆汁淤积性肝损伤的作用机制	江苏省中西医结合医院(省中医药研究院)	朱粉霞	重点项目
19	中国心血管-肾脏-代谢（Cardiovascular-Kidney-Metabolic, CKM）疾病共病特点和管理现状的研究	东部战区总医院	任贵生	重点项目
20	白血病干细胞通过 NCAM1 驱动线粒体定向转移介导 AML 耐药的机制研究	苏州大学附属第一医院	刘天会	重点项目
21	腔镜下双侧肾动脉外膜交感神经射频消融术在难治性高血压治疗中的应用研究	苏州大学附属第二医院	刘晓龙	重点项目
22	儿童青少年肥胖全病程智能化管理模式构建与应用	南京市儿童医院	刘倩琦	重点项目
23	靶向 CAFs 来源 FSTL3 改善免疫微环境增敏结肠癌抗 PD-1 治疗的机制与转化研究	东南大学附属中大医院	刘琳	重点项目

104	淋巴内皮细胞经 IL-17D/CD93/p38 MAPK 信号轴抑制中性粒细胞跨内皮迁移促进骨关节炎进展的机制研究	南京医科大学附属口腔医院 (省口腔医院)	周薇娜	面上项目
105	继发于主动脉瓣返流的二尖瓣返流：成形环 vs. 经主动脉缘对缘？	南京市第一医院	项飞	面上项目
106	CASC9-FUS-HIF1A 代谢枢纽在食管鳞癌恶性进展中的功能与机制研究	东部战区总医院	胡力文	面上项目
107	新型靶向 TRADD 抑制剂抗缺血性脑卒中的作用及其分子机制研究	江苏卫生健康职业学院	秦爱萍	面上项目
108	基于多模态数据脑外伤的精准预后及智能决策研究	连云港市第一人民医院	顾艳	面上项目
109	血吸虫源 N-聚糖缀合物的化学酶法构建与免疫保护研究	江苏省血吸虫病防治研究所	晁强	面上项目
110	AI 辅助单粒子识别技术在肺部感染病原体快速识别中应用	江苏卫生健康职业学院	钱倩	面上项目
111	TI 干预老年认知障碍（记忆障碍）神经调控机制研究	江苏省省级机关医院	徐花	面上项目
112	ERV3-1 激活 TLR4 信号抑制 ARID1A 突变胃癌进展的分子机制及标志物研究	泰州市人民医院	徐娟	面上项目
113	线粒体 tRNA 修饰酶 MT01 缺陷致遗传性心肌病的分子机制及干预研究	南京市儿童医院	殷杰	面上项目
114	嗜酸性粒细胞在卒中后肺损伤中的作用及机制研究	苏州大学附属第二医院	郭志良	面上项目
115	三阴性乳腺癌代谢-黏度双轴协同调控机制及分子影像研究	江苏省妇幼保健院	唐玉霞	面上项目
116	CCL28 招募 Treg 细胞经乳酸代谢重编程构建肺腺癌免疫抑制微环境的机制研究	盐城市第一人民医院	陶累累	面上项目
117	基于肠道菌群-PPAR γ 轴探究黄藤素缓解放射性肠炎的作用及机制	连云港市东方医院	黄俊杰	面上项目
118	新型高毒力肺炎克雷伯菌的鉴定及减毒机制的研究	苏州大学附属儿童医院	黄莉莉	面上项目
119	载 HSPA12B 超声纳米液滴靶向内皮细胞 YAP/TEAD4 治疗糖尿病心肌病的机制研究	江苏省人民医院	曹小飞	面上项目

157	GMPS/USP7/N-myc 正反馈调控轴促进 MYCN 扩增型神经母细胞瘤谷氨酰胺依赖的机制研究	南京市儿童医院	陈吉	面上项目 (青年)
158	中药“脊髓康”通过 YAP/PKM2/P53 信号轴调控“中间态”星形胶质细胞重编程的机制研究	无锡市中医医院	邵阳	面上项目 (青年)
159	培美曲塞干扰胆碱-甲基循环介导卵巢氧化应激与卵母细胞功能障碍的作用及机制研究	南京市第二医院	和沁园	面上项目 (青年)
160	基于调节肿瘤代谢与铜死亡的 LDH 载药系统增强 18F-FDG 对宫颈癌的核素-免疫治疗的研究	南通大学附属医院	周海琳	面上项目 (青年)
161	丘脑中央外侧核在全身麻醉中的双向调节作用及神经环路机制研究	徐州医科大学附属医院	周康	面上项目 (青年)
162	基于人源 α -螺旋肽自组装构建新型共递送系统的研究	东南大学附属中大医院	赵峰峰	面上项目 (青年)
163	EP58 诱导 HCF1 糖基化异常促进结直肠癌发生的作用机制及靶向治疗研究	江苏省肿瘤医院 (省肿瘤防治研究所)	赵薇	面上项目 (青年)
164	基于 AI 与结构解析的大别班达病毒抗原表位筛选及纳米疫苗研究	江苏省疾病预防控制中心	荣恒	面上项目 (青年)
165	基于心血管-肾脏-代谢综合征框架的心血管风险动态评估工具的构建及其在心血管疾病防治中的应用研究	南京医科大学第二附属医院	相柏杨	面上项目 (青年)
166	基于多模态 MRI 探究双靶点 tDCS 调控大脑半球间网络功能重组模式改善脑卒中偏瘫手功能的结构基础研究	南京鼓楼医院	洪文军	面上项目 (青年)
167	异体 MSCs 抑制巨噬细胞-SPP1-FAP 轴调控椎旁肌异常发育在青少年特发性脊柱侧凸治疗中的作用机制研究	南京鼓楼医院	秦晓东	面上项目 (青年)
168	基于认知储备的真实生活场景任务训练对延缓老年 MHD 患者认知功能快速下降的影响研究	南京明基医院	夏宁宁	面上项目 (青年)

169	PSMD7 介导 TRAF6 去泛素化进而调控焦亡在动脉粥样硬化内皮细胞炎症中的机制研究	张家港市第一人民医院	徐心纯	面上项目 (青年)
170	核酸置换体系通过靶向清除 cfDNA 抗炎症性肠病的作用及机制研究	常州市第一人民医院	殷梦圆	面上项目 (青年)
171	SREBF2 介导胆固醇代谢紊乱通过干扰海马星形胶质细胞 GLT1 膜表达导致术后认知功能障碍的机制研究	江苏省妇幼保健院	黄河	面上项目 (青年)
172	巨噬细胞外泌体调控肾小管上皮细胞死亡及吞噬功能在急性肾损伤中的研究	南通大学附属医院	黄莉莉	面上项目 (青年)
173	基于非门控胸部增强 CT 的放射性心肌纤维化智能风险预警模型构建及应用	江苏大学附属医院	曹雄锋	面上项目 (青年)
174	基于 ONFH 血运递药物壁垒难题探索驱动淫羊藿分子马达 NO@BTNDs 保髓的优势作用和机制	江苏省中医院	常志泳	面上项目 (青年)
175	靶向 USP2-PKM2 轴调控代谢重编程防治糖尿病肾纤维化的应用研究	无锡市人民医院	崔思远	面上项目 (青年)
176	通过机器学习算法鉴定肾透明细胞癌的新特征生物标志物和免疫浸润谱	丹阳市人民医院	彭毅	面上项目 (青年)
177	葛根素靶向 APOC1 阻断 RHEB 泛素化修饰及 MDSCs 介导的肾透明细胞癌侵袭转移机制研究	苏州大学附属第一医院	蒋昊	面上项目 (青年)
178	萎缩骨骼肌外泌体介导静脉内皮细胞焦亡促进深静脉血栓形成的机制研究	宜兴市人民医院	蒋涛	面上项目 (青年)
179	基于可编程 MOF 纳米酶贴片的可穿戴葡萄糖传感与糖尿病创面治疗应用研究	连云港市第二人民医院	喻琨	面上项目 (青年)
180	铜掺杂生物玻璃递送系统通过肝-骨轴跨器官治疗肝性骨病的应用及机制探究	南京市儿童医院	解恩	面上项目 (青年)

密级：不涉密

江苏省卫生健康委科研项目合同书

项目编号：MQ2025032

项目名称：GMPS/USP7/N-myc 正反馈调控轴促进 MYCN 扩增型神经母细胞瘤谷氨酰胺依赖的机制研究

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：210008

项目负责人：陈吉 单位电话：025-52865820

电子邮箱：chenjinjuv@163.com 手机号码：15151873458

起止日期：2026-03-01 至 2029-02-28

结题时间：2029-12-31

江苏省卫生健康委员会制
二零二六年

MQ2025032



一、主要研究内容和预期的技术指标:

一、研究内容

1.1 明确 *GMPS* 在 *MYCN* 扩增型 NB 肿瘤组织、细胞系中的分布特点及预后相关性

1) 基于 GEO, ArrayExpress, TARGET 数据库, 对样本量大, 资料完整的队列根据 *MYCN* 扩增情况进行分组, 对转录组数据进行 WGCNA、差异基因分析、GO、KEGG、GSEA 富集分析等生物信息学分析。

2) 结合本中心收治的 NB 患儿的肿瘤标本及 NB 细胞系, 通过 qRT-PCR、Western Blot、FISH、IHC 等实验明确 *GMPS* 在 *MYCN* 扩增型及非扩增型 NB 中的表达差异, 分析 *GMPS* 与 NB 患儿预后的关系。

1.2 体外实验分析 *GMPS* 对 *MYCN* 扩增型 NB 生物学功能的影响

1) 采用慢病毒转染及 *GMPS* 选择性抑制剂调节 NB 细胞 (NB 细胞系及原代细胞) *GMPS* 的表达水平及蛋白功能, 通过 CCK8、Edu、克隆实验、Transwell、流式细胞检测等实验观



察 *GMPS* 对 NB 细胞增殖、迁移、侵袭功能的影响。

2) 通过提取原代 *MYCN* 扩增型 NB 细胞, 通过慢病毒转染及选择性抑制剂抑制 *GMPS* 的表达与功能, 通过 CCK8、Edu、克隆实验、Transwell、流式细胞检测等实验观察 *GMPS* 对 NB 细胞增殖、迁移、侵袭功能的影响。

3) 通过构建 [$^{15}\text{N}(\text{amide})$]-谷氨酰胺 (培养基中去除未标记氮元素的谷氨酰胺) 的完全培养基和 [$\text{U-}^{13}\text{C}_5$]-谷氨酰胺 (培养基中去除未标记碳元素的谷氨酰胺) 的完全培养基, 通过液相色谱法-质谱法技术及代谢组学分析 *GMPS* 敲低对肿瘤细胞谷氨酰胺中氮元素及碳元素的代谢路径的变化。

1.3 体外实验探究 *GMPS* 与 N-myc 正性反馈调控机制

1) 采用慢病毒转染及选择性抑制剂调节 NB 细胞 N-myc 的表达水平及蛋白功能, 结合生物信息学分析、Chip、荧光素酶报告基因等实验探究 N-myc 作为转录因子促进 *GMPS* 转录的机制。

2) 通过 Co-ip、Pull down、IFT、泛素化动力检测、选择性抑制剂干预等实验探究高表达的 *GMPS* 能通过活化 USP7 使 N-myc 去泛素化, 提高 N-myc 的稳定性。



3) 通过核质分离技术、Co-ip 及质谱分析技术分析 *GMPS* 在细胞核、细胞质中结合蛋白的差异性，并筛选潜在的影响 *GMPS* 入核的蛋白，主要集中于泛素化相关蛋白的筛选。

1.4 转基因小鼠模型探究 *GMPS* 在 *MYCN* 扩增型 NB 中的作用机制

1) 构建 TH-*MYCN*^{+/+} 转基因小鼠（该转基因小鼠为神经外胚层过表达 *MYCN* 的转基因小鼠，该小鼠能于脊柱旁神经嵴自然形成 NB），通过提取小鼠脊柱旁 NB 原代细胞，构建 *GMPS* 敲低稳转株，并通过 CCK8、Transwell 探讨 *GMPS* 对肿瘤细胞增殖、迁移及侵袭的影响。

2) 将 TH-*MYCN*^{+/+} 转基因小鼠与 *GMPS*^{f/f}(flox/flox) 转基因小鼠进行杂交，获取 TH-*MYCN*^{+/+}*GMPS*^{f/f} 转基因小鼠，再将其与 TH-creER 转基因小鼠杂交，获取目标转基因小鼠：TH-*MYCN*^{+/+}*GMPS*^{f/f}TH-creER（神经外胚层选择性敲除 *GMPS*、过表达 *MYCN* 的转基因小鼠），通过他莫昔芬（Tamoxifen, TAM）刺激及玉米油刺激（对照），从体内探讨 *GMPS* 对 NB 增殖能力及荷瘤小鼠总体生存率的影响。

3) TAM 及玉米油刺激 TH-*MYCN*^{+/+}*GMPS*^{f/f}TH-creER 小鼠及 TH-*MYCN*^{+/+}*GMPS*^{f/f} 小鼠，通过肿瘤组织取样，并进行



Western Blot 实验，分析 GMPS 与 N-myc 蛋白表达的相关性。

二、预期的技术指标:

2.1 阐明 *GMPS* 在 *MYCN* 扩增型 NB 中高表达，并且作为肿瘤的核心基因对肿瘤细胞的生物学功能具有重要作用。

2.2 在细胞水平阐明在 *MYCN* 扩增型 NB 中 *GMPS* 能通过 *GMPS/USP7/N-myc* 正反馈环路促进肿瘤谷氨酰胺依赖，从而促进肿瘤的发生发展。

2.3 发现在 *MYCN* 扩增型 NB 中高表达的 *GMPS* 蛋白由细胞质入细胞核的机制。

2.4 在转基因小鼠模型中证实 *GMPS* 促进 *MYCN* 扩增型 NB 的发生发展，并与 N-myc 之间存在正性调控的关系。



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：

一、年度研究计划：

本研究预计在3年内完成，具体研究计划如下：

2026.03-2027.02：研究方案的第一；部分第二部分

- 1) 生物信息学分析 *GMPS* 在 *MYCN* 扩增型 NB 中的分布特点；检测并分析临床样本及细胞系中 *GMPS* 表达情况。
- 2) 原代细胞培养，构建 *GMPS* 敲低细胞系及原代细胞，探究 *GMPS* 对 NB 细胞生物学功能的影响。
- 3) 完成 *GMPS* 对 *MYCN* 扩增型 NB 谷氨酰胺代谢机制的研究。

2027.03-2028.02：研究方案的第三部分、部分第二、第四部分

- 1) 完成德奎菌素干预 *MYCN* 扩增型 NB 相关细胞实验。
- 2) 完成 *GMPS* 与 N-myc 互作机制的研究。
- 3) 完成 *GMPS* 由 *MYCN* 扩增型 NB 细胞质入细胞核机制的研究。
- 4) 构建 TH-*MYCN*^{+/-} 转基因小鼠，*GMPS*^{fl} 转基因小鼠及 TH-



creER 小鼠。

2028.03-2029.02: 研究方案的部分第四部分

- 1) 提取 TH-MYCN^{+/-}转基因小鼠 NB 原代细胞, 并进行 GMPS 敲低逆转录病毒感染, 完成相关细胞实验。
- 2) 转基因小鼠杂交, 完成 TH-MYCN^{+/+}GMPS^{fl}及 TH-MYCN^{+/-}GMPS^{fl}TH-creER 小鼠的 TAM 及玉米油干预实验。
- 3) 数据分析, 论文撰写

二、年度达成目标及年度阶段成果:

2026.03-2027.02: 阐明 GMPS 在 MYCN 扩增型 NB 中高表达, 并且作为肿瘤的核心基因对肿瘤细胞的生物学功能具有重要作用。

2027.03-2028.02: 在细胞水平阐明在 MYCN 扩增型 NB 中 GMPS 能通过 GMPS/USP7/N-myc 正反馈环路促进肿瘤谷氨酰胺依赖, 从而促进肿瘤的发生发展。发现在 MYCN 扩增型 NB 中高表达的 GMPS 蛋白由细胞质入细胞核的机制。同时完成转基因小鼠构建。

2028.03-2029.02: 在转基因小鼠水平探讨 GMPS 对 MYCN 扩增型 NB 的促癌作用。

MQ2025032



三、研究方案、技术路线

第一部分: *GMPS* 在 *MYCN* 扩增型 NB 肿瘤组织、细胞中的分布特点及预后相关性

1. 生物信息学技术分析 GEO、ArrayExpress、TARGET 数据库

1) 对 GEO、ArrayExpress、TARGET 数据库中样本量大、数据完整的队列转录组数据进行过滤, 分析 *GMPS* 在 *MYCN* 扩增型及非扩增型 NB 中的分布特点。

2) 通过 WGCNA 算法对所有基因进行聚类, 进一步验证 *GMPS* 是否为 *MYCN* 扩增型 NB 核心基因模块中的核心基因。

3) 对 GSE28019 队列中的 24 株 NB 细胞系转录组数据进行分析, 判断 *GMPS* 在 *MYCN* 扩增型与非扩增型 NB 细胞系中表达是否有差异。

4) 对筛选获得的差异基因进行 GO、KEGG、GSEA 富集分析, 对 *GMPS* 所富集到的通路进行分析。

5) 通过各队列中 *GMPS* 的表达水平与 NB 患儿预后的情况进行



行 KM 生存分析。

2. *GMPS* 在 NB 肿瘤组织、细胞系中的表达水平分析

1) 在伦理审核通过的前提下对我院 2015-2022 年收集的 NB 组织进行分组，根据 FISH 结果分为 *MYCN* 扩增组及 *MYCN* 非扩增组，对所有组织进行 qRT-PCR 检测，分析 *GMPS* 在 *MYCN* 扩增型及非扩增型 NB 组织中的表达差异。

2) 对 NB 肿瘤组织的切片进行 *GMPS* 的 IHC 检测，分析 *GMPS* 蛋白在 *MYCN* 扩增型及非扩增型 NB 中的分布差异。

3) 获取 *MYCN* 扩增型 NB 肿瘤组织，行单细胞测序，进行肿瘤微环境的亚群分析，并进行 *GMPS* 的亚群定位。

4) 进一步扩大 NB 细胞系数量，并进行 qRT-PCR 及 Western Blot 检测，分析 *GMPS* 在 *MYCN* 扩增型及非扩增型 NB 细胞系中的分布差异。

第一部分技术路线:





第二部分：体外实验分析 *GMPS* 对 *MYCN* 扩增型 NB 生物学功能的影响

1. 通过 NB 细胞系探究 *GMPS* 对 *MYCN* 扩增型 NB 生物学功能的影响

1) 在 *MYCN* 扩增型 NB 细胞系中通过慢病毒感染构建 *GMPS* 敲低的稳转株，在 *MYCN* 非扩增型 NB 细胞系中通过慢病毒感染构建 *GMPS* 过表达的稳转株，并进行 qRT-PCR 及 Western Blot 验证。

2) 通过 CCK8、Edu 实验观察 *GMPS* 对 NB 细胞增殖能力的影响



响；通过克隆实验观察 *GMPS* 对 NB 细胞克隆的影响；通过 Transwell 实验观察 *GMPS* 对 NB 细胞迁移、侵袭能力的影响。流式细胞术结合 PI 单染、Annexin-V 双染检测细胞周期和凋亡情况。

3) 通过对所有 NB 细胞系进行不同浓度的德夸菌素干预，通过 CCK8 实验计算德夸菌素在各 NB 细胞系中的 IC_{50} 值，比较德夸菌素对 *MYCN* 扩增型及非扩增型 NB 细胞的抑制效果。

4) 对 *MYCN* 扩增型 NB 细胞系分别给予德夸菌素、PBS 缓冲液（对照组）干预，通过 CCK8、Edu、Transwell、克隆、流式周期、流式凋亡实验，比较细胞各功能变化。

2. *MYCN* 扩增型 NB 原代细胞中验证 *GMPS* 对 *MYCN* 扩增型 NB 生物学功能的影响

1) 提取 *MYCN* 扩增型 NB 原代细胞，通过慢病毒感染构建 *GMPS* 敲低的 *MYCN* 扩增型 NB 原代细胞，并进行 qRT-PCR 及 Western Blot 验证。

2) 通过 CCK8、Edu 实验观察 *GMPS* 对 NB 原代细胞增殖能力的影响；通过克隆实验观察 *GMPS* 对 NB 原代细胞克隆的影响；通过 Transwell 实验观察 *GMPS* 对 NB 原代细胞迁移、侵



袭能力的影响。流式细胞术结合 PI 单染、Annexin-V 双染检测细胞周期和凋亡情况。

3. 探究 *GMPS* 对 *MYCN* 扩增型 NB 细胞谷氨酰胺代谢的机制

1) 对 *MYCN* 扩增型 NB 细胞系给予德夸菌素、德夸菌素+鸟嘌呤核苷、PBS 缓冲液干预, 通过 CCK8 检测细胞增殖能力。

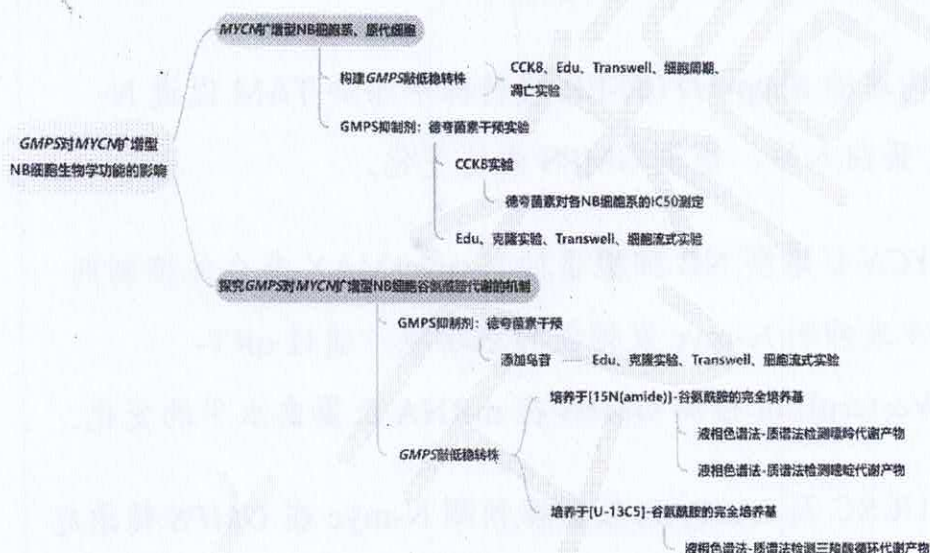
此步骤为说明德夸菌素通过抑制 *GMPS* 活性, 抑制了谷氨酰胺代谢为鸟苷, 从而抑制了细胞功能。

2) 构建 [$^{15}\text{N}(\text{amide})$]-谷氨酰胺 (培养基中去除未标记氮元素的谷氨酰胺) 的完全培养基, 将 *GMPS* 敲低及对照培养于该培养基中 16h, 提取细胞的代谢产物, 采用液相色谱法-质谱法技术测定谷氨酰胺代谢为嘌呤各中间产物: ADP, ATP, Adenine, Isoline, GMP, GDP, GTP, Guanine; 谷氨酰胺代谢为嘧啶各中间产物: UMP, UDP, UTP, CTP; 检测在 *GMPS* 敲低后每个代谢产物分子中 ^{15}N 原子所含个数的变化, 以及各代谢产物的变化。

3) 构建 [$\text{U-}^{13}\text{C}_5$]-谷氨酰胺 (培养基中去除未标记碳元素的谷氨酰胺) 的完全培养基, 将 *GMPS* 敲低及对照培养于该培养基中 16h, 提取细胞的代谢产物, 采用液相色谱法-质谱法技术

测定谷氨酰胺代谢在三羧酸循环中的代谢产物：Asparagine, Malate, Fumarate, Succinate, Proline, Glutamate; 检测 *GMPS* 敲低后每个代谢产物分子中 $^{13}\text{C}_5$ 原子所含个数的变化, 以及各代谢产物的变化。

第二部分技术路线:



[MISSING IMAGE: ,]

第三部分: *GMPS* 与 *N-myc* 互作机制的研究

1. *N-myc* 作为转录因子调控 *GMPS* mRNA 的表达

1) 在 *MYCN* 扩增型 NB 细胞系中通过质粒瞬转敲低 *MYCN* 的表达, 在 *MYCN* 非扩增型 NB 系中通过质粒瞬转过表达

MQ2025032



MYCN，并进行 qRT-PCR、WesternBlot 验证。

2) 在 *MYCN* 敲低、过表达后通过 qRT-PCR、WesternBlot 检测 *GMPS* mRNA 及蛋白水平的变化。

3) 对已构建的 Shep-*MYCN*-ER 稳转株中添加 TAM 促进 N-myc-ER 蛋白入核，检测 *GMPS* 表达变化。

4) 对 *MYCN* 扩增型 NB 细胞添加 N-myc-MAX 复合体抑制剂 10058-F4 来抑制 N-myc 发挥促转录功能，通过 qRT-PCR、WesternBlot 检测 *GMPS* 在 mRNA 及蛋白水平的变化。

5) 通过 UCSC 及 JASPAR 数据库预测 N-myc 在 *GMPS* 转录起始位点附近的结合位点，设计 DNA 引物。在 *MYCN* 扩增型 NB 细胞系中通过 Chip-pcr 实验验证 N-myc 是否在 *GMPS* 转录起始位点附近富集。

6) 对检测结果阳性位点的 qRT-PCR 产物进行琼脂糖 DNA 电泳，进一步证实 qRT-PCR 产物的特异性。

7) 根据上一步骤筛选获得的结合位点，设计包含结合位点、敲除该结合位点序列的质粒，转染 *MYCN* 扩增型细胞系，通过双荧光素酶报告基因实验，验证 N-myc 在该位点发挥促进



GMPS 转录的功能。

2. GMPS 可能通过活化 USP7 使 N-myc 去泛素化

2.1 GMPS、USP7、N-myc 之间能形成蛋白复合体

1) 分别用 GMPS、N-myc 抗体对 MYCN 扩增型 NB 细胞系进行 Co-ip 实验，并对结合的蛋白进行质谱分析，取交集获取潜在的 GMPS 作用于 N-myc 的中间蛋白 USP7（预实验已证实）。

2) 再次向 MYCN 扩增型 NB 细胞系中添加 GMPS 抗体，通过 Co-ip 及 Western Blot 实验证实 GMPS、USP7、N-myc 之间能形成蛋白复合体。

3) 通过 Pull down 实验验证 USP7 能够与 GMPS、N-myc 直接结合：设计 GST-USP7 融合的质粒并转染 BCL21 菌株，获取 GST 柱亲和纯化后的 GST-USP7 融合蛋白；将带有标签蛋白的 Flag-GMPS，His-MYCN 质粒转染 293T 工具细胞，获取细胞总蛋白；总蛋白与纯化的 GST-USP7 融合蛋白于谷胱甘肽树脂中 4℃ 孵育过夜，离心后将沉淀洗涤、洗脱，进行考马斯亮蓝检测及 Western Blot 检测。



2.2 GMPS 能活化 USP7 使 N-myc 去泛素化

- 1) 通过对 *GMPS* 敲低组、敲低对照组进行 MG132 干预, 通过 WesternBlot 检测观察 N-myc 蛋白在各分组中是否均受泛素化水平调控。
- 2) 通过对 *GMPS* 敲低组、敲低对照组进行放线菌酮 (CHX) 干预, 抑制细胞蛋白合成, 于干预后 0、5、10、20、40、60 分钟提取蛋白, Western Blot 检测 N-myc 表达变化, 通过绘制蛋白半衰期曲线获得各组中 N-myc 半衰期值, 比较各组中 N-myc 的稳定性。
- 3) 分别对 *GMPS* 敲低组、敲低对照组进行 Ub-AMC 去泛素化酶活性检测, 分析 *GMPS* 的表达改变对 USP7 活性的影响。
- 4) 分别对 *GMPS* 敲低组、敲低对照组进行 USP7 抑制剂 P5091 干预, 通过 WesternBlot 比较 N-myc 蛋白的表达情况。
- 5) 通过对 *GMPS* 敲低组、*GMPS* 敲低对照组进行泛素化质粒转染, 提取蛋白, 使用 N-myc 抗体对总蛋白进行 Co-ip 实验, 比较 *GMPS* 的改变对各组 N-myc 蛋白泛素化水平的影响。
- 6) 对 *GMPS* 敲低组、敲低对照组 N-myc 的靶基因进行 qRT-

PCR 检测及 Chip-seq 检测，观察 N-myc 下游靶基因表达情况及 N-myc 在靶基因转录起始位点富集变化。

3. GMPS 蛋白在 *MYCN* 扩增型 NB 中由细胞质入细胞核的机制研究

3.1 GMPS 在 *MYCN* 扩增型 NB 中的亚细胞定位

1) 通过免疫荧光实验对 *GMPS* 敲低组、对照组，*GMPS* 过表达组，对照组进行 *GMPS* 蛋白定位，比较 *GMPS* 在细胞核内的富集水平。

2) 通过核质分离及 Western Blot 比较 *GMPS* 敲低组、对照组中 *GMPS* 在细胞核中表达的差异性。

3.2 筛选在 *MYCN* 扩增型 NB 中协助 *GMPS* 入核的蛋白

1) 通过核质分离技术获取 *MYCN* 扩增型 NB 细胞质及细胞核蛋白，*GMPS* 抗体与细胞核蛋白及细胞质蛋白行 Co-ip 实验，并对结合的蛋白进行质谱分析，筛选潜在的 *GMPS* 入核的目标蛋白。

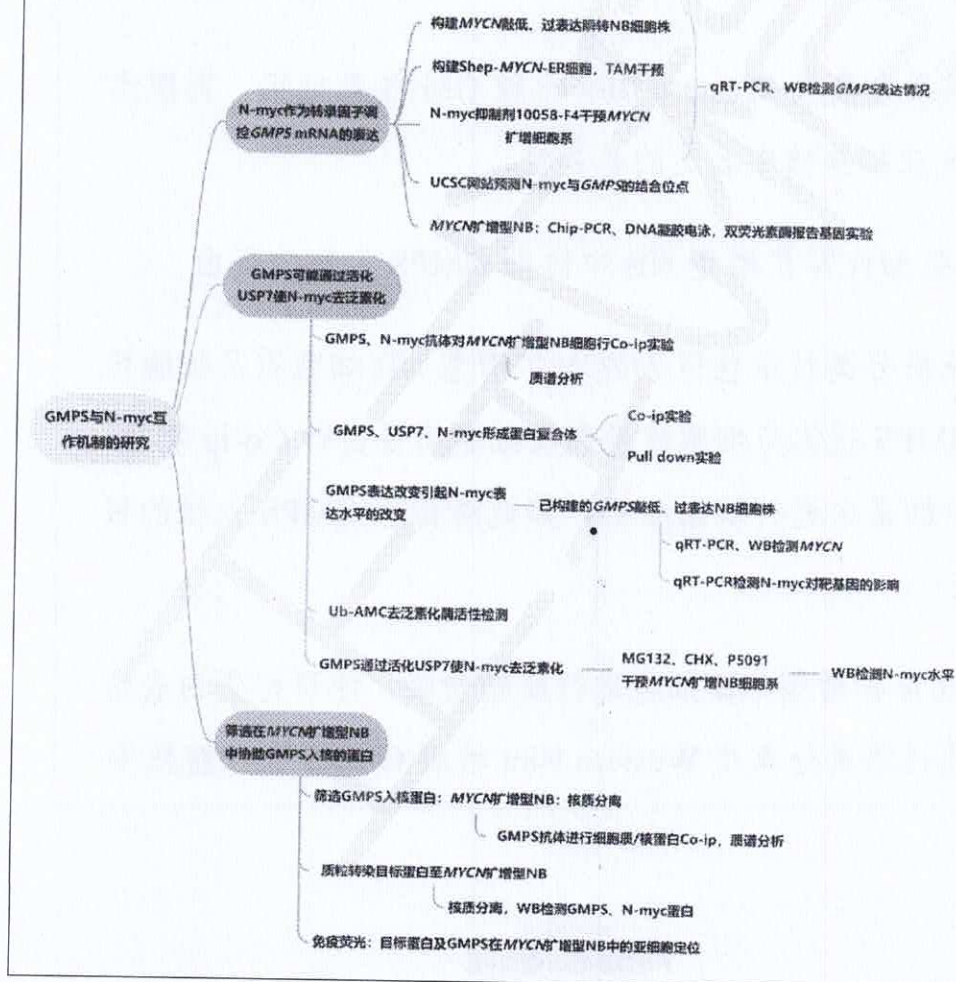
2) 对 *MYCN* 扩增型 NB 细胞进行质粒转染，使目标蛋白表达降低，通过核质分离及 Western Blot 检测 *GMPS* 在细胞核中



表达变化及 N-myc 蛋白整体水平变化。

3) 通过免疫荧光实验检测目标蛋白及 GMPS 在 MYCN 扩增型 NB 中的亚细胞定位；并通过 Co-ip 实验检测 GMPS 与目标蛋白能否形成蛋白复合体。

第三部分技术路线：



第四部分：转基因小鼠模型探究 *GMPS* 在 *MYCN* 扩增型 NB 中的作用机制

1. 构建目标转基因小鼠：

- 1) 分别构建神经外胚层高表达 *MYCN* 的 TH-*MYCN*^{+/-}转基因小鼠，*GMPS*^{ff}(flox/flox)转基因小鼠以及 TH-creER 转基因小鼠。
- 2) 将 TH-*MYCN*^{+/-}转基因小鼠与 *GMPS*^{ff}(flox/flox)转基因小鼠进行杂交，获取 TH-*MYCN*^{+/+}*GMPS*^{ff}转基因小鼠，再将其与 TH-creER 转基因小鼠杂交，获取目标转基因小鼠：TH-*MYCN*^{+/+}*GMPS*^{ff}TH-creER 小鼠。
- 3) 进行转基因小鼠鼠尾 DNA 鉴定，同时使用小鼠活体成像技术及解剖检测 TH-*MYCN*^{+/-}转基因小鼠 NB 成瘤情况。

2. TH-*MYCN*^{+/-}转基因小鼠 NB 验证 *GMPS* 的生物学作用：

- 1) 提取 TH-*MYCN*^{+/-}转基因小鼠 NB 肿瘤原代细胞，进行 *GMPS* 逆转录病毒转染，构建 *GMPS* 敲低稳转株。通过 CCK8、Edu、Transwell、细胞周期及凋亡实验分析 *GMPS* 对



小鼠 *MYCN* 扩增型 NB 细胞的生物学作用。

2) 对 *GMPS* 敲低组及对照组细胞进行鸟苷干预，观察细胞增殖、迁移及侵袭能力的变化。

3) 通过对已经成瘤的 TH-*MYCN*^{+/+} 转基因小鼠进行德夸菌素及玉米油（对照）干预，通过小鼠活体成像比较不同时间段小鼠肿瘤大小变化。

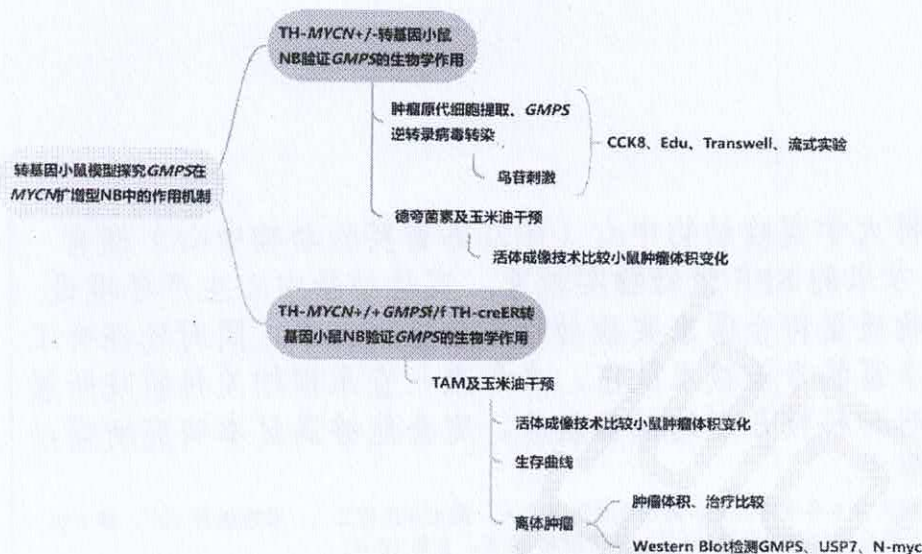
3. TH-*MYCN*^{+/+}*GMPS*^{f/f}TH-creER 转基因小鼠 NB 验证 *GMPS* 的生物学作用

1) 分别对获得的 TH-*MYCN*^{+/+}*GMPS*^{f/f} 及 TH-*MYCN*^{+/+}*GMPS*^{f/f}TH-creER 小鼠进行 TAM 及玉米油干预，小鼠活体成像实验分析不同组小鼠 NB 肿瘤生长情况、生存曲线差异。

2) 离体肿瘤，进行不同组别肿瘤体积、肿瘤重量比较；通过 Western Blot 比较不同组别肿瘤组织 *GMPS*、*USP7* 与 *N-myc* 蛋白的表达差异，并分析 *GMPS* 与 *N-myc* 蛋白表达的相关性。

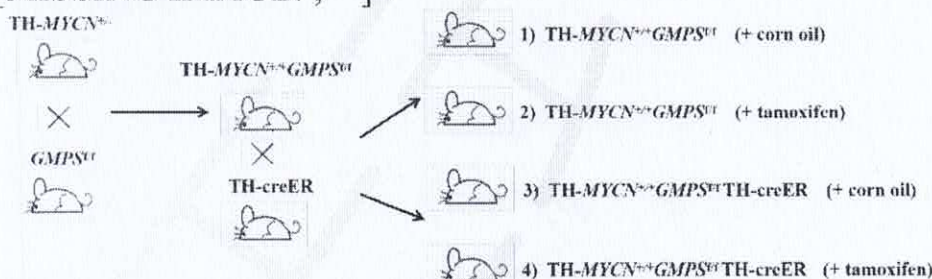
[MISSING IMAGE: ,]

第四部分技术路线：



第四部分转基因小鼠构建:

[MISSING IMAGE: ,]



四、研究地点、规模:

1. 研究地点: 本课题组依托南京儿童医院重点实验室及南京医科大学, 拥有细胞培养室、蛋白质组学实验室、分子生物学实验室、免疫组化实验室等, 具备本课题研究所需各种仪器设备, 如: 计算机图像分析系统、超低温冰箱、免疫荧光显微镜、激光共聚焦显微镜、CO₂ 孵箱、凝胶成像仪等, 硬件设施能够保证顺利完成本课题。



南京医科大学实验动物中心（即江苏省实验动物中心）拥有 1100 平方米的 SPF 级动物实验室，实验动物中心生产环境设施及动物质量符合国家实验动物质量标准要求，同时还拥有工作经验丰富的专业技术队伍，多年来一直承担相关科研院所教学、科研和科技开发的动物供应，完全能够满足本研究所需动物实验要求。

2. 规模：本研究共 6 名参与人员，其中主任医师 2 人，副主任医师 2 人，住院医师 1 人，博士研究生 1 人；本研究总计申请经费 20 万，申请拨款 10 万，自筹 10 万；其中第一年投入 50%；第二年投入 25%；第三年投入 25%。



三、预期达到的技术经济效益和社会效益:

本研究聚焦于NB中最具挑战性的MYCN扩增亚型,旨在揭示GMPS与N-myc之间的正反馈调控机制及其促癌作用。若研究取得预期成果,不仅将深化对该疾病生物学机制的理解,更将产生显著的经济效益与社会效益。

经济效益方面,本研究为开发新型靶向药物提供了明确的候选靶点(GMPS-USP7-N-myc轴)。目前针对N-myc蛋白直接靶向困难,本研究通过阐明其上游调控与稳定机制,为开发间接抑制N-myc活性的治疗策略(如GMPS或USP7抑制剂)奠定了坚实的理论基础。一旦基于此机制的药物进入临床转化阶段,将有望打破MYCN扩增型NB缺乏有效靶向药物的困境,创造巨大的市场价值。此外,GMPS作为潜在的预后生物标志物,其应用可助力实现更精准的患者分层管理,避免过度治疗或治疗不足,从而优化医疗资源配置,从整体上降低社会医疗成本。长远来看,该研究积累的知识产权(如靶点专利、诊断方法)也将形成核心竞争力,推动生物医药产业的创新发展。

社会效益方面,其影响更为深远。神经母细胞瘤是儿童最常见的颅外实体瘤,高危患儿尤其是MYCN扩增型患儿的预后极差,对家庭和社会造成沉重负担。本研究直接针对这一临床最紧迫的难题,其成果有望转化为更有效的治疗手段,直接提高这部分患儿的生存率与生活质量,挽救无数幼小生命,减轻无数家庭的精神痛苦与经济压力。同时,研究揭示的“转录激活-蛋白去泛素化”正反馈环路,是对癌基因调控理论的丰富,也可能为其他涉及MYC家族癌蛋白的肿瘤研究提供新思路,具有重要的科学价值。最终,该研究将为我国在儿童肿瘤精准医疗领域占据国际前沿地位贡献力量,体现科技发展服务于人民健康的重要宗旨。

综上所述,本研究的实施兼具重要的科学前瞻性与临床转化潜力,预期能在提升医疗水平、促进产业发展、保障儿童健康福祉等方面产生综合而积极的效益。

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	独立完成	20	陈东 孙梦娇 黄磊 刘

陈东 孙梦娇 黄磊 刘



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
20	10	0	10	0	0

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



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	19
1、设备费	0
2、业务费	17
3、劳务费	2
二、间接费用	1
10、管理费	1
11、绩效考核支出	0
合计	20



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)一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)一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):

承担单位 (乙方): 南京市儿童医院

开户银行: 农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):

项目负责人 (签章):

陈东

保证单位 (丙方): 南京市卫健委

法定代表人或委托代理人 (签章): 王倩

M02025032



附件信息

附件名称

陈吉

