项目编号：2018TD-003

管理类别：项目类

项目类别：创新人才推进计划-科技创新团队

陕西省创新能力支撑计划

项目合同书

项目名称：胃癌前病变发生机制与诊治创新团队

牵头单位：中国人民解放军第四军医大学　　（盖章）

团队带头人：时永全　　电子邮箱：shiyguan@fmmu.edu.cn

手机号码：15829302158　　联系电话：029-84771515

团队联系人：黄同列　　电子邮箱：huangtonglie@163.com

手机号码：18691862952　　联系电话：029-84774196

委托单位：陕西省科学技术厅

推荐部门：陕西省卫生和计划生育委员会

起止年限：2018年01月01日 至 2020年12月31日

陕西省科学技术厅 制

填写说明

1、合同书通过“陕西省科技业务综合管理系统”，按照系统提示在线填写。

2、本合同书所列内容应实事求是填写，表达上要明确、严谨。

3．团队名称以“研究方向+创新团队”命名，文字尽量精简。

4．合同书中的各项规划应涵盖一个建设周期（3年），建设进度安排要根据主要任务和目标合理安排。各阶段的任务目标是年度（中期）检查的依据。

5．合同书中“注册类型”一栏应注明本单位属于高校、院所、除高校院所以外的其他事业单位或企业中的哪一类。如为企业应注明是否为国家创新型企业、省创新型企业或经认定的高新技术企业。

6．项目申请书是本合同书填报的重要依据，合同书填报不得降低考核指标，不得自行对主要研究内容作大的调整。项目申请书和本合同书将共同作为项目过程管理、验收和监督评估的重要依据。

7、本合同书要求提供创新团队内部各组成单位（人员）之间的协议作为本合同书的附件，需对原件进行扫描后在线提交。

8、项目预算表和预算科目

一、直接费用：直接费用是指在课题研究开发过程中发生的与之直接相关的费用，主要包括设备费、材料费、测试化验加工费、燃料动力费、差旅费、会议费、国际合作与交流费、出版/文献/信息传播/知识产权事务费、劳务费、专家咨询费和其他支出等。

（1）设备费：指项目实施过程中必需购置的专用仪器设备，对现有仪器设备进行升级改造，以及租赁外单位仪器设备而发生的费用。

（2）材料费：指科技项目研究开发或科技创新体系建设过程中所支付的原材料、燃料动力、低值易耗品等的采购及运输、装卸、整理等费用。专项经费不支持购买生产经营性材料、基建材料、普通办公材料。

（3）测试化验加工费：指项目实施过程中支付给外单位（包括项目承担单位内部独立经济核算单位）的试验、加工、测试、化验等费用。单项预算在5万元以上的测试化验加工项目，要重点说明与研究任务的相关性、必要性，以及选择测试化验加工单位的理由，次数、价格等测算依据。其他测试化验加工项目可结合课题研究任务进行合并说明。

（4）燃料动力费：是指在课题研究开发过程中相关大型仪器设备、专用科学装置等运行发生的可以单独计量的水、电、气、燃料消耗费用等。

（5）差旅费：指在科技项目研究开发或科技创新体系建设过程中，为科技项目研究开发或科技创新体系建设而进行国内调研考察、现场试验、学术交流等工作所发生的交通、住宿等费用。出境（含港澳台）差旅费只能通过申请国际科技合作与交流计划项目列支。

（6）会议费：指科技项目研究开发或科技创新体系建设过程中为组织开展学术研讨、咨询以及协调项目等活动而发生的会议费用。

（7）国际合作与交流费：是指在课题研究开发过程中课题研究人员出国及外国专家来华工作的费用。国际合作与交流费应当严格执行国家外事经费管理的有关规定。不同的国家的补助标准不一样，请参考目的地国家具体补助标准。

（8）信息费：指科技项目研究开发或科技创新体系建设过程中发生的信息检索费、著作出版印刷费、专用软件购买、论文版面费、数据调查费、专业通信费、知识产权事务费等。

（9）专家咨询费：指项目研究开发过程中支付给临时聘请的咨询专家的费用。

（10）劳务费：参与项目研究的研究生、博士后、访问学者以及项目聘用的研究人员、科研辅助人员等，均可开支劳务费。项目聘用人员的劳务费开支标准，参照当地科学研究和技术服务业从业人员平均工资水平，根据其在项目研究中承担的工作任务确定，其社会保险补助纳入劳务费科目列支。劳务费预算不设比例限制，由项目承担单位和科研人员据实编制。

（11）其他支出：指除上述费用之外与科技项目研究开发或科技创新体系建设有关的其他费用，需写具体费用名称。

二、间接费用：是指承担课题任务的单位在组织实施课题过程中发生的无法在直接费用中列支的相关费用。主要包括承担课题任务的单位为课题研究提供的现有仪器设备及房屋，水、电、气、暖消耗，有关管理费用的补助支出，以及绩效支出等。间接费用使用分段超额累退比例法计算并实行总额控制，按照不超过课题经费中直接费用扣除设备购置费后的一定比例核定，具体比例如下：

500万元及以下部分不超过25%；

超过500万元至1000万元的部分不超过15%；

超过1000万元的部分不超过13%。

（1）管理费：指科技项目承担单位及受托管理单位为组织管理科技项目而支出的相关费用。包括现有仪器设备和房屋使用费或折旧、直接管理人员费用和其他相关管理支出。

（2）绩效支出：是指承担课题任务的单位为提高科研工作绩效安排的相关支出。加大对科研人员的激励力度，取消绩效支出比例限制。

甲方：陕西省科学技术厅委托乙方（牵头单位、团队带头人）：中国人民解放军第四军医大学，丙方(团队带头人)时永全,建设管理胃癌前病变发生机制与诊治创新团队创新团队，（项目编号：2018TD-003，根据我国有关法律、法规和《陕西省科技计划管理暂行办法》的有关规定要求，经双方协商，一致同意以下条款：

一、团队基本情况

团队名称	胃癌前病变发生机制与诊治创新团队		
研究方向	胃癌前病变		
经济行业领域	卫生和社会工作-卫生-医院		
学科名称1	胃肠病学320.2425	学科名称2	肿瘤病因学320.6720
学科名称3			
本期建设开始时间	2018-01-01	本期建设结束时间	2020-12-31
1、组成单位基本情况			
组成单位（家）	1	其中参与单位(家)	0
参与单位	单位名称		单位性质
2、牵头单位信息			
单位名称	中国人民解放军第四军医大学	单位性质	高校()
单位特性	省技术转移示范机构		
注册类型	全额事业单位（如高等院校等）	单位法人	周先志
单位地址	陕西省西安市长乐西路169号	邮政编码	710032
联系人信息			
姓名	黄同列	手机号码	18691862952
联系电话	029-84774196	传真	029-84774196
电子邮箱	huangtonglie@163.com		

3、团队人员结构基本情况

总人数	11	核心成员人数	5	45岁以下核心成员	3
				牵头单位核心成员	5
正高	1			副高	5
中级	5			其他	0
博士	11			硕士	0
学士	0			其他	0
国家级人才计划入选者	1			省级人才计划入选者	1

4、团队带头人基本情况

姓名	时永全	性别	男	出生日期	1973-11-03		
政治面貌	中共党员	籍贯	河南上蔡	民族	汉族		
证件类型	身份证	证件号码	[redacted]				
学历	博士研究生	学位	博士				
毕业学校	中国人民解放军第四军医大学			专业	内科学		
所在具体单位（院、系、所、实验室、中心）		第四军医大学第一附属医院消化内科					
现从事专业		内科学		从事时间		1996-07-01	
专业技术职务		主任医师		行政职务		教授	
联系电话		029-84771515		传 真		029-82539041	
手机号码		15829302158		电子邮箱		shiyquan@fmmu.edu.cn	
通讯地址		陕西省西安市长乐西路127号西京消化病医院		邮政编码		710032	

5、团队核心成员基本情况

姓 名	性别	出生年月	证件类型	证件号码	学历/学位	职务/职称	现从事专业或研究方向	所在单位
张德新	男	1966-11-29	身份证	[redacted]	博士博士博士博士/博士	无/副主任医师	胃肠道肿瘤	第四军医大学第一附属医院消化内科
幺立萍	女	1971-08-10	身份证	[redacted]	博士博士博士博士/博士	无/副主任医师	肿瘤血管生成机制研究及肿瘤分子影像研究	第四军医大学第一附属医院消化内科
帖君	男	1976-08-11	身份证	[redacted]	博士博士博士博士/博士博士	无/副主任医师	消化系肿瘤的分子机制	第四军医大学第一附属医院消化内科
梁树辉	男	1976-08-16	身份证	[redacted]	博士博士博士博士/博士博士	无/副主任医师	胃癌血管生成和多药耐药的机制及治疗新方法	第四军医大学第一附属医院消化内科
陈瑜	女	1979-02-26	身份证	[redacted]	博士博士/博士	无/副教授	肿瘤与免疫	第四军医大学第一附属医院消化内科

6、依托载体情况					
项目类别	级别 （国家级、省级）	名称	归属单位	批准部门	批准日期
重点实验室	国家级	肿瘤生物学国家重点实验室	第四军医大学	科技部	2005-03-22
重点学科	国家级	内科学（消化系病）	第四军医大学	教育部	2002-01-01
工程技术研究中心					
企业技术中心					
人文社科研究基地					
博士后科研流动（工作）站					
重点建设工程					
博士点、硕士点					
知名品牌 （驰名商标）					
其他创新载体					

7、团队基本情况综述，包括团队形成背景，团队成员合作意愿及方式、运行机制，团队结构及科研条件建设情况等。

我国是胃癌高发大国，，在所有恶性肿瘤中居第二位，在消化道肿瘤中居第一位。胃癌的5年总生存率低于30%，死亡率在所有癌症死亡率中高居第二位，严重威胁着人民的生命健康。胃癌的早期干预对于改善胃癌的整体防治水平至关重要。除了积极进行胃癌的血清学和内镜下筛查，将胃癌的防治重点前移，重点针对癌前病变的发生及其向胃癌演变的过程进行干预，理论上可更为有效防治胃癌。基于此观念，团队带头人以胃癌前病变及其发生发展机制为切入点，在国家自然科学基金的系列资助下（81270413，81470805），阐明了胃癌前病变发生发展的关键分子机制，同时还在“973”课题（2010CB732405）的资助下，针对胃癌早期诊断和预警体系进行了深入研究。在上述研究不断推进深化的过程中，不断吸纳团队内的核心成员及其他成员，以共同参与科研项目和完成临床工作为基础，凝练方向，逐步建立了该团队。

团队实行课题任务为导向的责任制度，核心成员作为课题负责人，与项目带头人签订合作协议，形成交叉互补的合作关系。项目所产生的研究成果，经每个项目组审核后可进行论文发表、课题申请、专利申报等。

团队成员年龄结构合理，团队依托单位为肿瘤生物学国家重点实验室（2005）和国家临床医学（消化病）研究中心（2014），隶属于第四军医大学西京消化病医院，连续七年全国学科排名第一。2014年被世界消化学会批准为医师培训中心（WGO Xijing Training Center），近十年来实验室先后承担了国家“973”项目、国家“863”课题、国家十三五重点研发计划项目、国家自然科学基金重大项目、重大仪器项目、重点项目和面上项目。实验室总面积3300平方米，内设分子生物学实验室、蛋白组学实验室、基因芯片实验室、形态学实验室、载体室、细胞培养室、P2病毒载体细胞培养室、单克隆抗体室、同位素实验室等。其中建立的消化系统疾病生物样本库达到1万（例，人），样本总量18.5万人份，固定资产价值3500余万元。

二、团队建设计划

1．今后三年主要研究方向，研究内容及创新点。重点阐述开展的研究对依托单位发展的作用（学科带动、科研水平提升、队伍建设等）；对完成国家、省级重大战略任务，提升相关领域科技创新能力和竞争力的意义。
研究方向： 胃癌前病变发生机制与诊治 研究内容： 1. 肠上皮化生发生发展的关键分子机制； 2. 慢性炎症信号影响肠上皮化生的机制； 3. 核受体作为肠上皮化生治疗靶点的探索研究； 4. 胃癌前病变队列建设； 5. 早期胃癌队列建设； 6. 多中心临床样本验证和评价研究。 创新点： 1. 提出以肠化生为关口进行胃癌预防的策略是本项目的重要创新。 我们基于对胃癌的长期研究和文献报道提出，肠化生是胃癌发生的重要阶段，也是胃癌发生的重要危险因素，即使胃癌的致病因素如幽[illegible]针对肠化生进行治疗，逆转肠化生或者阻断肠化生的[illegible]于真正符合了我国提出的肿瘤防治“关口前移”，也[illegible] 2. 结合疾病队列建设及[illegible] 队列的建设关乎整个研[illegible]的转化意义及临床应用价值，上述两者决定了项目是[illegible]础研究工作，突出研究原创性和创新性的同时，积极[illegible]结合的突出特色。这一项目特色及创新点符合医学研[illegible] 对依托单位发展的作用 项目的研究方向及内容[illegible]合国家消化系病临床医学研究中心的建设要求。依托[illegible]目将胃癌防治重点前移至癌前病变，是对学科既往研[illegible]项目的开展有利于团队成员，尤其是青年人才的成[illegible]构合理的人才梯队。 项目依托单位目前承担[illegible]重点为大型胃癌队列的建设及标志物临床验证及转化[illegible]生发展的重要阶段，其队列的建设符合胃癌队列建设[illegible]变过程伴随重要分子事件的改变，其中的关键分子可[illegible]目的成果可与标志物的临床验证研究相整合，与现有[illegible]

2、主要研发项目规划。（重点阐述今后三年内拟开展的创新项目、预期成果，应注重规划的系统性和时间节点）

起止年月	计划进度
2018年01月01日 至 2018年12月31日	本项目共包含6个课题：1. 肠上皮化生发生发展的关键分子机制；2. 慢性炎症信号影响肠上皮化生的机制；3. 核受体作为肠上皮化生治疗靶点的探索研究；4. 胃癌前病变队列建设；5. 早期胃癌队列建设；6. 多中心临床样本验证和评价研究。每个课题在研究的逻辑上存在密切的内在联系，但研究内容是保持相对较高的独立性。因此，课题在项目开展期间是并齐开展的关系，而无严格的先后开展顺序。按照课题进展难度的预估评价，可按照年度对预期成果做合理的规划。 本阶段主要项目开展内容：通过体外细胞模型及模式动物研究核受体对肠上皮化生的调节作用及作用机制，以多种动物模型（Hp诱导的IM小鼠模型、DMP-777和L635诱导的IM小鼠模型、胃粘膜组织特异性FXR转基因小鼠和胃粘膜组织特异性HNF4α转基因小鼠）。应用核受体阻断剂，观察对上述四种小鼠胃粘膜上皮化生的治疗效果。 预期成果： 阐明核受体调节肠上皮化生的分子机制；明确核受体作为癌前病变干预靶标的可行性。
2019年01月01日 至 2019年12月31日	本阶段主要项目开展内容：利用[illegible]感染制造炎症反应信号，诱导胃上皮细胞，观察细胞特性变化，肠上皮化生相关标志物改变以及核受体的表达变化；观察炎症信号对核受体的[illegible]作用，并通过报告基因实验、CHIP、EMSA等明确CDX2与FXR或HNF4α基因启动子的结合。建立胃癌前病变及早期胃癌的队列，同时完善匹配生物样本库。 预期成果：阐明慢性炎症诱导胃上皮发生肠化生的机制，获得1-2个关键分子及相关通路；初步建立一定规模的胃癌前病变和早期胃癌的研究队列。
2020年01月01日 至 2020年12月31日	本阶段主要项目开展内容：依托已经建成的胃癌前病变和早期胃癌的临床队列和生物样本资源，开展多中心的大规模临床验证和回顾性研究。 预期成果：完成多中心临床样本的验证评价工作，获得1-2个可用于诊断胃癌前病变的标志物和治疗靶标。

3、人才培养规划。（依托研发项目，分别阐述对带头人、核心成员、其他成员三个层次的培养计划，培养期前后要形成对比关系）

成员类别	姓名	培养期前	培养期后
团队带头人	[illegible]	2014年获陕西省中青年科技创新领军人才、2015年入选科技部中青年科技创新领军人才、2016年入选国家第二批"万人计划"领军人才。目前兼任中华医学会消化病学分会委员，消化肿瘤协作组候任组长、中华医学会内科学分会青年委员会副主委、中国医师协会消化内镜医师专委会委员	发表5-10篇较高影响力的研究论文（IF>5），新增1-2项省内学术任职，1-2项全国学术任职，力争新增1项国际学术任职；申获国家级课题1-2项。
核心成员	张德新、幺立萍、帖君、梁树辉、陈瑜	5名核心成员均为副主任医师/副教授。	1.积极选拔有实力有潜力的中青年学术骨干予以重点培养，力争三年后新晋升教授1-2人。2. 选派核心成员赴海外高水平大学进行业务培训，并积极开展国际合作研究。3. 力争主持承担国家自然科学基金面上项目2-4项，发表10分以上SCI论文1篇，5分以上SCI论文3-5篇，提升团队整体科研 水平。4. 力求通过本项目建设，新增国家级人才支持计划1名，陕西省人才计划1-3名，新增国家或省部级学术组织任职1-3项，使团队成员整体达到国内名列前茅、国际知名的先进水准。

其他成员	郭长存、韩霜、尚玉龙、赵晓迪、吴琼	5名其他成员均为主治医师/讲师。	1. 选派优秀骨干赴海外高水平研究机构进行业务培训，加强研究生国外访学与交流，同时也扩大本团队在国际上的学术影响。2.力争三年后新晋升副教授1-2人。3. 力争主持承担国家自然科学基金面上项目2-4项，发表10分以上SCI论文1篇，5分以上SCI论文3-5篇。4. 力争新增国家级或省级学术组织任职2-4项。

4、各合作方或团队成员协作规划。（重点阐述在开展上述科研项目时，各合作方或团队成员拟承担的角色和发挥的作用）

团队带头人
负责把握项目的整体方向和开展，同时主要负责组织开展“肠上皮化生发生发展的关键分子机制”课题的研究工作；
团队核心成员
帖君，负责“慢性炎症信号影响肠上皮化生的机制”课题的研究工作；
陈瑜，负责“核受体作为肠上皮化生治疗靶点的探索研究”课题的研究工作；
张德新，负责“胃癌前病变队列建设”课题的研究工作；
幺立萍，负责“早期胃癌队列建设”课题的研究工作；
梁树辉，负责“多中心临床样本验证和评价研究”课题的研究工作。
团队其他成员
按照项目开展需求，配合各课题负责人开展相应工作。
项目的开展以团队带头人为总负责人，实行课题分层的负责制。由带头人把握全局，制定宏观研究计划，定期组织项目讨论会，协调成果总结。核心人员及其他组成人员负责各课题的具体实施。

5、依托单位对推荐团队建设和培养所提供的保障措施及落实计划（包括岗位设置、人才培养、科研场所、实验平台、经费投入、项目倾斜等）

1. 科研配套经费：对团队带头人每年给予相应的科研配套资助经费，列入学校经费预算，保证落实。同时，优先支持、积极协助申报国家、省部各类课题，确保带头人团队有充足的经费开展科研工作，完成科研计划。
2. 实验室建设：加大对团队科研场所、实验平台的投入，学校将投入100万元专门用于研究平台建设和完善，进一步改善实验条件，满足开展创新研究的需要。
3. 人才培养：加强团队人才梯队建设，在人员选调、研究生招生等方面给予较大自主权，优先选调优秀青年骨干充实团队。学校对团队成员在出国交流等方面给予大力支持，促进团队的进一步发展和完善。

三、项目经费情况

项目总投资（万元）	200.00	已完成投资（万元）	0.00
计划新增投资（万元）	200.00	省级资助经费（万元）	80.00

已完成投资来源（万元）

合计	单位自筹	银行贷款	政府资助			其他来源
			国家	省级	市级	
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

计划新增投资来源（万元）

合计	单位自筹	银行贷款	政府资助			其他来源
			国家	省级	市级	
200.00	120.00	0.00	0.00	80.00	0.00	0

计划新增投资支出情况（万元）

支出科目	新增投资总额	省级资助经费	说明
一、直接费用	184.00	64.00	\
1、设备费	120.00	0.00	\
（1）购置设备费	120.00	0	添置小型仪器及配套设施
（2）试制设备费	0	0	
（3）设备改造与租赁	0	0	
2、材料费	40.91	40.91	实验用各类试剂、实验动物等
3、测试化验加工费	6.00	6.00	测序、芯片及分子生物学检测等
4、燃料动力费	0	0	
5、差旅费	1.04	1.04	国内学术会议注册等
6、会议费	0	0	
7、国际合作与交流费	0	0	
8、信息费（出版/文献/信息传播/知识产权事物费等）	8.85	8.85	论文发表出版费等
9、专家咨询费	1.20	1.20	聘请高职专家及技术人员咨询
10、劳务费	6.00	6.00	参与项目人员劳务费
11、其他支出	0	0	
二、间接费用	16.00	16.00	\
1、管理费	6.40	6.40	用于依托单位管理费用支出
2、绩效支出	9.60	9.60	项目绩效支出
合计	200.00	80.00	\

单位财务部门（盖章） 年　　月　　日

备注：此表须经本单位财务部门审核并盖章。

四、项目绩效目标

一级指标类别	二级指标类别	明细指标	预期绩效目标
产出类指标	知识产权	1、专利申请数（项）	8
		（1）申请发明专利	4
		（2）实用新型	4
		（3）外观设计	0
		2、专利授权数（项）	4
		（1）授权发明专利	2
		（2）实用新型	2
		（3）外观设计	0
		3、软件著作权授权数（项）	0
		4、发表论文（篇）	15
		（1）其中SCI索引收录数	10
		（2）其中EI索引收录数	3
		5、著作（部）	1
		6、制订标准数（项）	0
		（1）国际标准	0
		（2）国家标准	0
		（3）行业标准	0
		（4）地方标准	0
		（5）企业标准	0
	其他成果	1、填补技术空白数（项）	0
		（1）国际	0
		（2）国家	0
		（3）省级	0
		2、获奖项数	2
		（1）国家奖项	1
		（2）部、省奖项	1
		（3）地市级奖项	0
		3、其他科技成果产出	0
		（1）新工艺（或新方法模式）	0
		（2）新产品（含农业新品种）	0
		（3）新材料	0
		（4）新装备（装置）	0

		（5）平台/基地/示范点	0
		（6）中试线	0
		（7）生产线	0
		4、研究开发情况	\
		（1）小试	否
		（2）中试（样品样机）	否
		（3）小批量	否
		（4）规模化生产	否
	人才引育	1、引进高层次人才	6
		（1）博士、博士后	2
		（2）硕士	4
		2、培养高层次人才	10
		（1）博士、博士后	4
		（2）硕士	6
	产业化情况	新增产能（台/套/只等）	0
		新增产能利用率（%）	0
效果类指标	经济效益	1、新增产值（万元）	0
		2、新增销售（万元）	0
		3、新增出口创汇（万美元）	0
		4、新增利润（万元）	0
	社会效益	1、新增税收（万元）	0
		2、新增就业人数	10
		其中：本科以上就业人数	3
		3、就业培训（人次）	0
		4、带动农民增收（万元）	0
		5、农户培训（人次）	0
		6、新增产业带动情况（列举情况）	无
		7、技术集成示范（项）	0
		8、建立农业示范基地（亩数）	0
		9、节约资源能源（列举）	无
		10、环保效益	无
其他需要说明的情况		无	

五、附件清单

序号	附件名称	是否必备材料
■ 1	团队带头人与团队各核心成员的合作协议	是
■ 2	牵头单位与团队共建单位的合作协议（包括各方承担的任务、经费分配、研究成果的归属等）	是
■ 3	牵头单位对团队的配套资金承诺书	是

806222997009

六、合同书其他条款

（一）、甲方（科技厅）

1、负责及时划拨项目经费给项目单位。

2、负责协调、监督项目实施，检查项目执行情况，审计项目经费使用情况。经检查审计，如发现违反合同，有权暂停或停止划拨经费。

3、按合同规定的开支范围，对甲方划拨项目经费实行专款专用。

（二）、乙方（项目承担单位）

1、负责项目组织实施，进行项目日常管理及检查监督，并按规定向甲方报送项目年度执行情况报告。

2、乙方须呈交项目/课题科技报告。在项目/课题实施过程中提交进展报告和专题报告（包括试验/实验报告、分析/研究报告、工程/生产/运行报告、评价报告、技术节点报告、时间节点报告等），在项目/课题结题验收时提交最终报告。以上科技报告中，最终报告为必备报告，其他报告视项目/课题执行情况酌情提交。

3、按合同规定的开支范围，对甲方划拨项目经费实行专款专用。

4、负责提供应由本单位安排的基建、物资、自筹经费、人工等有关保证条件。

5、接受甲方对项目执行及经费使用等情况进行检查或审计。

6、项目完成后，负责提出项目总结报告，及时做出经费决算，接受甲方组织的项目验收。

7、项目完成后，必须进行成果登记，不进行成果登记的，项目负责人将不能承担省级各类科技计划项目；将会影响项目承担单位承担省级科技计划项目的信用。

（三）、项目推荐部门

1、负责项目实施过程中的组织协调、监督检查，对项目经费使用情况进行监督管理。

2、协助甲方对项目执行及经费使用情况进行检查或审计。项目完成后，协助甲方对项目进行验收。

3、负责解决应属本部门安排的基建、物资、配套资金等保证条件。

（四）、项目的转包、分包

1、非经甲方同意，乙方不得将合同项目及其权利和义务转包、分包给第三者。

2、本项目若转包、分包必须经甲方同意后另行签订合同，并将转包、分包合同副本作为本合同的正式附件，交甲方存查。

3、因第三方不能完成转包或分包合同的约定义务，影响乙方完成本合同应完成的义务，由乙方负责。

（五）、知识产权归属

凡使用甲方下达经费取得的研究成果及其形成的知识产权，除涉及国家安全、国家利益和重大社会公共利益的以外，授予科研项目承担单位。项目承担单位可以依法自主决定实施、许可他人实施、转让、作价入股等，并取得相应的收益。同时，在特定情况下，或根据合同中要求保留无偿使用、开发、使之有效利用和获取收益的权利。其它事宜按照科技部《关于国家科研计划项目研究成果知识产权管理的若干规定》执行。

（六）、技术资料的保密

1、非经双方同意，保密资料不得向第三方泄露。

2、对必须由保密审查部门审查后方能公开发表的保密资料，乙方不得擅自发表，擅自发表者要承担失密责任，直至依法对当事人追究刑事责任。

（七）、合同的变更或解除

1、任何一方提出变更合同或解除合同的要求，需与另一方协商，签订变更条款或协议，作为本合同的正式附件，方可执行。

2、一方因他方违反合同或发生不可抗力，或国家计划调整，致使合同履行成为不可能或不必要，有权通知另一方解除合同。

3、当事人一方逾期两个月不履行合同规定的义务，对方有权解除合同。

4、变更或解除合同造成的损失由双方协商或按责任原则分别承担。

（八）、不可抗力和风险责任的承担

1、任何一方因不可抗力或国家计划调整不能履行合同的全部或部分义务时，应及时通知另一方，并采取措施减少损失，在合理期限内提供合同不能履行的证明。

2、甲方不履行合同内容，导致项目失败或部分失败，所拨经费（无偿部分）和物资不得追回。乙方不履行合同内容，导致项目失败或部分失败，应全部退还或部分退还甲方所拨经费和物资，情节严重者要追究责任。

3、乙方在执行合同过程中发生风险情况，应及时通知甲方，并采取措施减少损失。乙方没有及时通知甲方并采取适当措施，导致损失扩大的，应就扩大的损失承担责任，甲方有权要求乙方支付违约金或赔偿经济损失。

（九）、科技报告

乙方需呈交项目科技报告。在项目实施过程中提交进展报告和专题报告（包括试验/实验报告、分析/研究报告、工程/生产/运行报告、评价报告、技术节点报告、时间节点报告等），在项目结题验收时提交最终报告。以上科技报告，最终报告为必备报告，其他报告视项目执行情况酌情提交。

（十）、合同文本的要求

本合同一式肆份，甲方存贰份，乙方存贰份，具有同等法律效力。

（十一）、其他附加条款

经双方协商订立的下列条款作为本合同正式内容的一部分。

七、本合同签约各方

甲方：陕西省科学技术厅

业务处室负责人（签章）：

业务处室经办人（签章）： 电话：02961776101

通讯地址：西安市高新区丈八五路10号

邮编：710077

盖章

年 月 日

乙方：

单位负责人（签章）：

项目负责人（签章）：

通讯地址：陕西省西安市长乐西路169号 电话：

邮编：710032

盖章

年 月 日

推荐部门：陕西省卫生和计划生育委员会

负责人（签章）：

联系人：王琨 电话：029-89620667

通讯地址：西安市莲湖路112号

邮编：710003

盖章

年 月 日

陕西省重点科技创新团队合作协议书

第四军医大学时永全教授承担的陕西省“胃癌前病变发生机制与诊治”创新团队，本着统一布局、兼顾所长、集智攻关、充分发挥团队成员专业优势和特点的原则，以胃癌前病变的发生发展及诊治为主要研究方向，设置6个课题：肠上皮化生发生发展的关键分子机制；慢性炎症信号影响肠上皮化生的机制；核受体作为肠上皮化生治疗靶点的探索研究；胃癌前病变队列建设；早期胃癌队列建设；多中心临床样本验证和评价研究。团队成员一致同意，在此研究领域紧密合作，相互协作、以任务为需求，力争产生2-3项具有重大影响的创新性研究成果，实现科研和成果转化任务；充分发挥团队基础和临床研究的实力与优势，加强创新人才的培养工作，提供青年骨干的专业技能、科技创新能力和综合素质，培养一批国家、军队急需、具备国际竞争力的高层次专业人才。

团队带头人：

团队核心成员：

团队其他成员：

胃癌前病变发生机制及诊治创新团队

课题承担单位说明

本课题由第四军医大学一个单位承担，无其他合作共建单位。所有的建设任务、经费和成果均归属于第四军医大学。

80622997009

项目自筹资金承诺函

第四军医大学第一附属医院，承诺为“胃癌前病变发生机制与诊治”项目，提供100万元的配套资金，资金来源为2、4（1.地方财政拨款；2.从承担单位获得的资助；3.参与研究的企业提供的资助；4.其他）。

配套资金的管理和使用要求(包括使用方向、用途、开支科目等)：实施项目所需开支：设备费、材料费、测试化验加工费、差旅费、会议费、国际合作交流费、出版/文献/信息传播/知识产权事务费、劳务费、专家咨询费、管理费等。

特此证明。

出资单位（公章）：第四军医大学第一附属医院

2017年7月26日

由 扫描全能王 扫描创建

肿瘤生物学国家重点实验室
第五批次自主课题立项通知

各有关单位:

肿瘤生物学国家重点实验室（空军军医大学）第五批次自主课题评审工作已经结束，根据专家评审结果，经研究，决定批准“ΔNp63-RSK4-GSK3β信号轴调控肿瘤干细胞在食管鳞状细胞癌恶性行为中的作用与机制”等28项自主课题立项（立项项目清单见附件）。

请各有关单位按照要求编制项目任务书和经费预算报我室审批，并请认真做好项目实施的监督、协助工作。

特此通知。

附: 肿瘤生物学国家重点实验室自主课题立项清单

肿瘤生物学国家重点实验室

2020年7月7日

肿瘤生物学国家重点实验室2020年度自主课题立项清单

序号	编号	课题类别	课题名称	负责人	批准经费（万元）	开始时间	结束时间
1	CBSKL2019ZZ01	面上项目	ΔNp63-RSK4-GSK3β信号轴调控肿瘤干细胞在食管鳞状细胞癌恶性行为中的作用与机制	王哲	50	2020年7月	2022年6月
2	CBSKL2019ZZ02	面上项目	具有转录活性的磷酸酶EYA2通过调控SOCS3抑制肝癌发生发展的分子机制	边惠洁	50	2020年7月	2022年6月
3	CBSKL2019ZZ03	面上项目	成簇表达miRNA（miR-424-503）分子在原发性肝细胞癌进展中的负向调控机制	杨安钢	50	2020年7月	2022年6月
4	CBSKL2019ZZ04	面上项目	Wnt-FOXP3/NFκB-Wnt反馈环在结肠癌干细胞耐药中的作用及其机制研究	张伟	50	2020年7月	2022年6月
5	CBSKL2019ZZ05	面上项目	重塑肿瘤相关巨噬细胞进行肝癌治疗的作用和机制研究	秦鸿雁	50	2020年7月	2022年6月
6	CBSKL2019ZZ06	面上项目	基于单细胞测序的肝癌线粒体DNA突变进化谱系研究	邢金良	50	2020年7月	2022年6月
7	CBSKL2019ZZ07	面上项目	HDAC6介导的去乙酰化修饰在胆汁酸诱导胃粘膜肠化生过程中的作用机制研究	时永全	50	2020年7月	2022年6月
8	CBSKL2019ZZ08	面上项目	消化道多模态内镜分子探针的研制和应用	吴开春	50	2020年7月	2022年6月
9	CBSKL2019ZZ09	面上项目	MG7-CART三代载体的构建和体外验证	聂勇战	50	2020年7月	2022年6月
10	CBSKL2019ZZ10	面上项目	PD-1抑制剂联合抗血管生成TKI治疗MSS型胃肠癌免疫应答的标志物筛选及其机制研究	樊代明	50	2020年7月	2022年6月
11	CBSKL2019ZZ11	自由探索项目	蛋白精氨酸甲基转移酶PRMT5调控肠道发育和肿瘤发生的功能和机制研究	张健	20	2020年7月	2022年6月
12	CBSKL2019ZZ12	自由探索项目	ALKBH5通过"m6A修饰-谷氨酰胺回补"环路调控结肠癌代谢重编程的机制研究	申亮亮	20	2020年7月	2022年6月
13	CBSKL2019ZZ13	自由探索项目	抑癌基因NDRG2对结直肠肿瘤氧化呼吸的调控效应及分子机制研究	沈岚	20	2020年7月	2022年6月

14	CBSKL2019ZZ14	自由探索项目	基于外泌体构建肿瘤靶向负载新抗原的递药策略及其增强结肠癌免疫治疗的效应	杨国栋	20	2020年7月	2022年6月
15	CBSKL2019ZZ15	自由探索项目	RIP3通过CXCL1-CXCR2信号轴调控MDSCs趋化募集促进肝癌免疫逃逸的机制研究	唐娟	20	2020年7月	2022年6月
16	CBSKL2019ZZ16	自由探索项目	CD147与RanBP1相互作用促进紫杉醇肿瘤耐药的机制研究	南刚	20	2020年7月	2022年6月
17	CBSKL2019ZZ17	自由探索项目	CD147分子促癌表位的确认及基于抗原抗体复合物结构的抗肿瘤多肽设计	林鹏	20	2020年7月	2022年6月
18	CBSKL2019ZZ18	自由探索项目	HER2阳性胃癌的新型靶向和免疫治疗方法研究	贺林涛	20	2020年7月	2022年6月
19	CBSKL2019ZZ19	自由探索项目	促癌分子FoxM1与CIAP的交互作用在肝癌进展中的生物学意义及其机制解析	张瑞	20	2020年7月	2022年6月
20	CBSKL2019ZZ20	自由探索项目	新型CAR-M的建立及其对HER2阳性胃癌细胞杀伤作用的研究	王涛	20	2020年7月	2022年6月
21	CBSKL2019ZZ21	自由探索项目	TIPE2介导的巨噬细胞代谢重编程促进结肠癌进展的免疫机制研究	王微	20	2020年7月	2022年6月
22	CBSKL2019ZZ22	自由探索项目	肝癌免疫治疗新靶点GDF15诱导调节性T细胞生成以及抑制性功能上调的分子机制研究	李萌	20	2020年7月	2022年6月
23	CBSKL2019ZZ23	自由探索项目	免疫受体酪氨酸抑制基序（ITIM）阻断多肽的优化及其对结肠癌治疗作用的研究	张存	20	2020年7月	2022年6月
24	CBSKL2019ZZ24	自由探索项目	饱和脂肪酸通过组蛋白修饰调控 TAM 功能重塑而参与肝癌进展的作用机制研究	赵俊龙	20	2020年7月	2022年6月
25	CBSKL2019ZZ25	自由探索项目	IRE1α/XBP1通路调控内皮-干细胞转化在结肠癌耐药中的作用和机制研究	晏贤春	20	2020年7月	2022年6月
26	CBSKL2019ZZ26	自由探索项目	TFAM缺失介导的肠上皮屏障稳态失衡在肠道炎症及相关结直肠癌发生中的作用机制研究	黄启超	20	2020年7月	2022年6月
27	CBSKL2019ZZ27	自由探索项目	外泌体途径介导肿瘤细胞线粒体DNA突变负向进化选择的作用机制研究	郭旭	20	2020年7月	2022年6月
28	CBSKL2019ZZ28	自由探索项目	细胞内渗透压失调导致癌变发生	张丰	20	2020年7月	2022年6月

项 目 编 号	密　级

肿瘤生物学国家重点实验室（第四军医大学）

自主研究课题申请书

（二O一九年度）

资助类别：面上课题/自由探索课题

项目名称：HDAC6 介导的去乙酰化修饰在胆汁酸诱导胃肠化生过程中的作用机制研究

申 请 人：时永全

所在单元：

电　　话：029-84771515　传　　真：86-29-82539041

电子邮箱：shiyquan@fmmu.edu.cn

填表日期：2019 年 6 月 日

肿瘤生物学国家重点实验室（第四军医大学）办公室

填 写 说 明

1、申请书的各项内容要逐条认真填写，表达准确、严谨，字迹清晰易辨。

2、资助类别分为面上课题和自由探索课题，面上课题面向肿瘤生物学重点实验室的所有相关单位，具备博士学位、副高及以上技术职称的固定人员均可提出资助申请；自由探索课题面向实验室内未获国科金资助但评价较好的青年研究人员。

3、正文部分列出条目为撰写提纲，申请者请根据提纲要求进行填写。

4、封面上的项目编号由实验室填写。

5、封面上的密级由申请人根据课题性质的保密要求填写建议密级。

6、申请书请用 A4 纸双面打印，正文请用 5 号宋体，1.5 倍行距。

一、简表

申请人信息			
姓名	时永全	身份证号	412825197311033311
学位	博士	职称	主任医师
手机号码	15829302158	电子邮箱	shiyquan@fmmu.edu.cn
所在单位	西京消化病医院（肿瘤生物学重点实验室肿瘤增殖与转移研究单元）		
通讯地址	陕西省西安市新城区长乐西路 15 号西京消化病医院消化五科		
主要研究领域	胃癌癌前病变		
项目基本信息			
项目名称	HDAC6 介导的去乙酰化修饰在胆汁酸诱导胃肠化生过程中的作用机制研究		
研究属性			
研究期限	2020 年 7 月—2023 年 6 月		
申请金额（万元）	50 万元		
摘　要	HDAC6 具有广泛的促癌作用，在多数肿瘤中呈现出过表达。我们前期的预实验发现在胆汁酸诱导的 IM 细胞模型中 HDAC6 呈现出显著升高，提示我们该分子在 BA 诱导的肠化生发生发展过程中起到了重要的作用。而进一步的 RNA-seq 结果显示，FOXP3 分子在胆汁酸或 HDAC6 过表达的作用下均呈现显著降低，提示 HDAC6 可能通过促进 FOXP3 分子组蛋白去乙酰化而抑制其表达来促进肠化的发生。同时生物信息学分析结果显示 FOXP3 具有 HNF4α 分子启动子结合区，而 HNF4α 又具有 HDAC6 启动子结合区，因此我们提出在胆汁酸的作用下 HDAC6 通过对 FOXP3 进行去乙酰化修饰影响下游 HNF4α 的转录活性，而 HNF4α 可以通过转录调控 HDAC6 最终形成 HDAC6/FOXP3/HNF4α 正反馈环路促进肠化的不断进展。本项目将首次揭示 HDAC6 的去乙酰化修饰作用及由其介导的闭合环路在胆汁酸诱导肠化生发展的作用机制。		

二、项目组主要参与者

编号	姓名	电子邮箱	性别	职称	学位	所在单位名称	项目分工
1	时永全	shiyquan@fmmu.edu.cn	男	主任	博士	西京消化病医院	实验设计
2	王娜	15289387077@163.com	女	初级	博士	第四军医大学	质粒及慢病毒的构建与转染，转录因子验证与分析
3	张剑	453547759@qq.com	男	初级	硕士	第四军医大学	乙酰化分析及动物实验
4	吴斯然	m18402950284@163.com	女		硕士	第四军医大学	生物信息学分析、免疫组化、免疫荧光
5	焦圣元	17319884906@163.com	男		硕士	第四军医大学	统计分析、数据整理
6							
7							
8							
9							

总人数	高级	中级	初级	博士后	博士生	硕士生
5	1	0	2	0	2	3

三、经费申请表

（金额单位：万元）

科目	申请经费	备注（计算依据与说明）
一．研究经费	41.20	
1、科研业务费	8.00	
（1）测试/计算/分析费	4.00	PCR 产物及质粒测序、病毒包装、生物信息学分析、统计分析等费用
（2）会议费/差旅费	1.50	会议注册费、交通费、住宿费等
（3）出版物/文献/信息传播费	2.50	SCI 及中文核心期刊的审稿费和出版费
2、实验材料费	33.20	
（1）原材料/试剂/药品购置费	33.20	细胞培养试剂、分子生物学试剂、实验动物费等
二、国际合作与交流费	4.00	
1、境外专家来华合作交流	4.00	劳务费、交通费及住宿费等
三、劳务费	2.40	无收入研究生的劳务费发放
四、绩效支出	2.40	对课题相关人员进行绩效发放

详细经费说明：

1、 劳务费仅用于无工资收入的研究生及其他人员

2、 绩效支出仅用于与课题研究相关人员的绩效费用

四、立题依据

1．本项目研究的目的和意义、国内外研究现状及存在的问题分析：

1.1 研究目的和意义

胃癌在我国的发病率和死亡率分居第二位和第三位[1]，其中肠型胃癌的发生发展遵循 correa 模型：正常-胃炎-肠化生-异型增生-胃癌[2]。近年来，越来越多的研究表明肠化生可进展为胃癌[3, 4]，阐明其发生机制是通过阻断肠化生预防胃癌的重要前提。

胃粘膜的肠化生是胃型细胞被肠型细胞替代的过程，目前普遍认为肠化生是由慢性环境刺激所引起的，其诱因主要包括幽门螺杆菌（*Helicobacter pylori, Hp*）感染、胆汁反流、吸烟、饮酒等[5]。其中 *Hp* 感染被认为是最主要的原因，但是根除 *Hp* 后是否可以阻止肠化生（Intestinal metaplasia, IM）向胃癌的发展目前尚未达共识[6]。这就提示我们可能还存在其他重要的因素促进了肠化生的发生及向胃癌的发展。目前关于肠化生的研究主要集中于 BE，体外研究、体内研究以及流行病学调查均显示胆汁酸（Bile acid, BA）导致了 Barrett 食管（Barrett's esophagus, BE）的发生[7, 8]。同时有研究表明高浓度的 BA 促进了胃食管连接处的肠化生的发生[9]，同时胃液中具有高浓度 BA 的患者其 IM 发生的范围和程度都更加严重[10]。

既往研究表明，肠化生涉及多种基因和分子的表达失调，而在其中起关键作用的是一些与胃肠分化发育密切相关的转录因子。尾型同源核转录因子 2（Caudal-related homeobox transcription factor 2，CDX2）是一种关键的肠特异性转录因子，在肠化生组织中显著升高。该分子还可以通过转录调控其他肠化标志分子如黏蛋白（MUCIN 2，MUC2）,Krüppel 样因子 4（Krüppel-like factor4，KLF4）,异麦芽糖酶（sucraseisomaltase，S-I）和绒毛蛋白（VILLIN1，VIL1)）等来促进肠化生的发生和进展。

本课题组在国家自然科学基金（81270445，81470805，81873554）的连续资助下，发现 BA 可以促进胃上皮细胞表达多种肠标志分子，并且成功构建了 BA 诱导的肠化细胞模型。我们观察到 BA 通过作用于 miR-92a/FOXD1/NF-κB 信号通路促进了胃细胞肠化的发生[11]。同时还发现 BA 也可以通过促进 SOX2/CDX2 复合物的形成，形成复合体的 SOX2 对 CDX2 的抑制作用降低进而促进肠化生的发生[12]。BA 还可以通过刺激 FXR 的表达，引起 SHP 升高，SHP 的升高最终诱导了 CDX2 的表达，诱导肠化生[13]。此外，我们发现在肠道分化发育的过程中具有重要的作用的肝细胞核因子（Hepatocyte nuclear factor 4α, HNF4α）在 BA 诱导的肠化生细胞模型中显著升高，且通过 TGR5/HNF4α/Wnt 信号通路引起细胞中肠化标志物的升高，同时我们成功构建了 HNF4α 条件性过表达的肠化小鼠模型（正在发表）。但是在此领域的研究目前还很有限，关于 BA 诱导胃黏膜肠化的机制仍有待进一步研究。

表观遗传修饰是基因表达调控的主要方式，它在未改变细胞核 DNA 序列的情况下对 DNA 或组

蛋白等进行甲基化、乙酰化等修饰，最终使基因功能产生可逆的、可遗传的改变。这种修饰会影响细胞的增殖、分化、凋亡等过程[14]，因此在肿瘤的发生和进展中发挥了至关重要的作用。有研究显示，肠化生组织的基因甲基化水平较正常粘膜组织无明显变化[15]，提示我们可能存在其他表观修饰方式参与其发生过程。本课题组前期使用转录组测序技术分析了 BA 对胃粘膜上皮细胞 GES 基因表达的影响，发现组蛋白去乙酰化酶 6（Histone deacetylase 6, HDAC6）在 BA 刺激后显著上调，之后的 qRT-PCR 及 Western blot 实验验证了这一发现，提示由该分子介导的去乙酰化修饰作用可能参与了 BA 诱导的肠化过程。组蛋白的乙酰化主要受到组蛋白乙酰基转移酶（Histone acetyl transferases, HATs）及组蛋白去乙酰化酶（Histone deacetylases, HDACs）的共同调控，其中 HDACs 主要通过促进组蛋白的去乙酰化，使得染色质变得致密卷曲，隐蔽转录结合位点，抑制基因的转录，其表达异常与多种肿瘤的发生密切相关[16]。HDAC6 是该家族中最大的分子，且与其他分子不同，该分子主要位于胞浆中，且具有两个催化亚基，使其既可以作用于组蛋白底物抑制其转录，也可以作用于非组蛋白底物。目前研究已经发现 HDAC6 分子可以通过调控肿瘤细胞转化[17]、进展[18]、免疫[19]等方面来促进肿瘤的进展。Wang F 等人也发现 HDAC6 在 *Hp* 阳性的肠化生和胃癌患者组织中呈明显的升高，提示我们该分子可能与肠化生具有一定的相关性[20]。为了证明 HDAC6 对肠化进程的影响，我们在胃细胞系对 HDAC6 进行过表达或敲减处理，结果显示其可以正向调控下游肠化标志分子 CDX2、MUC2 及 KLF4 的表达，并且发现其表达水平在肠化患者组织中显著升高，提示 HDAC6 在 BA 诱导肠化生的过程中可能发挥重要作用。

为了进一步明确 HDAC6 是如何对肠化标志分子进行调控的，我们在 GES 细胞中过表达 HDAC6，通过 RNA-seq 分析基因的表达变化。我们发现，既能被 HDAC6 下调又能被 BA 刺激下调的基因一共有三个（STOX1、BLOC1X5-TXNDC5 及 FOXP3），结合文献回顾结果我们选择 FOXP3 进行下一步研究分析。转录因子叉头盒蛋白 3（Forkhead box protein 3, FOXP3），是维持机体发育及调节性 T 细胞（Treg）功能的重要转录因子，在免疫逃逸及免疫耐受的过程中发挥了重要的作用[21]。研究表明 FOXP3 与肿瘤的发生、进展、耐药及预后均密切相关，值得关注的是，近年来人们发现该分子不仅可以表达于 T 细胞，还可以表达于组织细胞中[22]，这就提示该分子可能还具有更多的潜在调节功能。有研究发现在胃癌组织中 FOXP3 的表达水平显著低于癌旁组织，且 *Hp* 可以引起该分子的显著降低，*Hp* 是 GIM 的最主要诱因，所以在肠化生组织中 FOXP3 可能是降低的。这些发现与我们的预想相一致，即 FOXP3 在胃粘膜正常组织中表达水平较高，在 BA 的作用下 HDAC6 升高并对其组蛋白进行去乙酰化修饰，抑制其转录，引起在肠化组织中表达水平的降低。有文献报道 HDAC6 通过对 FOXP3 蛋白进行翻译后修饰，影响其在 T 细胞功能调节及在肿瘤细胞中的作用[23]，但是关于 HDAC6 对 FOXP3 组蛋白进行去乙酰化修饰而抑制其转录这个方面尚未见报道。QRT-PCR 和 Western blot 证

实，BA 刺激和过表达 HDAC6 均可显著抑制 FOXP3 的表达。而在 GES 细胞中抑制 FOXP3 的表达，可以促进 CDX2 等多种肠标志分子表达。生物信息学分析表明，FOXP3 能够结合 HNF4α 基因的启动子区域，而在 GES 细胞中过表达 FOXP3 能够抑制 HNF4α 的表达，抑制 FOXP3 能够促进 HNF4α 的表达，提示我们 FOXP3 可能对 HNF4α 启动子具有转录抑制作用。有趣的是，HDAC6 的基因启动子区域包含有 HNF4α 的结合位点，而过表达 HNF4α 能够上调 HDAC6 在 GES 细胞的表达水平。

由此，我们提出科学假设：HDAC6/FOXP3/HNF4α 形成一个正反馈环路，BA 通过激动这一正反馈环路增加 HNF4α 的表达，而 HNF4α 进一步促进多种肠型标志分子的表达，促进胃粘膜肠化生。当然，HDAC6 也可能通过调控其他基因的表达而促进 BA 诱导的肠化生。

为了验证我们提出的科学假设，需要进行以下研究：

（1）HDAC6 促进肠型标志分子的表达，包括 HNF4α；

（2）HDAC6 通过组蛋白去乙酰化抑制 FOXP3 的表达；

（3）FOXP3 抑制肠型标志分子的表达；

（4）过表达 FOXP3 能够阻断 BA 和 HDAC6 对肠型标志分子的表达促进作用；

（5）FOXP3 结合并抑制 HNF4α 的表达；

（6）HNF4α 结合并促进 HDAC6 的表达；

（7）抑制 HNF4α 能够阻断 BA 刺激和 HDAC6 过表达对肠型标志分子的表达调控作用；

（8）HDAC6、FOXP3 及 HNF4α 在肠化生组织中的表达及相关性；

（9）初步分析 BA 诱导 HDAC6 的分子机制，通过调控 FXR 和 TGR5 这两种 BA 受体（包括基因表达调控、使用激动剂等），观察哪一种受体街道了 BA 对 HDAC6 的作用。并进一步分析受体后通路。

1.2 国内外研究现状

1.2.1 HDAC6 在多种肿瘤中呈现高表达，但在肠化生组织中表达水平罕见报道

组蛋白是真核生物染色体的重要组成成分，HATs 和 HDACs 可以通过对组蛋白进行修饰改变染色体结构进而影响基因的转录。当机体的乙酰化和去乙酰化修饰出现失衡，可能导致机体出现异常表现。HDACs 家族目前发现的成员共有 18 个，分为三类：I 类：还原型钾依赖蛋白 3（Rpd3），包含 HDAC1,HDAC2,HDAC3,HDAC8；II 类 HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9, HDAC10,而其根据催化区又可以分为两个亚类：包含一个催化区:IIa 类 HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9；包含两个催化区：IIb 类 HDAC6 和 HDAC10；III 类烟酰胺腺嘌呤二核苷酸依赖的组蛋白去乙酰化酶类：Sirt1-7[24]。HDACs 家族成员中只有 II 类中的分子胞浆中，其余分子均位于胞核[25]，并且 HDAC6 是其中最为特殊的一员，它是目前为止发现的人体内最大的分子，且包含两个催化区，使得其既可以作用于组蛋白抑制其转录，又可以作用于非组蛋白促进其表达[26]。既往研究表明 HDAC6 可以通过

引起蛋白质的构型发生改变引起蛋白质构象病帕，导致神经系统病变相关疾病如金森病、亨廷顿病、阿尔茨海默病等[27-29]。随着对肿瘤的不断深入研究，研究人员们开始关注 HDAC6 对肿瘤发生和进展的影响，并且目前已经发现该分子在肝癌、食管癌、乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌等多种恶性肿瘤中发挥了显著的促癌作用。其在肿瘤中发生和进展的中的作用主要涉及三个方面：1. 细胞的癌性转化：HDAC6 可以通过组蛋白去乙酰化功能促进细胞的非贴壁生长及增殖来诱导细胞发生癌性转变[30]；2. 调控肿瘤发展：如在前列腺癌及淋巴细胞白血病中 HDAC6 通过调节 HSP90 的功能来促进肿瘤的发生[31]，在结直肠癌中使用 HDAC6 抑制剂可以通过促进凋亡和抑制 IFN-γ 诱导的 PD-L1 升高来起到抗肿瘤的作用[32]，HDAC6 还可以通过抑制肝癌细胞中 FOXO1 的乙酰化来调控 Th 细胞发挥抗癌作用[33]；3. 免疫调控：HDAC6 可以调控 STAT3 通路，该通路又进一步影响抗原提呈细胞上 PD-L1 的表达[34]，而 HDAC6 抑制剂则可以上调黑色素瘤细胞 gp100、MART 等抗原的表达[35]。而关于该分子在胃粘膜肠化生方面的报道目前仅有两篇，Qing He 等人[36]利用免疫组化技术检测了 HDAC6 在 94 例 IM 组织中的表达水平，发现仅有 25%样本呈阳性表达；而另一项研究发现在 30 例 *Hp* 阳性的 IM 组织中该分子有 30%呈阳性表达[37]。但是这两项研究均主要探讨该分子在胃癌中的表达水平，选取的 IM 组织样本量较少，不能很好的说明问题，有待进一步扩大样本量，且该分子在肠化中的作用也需要进行深入的研究。

1.2.2 FOXP3 在多种肿瘤中表达降低，在肠化中的作用未见报道

FOXP 家族分子均为转录因子，主要包括 FOXP1、FOXP2、FOXP3 及 FOXP4，它们均包含由 110 个氨基酸组成的 DNA 绑定区域，这个区域被称为叉头框序列或翼状螺旋 DNA 结合域[38]。其中 FOXP3 可以作为 $CD4^+CD25^+$及 $CD4^+CD25^-$调节性 T 细胞（Regulatory T cells, Treg cells）的标志分子调控其功能，并进一步影响机体的免疫反应。随着免疫治疗的不断发展，人们逐渐发现 Treg 细胞在抗肿瘤免疫治疗中发挥了重要作用[39]。而 FOXP3 在 Treg 细胞功能的维持中又占据了至关重要的地位，所以研究者们开始探索其在肿瘤发生、进展和治疗中的所发挥的作用。Van Gool F 等人发现特异性敲减或突变 FOXP3 分子可以减弱 Treg 细胞的免疫抑制作用[40]，根据这一特性，利用可以作用于 FOXP3 分子并对其产生抑制作用的分子或抑制剂即可以促进机体的抗肿瘤免疫过程。条件性敲除小鼠体内 $FOXP3^+$Treg 细胞中的 Rcor1 基因可以抑制 Treg 细胞上 FOXP3 分子的表达，导致外周淋巴组织中 Tregs 细胞数量的减少从而促进抗肿瘤免疫的发生[41]。组蛋白去乙酰化酶 Tip60 可以通过翻译后修饰方式对 FOXP3 蛋白分子进行去乙酰化修饰并降低其表达，FOXP3 的减少进一步引起 Treg 细胞功能受到抑制，最终促进了小鼠体内的抗肿瘤免疫[42]。同时在大多数肿瘤中，渗透进癌组织中的 $FOXP3^+$T 细胞大多数是 $FOXP3^+$Treg 细胞，而 Treg 细胞对抗肿瘤免疫主要发挥的抑制作用，因此 Treg 细胞与 $CD8^+$T 细胞的比率可以用来评估患者的预后情况[43]。值得注意的是，近年来的研究发现该分

子除了可以特异性表达于 Treg 细胞，还可以表达于正常及癌组织细胞中，直接影响肿瘤细胞内部的信号转导。如 Tao Zuo 等人发现 FOXP3 在乳腺癌中可以转录抑制 SKP2 蛋白进而降低肿瘤细胞的增殖发挥抑癌的作用[44]；而在非小细胞癌中 FOXP3 可以激活 Wnt/β-catenin 信号通路来促进 EMT 进程，产生促进肿瘤生长和转移的效应[45]。目前关于 FOXP3 在胃癌中的研究还处于起步阶段，对于其在胃癌中的作用尚不明确。Lu Zhang 等人发现 FOXP3 可以表达于胃癌细胞并通过激活 TGF-β 信号通路来促进其增殖、侵袭和转移[46]；CHANGLI JIANG 等人则发现 FOXP3 与胃癌的恶性分化相关，但是其在胃癌组织中的染色强度普遍较低[47]；还有研究表明 FOXP3 既可以表达于胃癌细胞也可以表达于 Treg 细胞，且其表达水平与胃癌的不良预后呈现出显著负相关[48]。而对于该分子与肠化生之间的关系，目前仅有一篇文献报道 FOXP3 在胃粘膜肠化生组织中表达水平明显低于正常组织[49]，这与我们的预期结果相一致，而关于其作用机制该研究未进行探索。此外，还有一项研究发现在 *Hp* 感染的小鼠胃粘膜组织中 FOXP3 显著降低[50]，提示在 *Hp* 感染引起的肠化生组织中该分子表达也可能出现下降。

1.2.3 HDAC6 是否可以对 FOXP3 组蛋白的去乙酰化修饰及影响其转录调节功能尚不清楚

染色质结构调节在真核生物的转录调控中扮演着重要角色，核小体是组成染色质的基本结构单位，由 DNA 缠绕八个核心组蛋白（H2A、H2B、H3、H4 各 2 个）构成。组蛋白的表观修饰常发生在其氨基端尾部，这些修饰包括乙酰化、磷酸化、甲基化和泛素化等，其中乙酰化修饰主要发生在组蛋白 H3 和组蛋白 H4。组蛋白的乙酰化可以使得染色体结构打开，促进转录因子与其染色体上对应的转录位点结合，促进转录，而 HDAC 则可以抑制此过程。此外，由于组蛋白乙酰化可以影响不同辅因子与基因的结合或者直接影响了 DNA 的绑定，所以可能也会改变 FOXP3 的转录活性。目前关于 HDAC6 对 FOXP3 的去乙酰化作用仅限于翻译后修饰，从小鼠体内分离出 Treg 细胞，对细胞进行 HDAC6 抑制剂处理后会提高 FOXP3 的乙酰化水平，进而提高 Treg 细胞的免疫抑制功能[35]。但是尚未见报道 HDAC6 对该分子的组蛋白产生去乙酰化作用进而影响其转录，最终干扰其对下游靶分子的转录调控作用。我们在预实验中发现胆汁酸及 HDAC6 均可降低 FOXP3 的 RNA 水平，提示 HDAC6 可在转录水平对该分子进行调控，这个结果与我们的假设相符。而 HDAC6 在肠化细胞中对 FOXP3 组蛋白的去乙酰化作用及对其转录活性的影响有待进一步研究。

2．主要参考文献：

[1]. Bray, F., et al., Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin, 2018. 68(6): p. 394-424.

[2]. Sue, S., W. Shibata and S. Maeda, Helicobacter pylori-Induced Signaling Pathways Contribute to Intestinal Metaplasia and Gastric Carcinogenesis. Biomed Res Int, 2015. 2015: p. 737621.

[3]. Li, D., et al., Risks and Predictors of Gastric Adenocarcinoma in Patients with Gastric Intestinal Metaplasia and Dysplasia: A Population-Based Study. Am J Gastroenterol, 2016. 111(8): p. 1104-13.

[4]. de Vries, A.C., et al., Epidemiological trends of pre-malignant gastric lesions: a long-term nationwide study in the Netherlands. Gut, 2007. 56(12): p. 1665-70.

[5]. Jiang, J.X., et al., Risk factors for intestinal metaplasia in a southeastern Chinese population: an analysis of 28,745 cases. J Cancer Res Clin Oncol, 2017. 143(3): p. 409-418.

[6]. Leung, W.K., et al., Factors predicting progression of gastric intestinal metaplasia: results of a randomised trial on Helicobacter pylori eradication. Gut, 2004. 53(9): p. 1244-9.

[7]. Souza, R.F., The role of acid and bile reflux in oesophagitis and Barrett's metaplasia. Biochem Soc Trans, 2010. 38(2): p. 348-52.

[8]. Sun, D., et al., Bile acids but not acidic acids induce Barrett's esophagus. Int J Clin Exp Pathol, 2015. 8(2): p. 1384-92.

[9]. Das, K.M., et al., Transformation of benign Barrett's epithelium by repeated acid and bile exposure over 65 weeks: a novel in vitro model. Int J Cancer, 2011. 128(2): p. 274-82.

[10]. Kaur, B.S., et al., Bile salts induce or blunt cell proliferation in Barrett's esophagus in an acid-dependent fashion. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000. 278(6): p. G1000-9.

[11]. Li, T., et al., MicroRNA-92a-1-5p increases CDX2 by targeting FOXD1 in bile acids-induced gastric intestinal metaplasia. Gut, 2019. 68(10): p. 1751-1763.

[12]. Yuan, T., et al., SOX2 interferes with the function of CDX2 in bile acid-induced gastric intestinal metaplasia. Cancer Cell Int, 2019. 19: p. 24.

[13]. Zhou, H., et al., Activation of FXR promotes intestinal metaplasia of gastric cells via SHP-dependent upregulation of the expression of CDX2. Oncol Lett, 2018. 15(5): p. 7617-7624.

[14]. Tsai, H.C. and S.B. Baylin, Cancer epigenetics: linking basic biology to clinical medicine. Cell Res, 2011. 21(3): p. 502-17.

[15]. Huang, K.K., et al., Genomic and Epigenomic Profiling of High-Risk Intestinal Metaplasia Reveals Molecular Determinants of Progression to Gastric Cancer. Cancer Cell, 2018. 33(1): p. 137-150.e5.

[16]. Huynh, N.C., V. Everts and R.S. Ampornaramveth, Histone deacetylases and their roles in mineralized tissue regeneration. Bone Rep, 2017. 7: p. 33-40.
[17]. Lee, Y.S., et al., The cytoplasmic deacetylase HDAC6 is required for efficient oncogenic tumorigenesis. Cancer Res, 2008. 68(18): p. 7561-9.
[18]. Putcha, P., et al., HDAC6 activity is a non-oncogene addiction hub for inflammatory breast cancers. Breast Cancer Res, 2015. 17(1): p. 149.
[19]. Li, D., et al., Histone deacetylase 6 and cytoplasmic linker protein 170 function together to regulate the motility of pancreatic cancer cells. Protein Cell, 2014. 5(3): p. 214-23.
[20]. He, Q., et al., A Decrease of Histone Deacetylase 6 Expression Caused by Helicobacter Pylori Infection is Associated with Oncogenic Transformation in Gastric Cancer. Cell Physiol Biochem, 2017. 42(4): p. 1326-1335.
[21]. Hori, S. and S. Sakaguchi, Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells. Microbes Infect, 2004. 6(8): p. 745-51.
[22]. Karanikas, V., et al., Foxp3 expression in human cancer cells. J Transl Med, 2008. 6: p. 19.
[23]. Beier, U.H., et al., Histone/protein deacetylases control Foxp3 expression and the heat shock response of T-regulatory cells. Curr Opin Immunol, 2011. 23(5): p. 670-8.
[24]. Witt, O., et al., HDAC family: What are the cancer relevant targets? Cancer Lett, 2009. 277(1): p. 8-21.
[25]. de Ruijter, A.J., et al., Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. Biochem J, 2003. 370(Pt 3): p. 737-49.
[26]. Verdin, E., F. Dequiedt and H.G. Kasler, Class II histone deacetylases: versatile regulators. Trends Genet, 2003. 19(5): p. 286-93.
[27]. Selenica, M.L., et al., Histone deacetylase 6 inhibition improves memory and reduces total tau levels in a mouse model of tau deposition. Alzheimers Res Ther, 2014. 6(1): p. 12.
[28]. Zhang, L., S. Sheng and C. Qin, The role of HDAC6 in Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis, 2013. 33(2): p. 283-95.
[29]. Du G, et al., Drosophila histone deacetylase 6 protects dopaminergic neurons against {alpha}-synuclein toxicity by promoting inclusion formation. Mol Biol Cell, 2010. 21(13): p. 2128-37.
[30]. Lee, Y.S., et al., The cytoplasmic deacetylase HDAC6 is required for efficient oncogenic tumorigenesis. Cancer Res, 2008. 68(18): p. 7561-9.
[31]. Ganguly, S., et al., Targeting HSF1 disrupts HSP90 chaperone function in chronic lymphocytic leukemia.

Oncotarget, 2015. 6(31): p. 31767-79.

[32]. Chen, M.C., et al., MPT0G612, a Novel HDAC6 Inhibitor, Induces Apoptosis and Suppresses IFN-gamma-Induced Programmed Death-Ligand 1 in Human Colorectal Carcinoma Cells. Cancers (Basel), 2019. 11(10).

[33]. Qiu, W., et al., Targeting HDAC6 Reprograms TH 17 Pathogenicity and Facilitates Immunotherapies for Hepatocellular Carcinoma. Hepatology, 2019.

[34]. Cheng, F., et al., Divergent roles of histone deacetylase 6 (HDAC6) and histone deacetylase 11 (HDAC11) on the transcriptional regulation of IL10 in antigen presenting cells. Mol Immunol, 2014. 60(1): p. 44-53.

[35]. Woan, K.V., et al., Targeting histone deacetylase 6 mediates a dual anti-melanoma effect: Enhanced antitumor immunity and impaired cell proliferation. Mol Oncol, 2015. 9(7): p. 1447-1457.

[36]. He, Q., et al., A Decrease of Histone Deacetylase 6 Expression Caused by Helicobacter Pylori Infection is Associated with Oncogenic Transformation in Gastric Cancer. Cell Physiol Biochem, 2017. 42(4): p. 1326-1335.

[37]. Wang, F., et al., Comparative genomic study of gastric epithelial cells co-cultured with Helicobacter pylori. World J Gastroenterol, 2012. 18(48): p. 7212-24.

[38]. Santos, M.E., et al., Alternative splicing and gene duplication in the evolution of the FoxP gene subfamily. Mol Biol Evol, 2011. 28(1): p. 237-47.

[39]. Magg, T., et al., Subcellular localization of FOXP3 in human regulatory and nonregulatory T cells. Eur J Immunol, 2012. 42(6): p. 1627-38.

[40]. Van Gool, F., et al., A Mutation in the Transcription Factor Foxp3 Drives T Helper 2 Effector Function in Regulatory T Cells. Immunity, 2019. 50(2): p. 362-377.e6.

[41]. Xiong, Y., et al., Inhibiting the coregulator CoREST impairs Foxp3+ Treg function and promotes antitumor immunity. J Clin Invest, 2020.

[42]. Wang, L., et al., Ubiquitin-specific Protease-7 Inhibition Impairs Tip60-dependent Foxp3+ T-regulatory Cell Function and Promotes Antitumor Immunity. EBioMedicine, 2016. 13: p. 99-112.

[43]. Nishikawa, H. and S. Sakaguchi, Regulatory T cells in cancer immunotherapy. Curr Opin Immunol, 2014. 27: p. 1-7.

[44]. Zuo, T., et al., FOXP3 is a novel transcriptional repressor for the breast cancer oncogene SKP2. J Clin Invest, 2007. 117(12): p. 3765-73.

[45]. Yang, S., et al., FOXP3 promotes tumor growth and metastasis by activating Wnt/beta-catenin signaling pathway and EMT in non-small cell lung cancer. Mol Cancer, 2017. 16(1): p. 124.

[46]. Zhang, L., et al., The Role of Tumoral FOXP3 on Cell Proliferation, Migration, and Invasion in Gastric Cancer. Cell Physiol Biochem, 2017. 42(5): p. 1739-1754.

[47]. Jiang, C., et al., Clinical implications and characteristics of factor forkhead box protein 3 in gastric cancer. Exp Ther Med, 2011. 2(4): p. 667-673.

[48]. Ma, G.F., et al., High FoxP3 expression in tumour cells predicts better survival in gastric cancer and its role in tumour microenvironment. Br J Cancer, 2014. 110(6): p. 1552-60.

[49]. Cheng, H.H., et al., Increased numbers of Foxp3-positive regulatory T cells in gastritis, peptic ulcer and gastric adenocarcinoma. World J Gastroenterol, 2012. 18(1): p. 34-43.

[50]. Lemke, L.B., et al., Concurrent Helicobacter bilis infection in C57BL/6 mice attenuates proinflammatory H. pylori-induced gastric pathology. Infect Immun, 2009. 77(5): p. 2147-58.

五、研究方案

1．研究目标

研究并证实在 BA 的作用下 HDAC6/FOXP3/HNF4α 正反馈调控环路促进 BA 诱导肠化生发生和不断进展的科学假设，进一步揭示 HDAC6 通过表观遗传修饰促进胃癌癌前病变肠化生的发生机制，探索 HDAC6 作为阻止肠化生进一步发展胃癌的可能性和潜在价值。

2．研究内容及方案

2.1 HDAC6 在肠化生的表达、临床意义及对肠化标志分子的促表达作用

a) 肠化生组织：收集在空军军医大学西京消化病医院内镜中心诊断为 GIM 患者的 IM 组织及周围正常的胃粘膜组织，冻存于液氮中用于后期提取组织 RNA。再在本单位样本库挑选轻度、中度及中度 GIM 组织切片，qRT-PCR 法及免疫组织化学法检测该分子在肠化及配对正常组织中的表达水平（部分完成）；

b) 肠化生细胞模型：利用前期本课题建立的 BA 诱导肠化生细胞模型检测其的表达（部分完成）；

c) HDAC6 诱导肠化：利用慢病毒转染技术建立 HDAC6 过表达细胞系，Western blot、qRT-PCR 及免疫荧光技术检测该分子上调后对肠化生标志物 CDX2、KLF4 及 MUC2 的影响（部分完成）；

d) 功能回复：对 BA 诱导肠化细胞模型进行 HDAC6 的敲减处理，Western blot、qRT-PCR 及免疫荧光技术观察其对肠化的阻滞作用；

e) HDAC6 转基因小鼠模型：采用 CRISPR/Cas9 技术通过同源重组在 Rosa26 基因位点插入包含 HDAC6 的表达框，建立条件性过表达小鼠模型。包含 HDAC6 基因的 Rosa26 位点条件性过表达小鼠与 Cre 小鼠交配，其后代的双阳性小鼠中，Cre 表达的组织和细胞中 loxp-stop-loxp 表达框会被敲除，最终实现这些细胞中 HDAC6 基因在 CAG 启动子驱动下的过表达。小鼠模型建立成功后分别在 0,3,6,12 月对小鼠进行解剖，分别在大体及组织水平检测有无肠化生表型的出现。取得的组织分别进行石蜡包埋、冰冻切片、电镜液浸泡及液氮冻存。石蜡切片主要进行 HDAC6 过表达及 FOXP3 检测、观察有无杯状细胞出现。冰冻切片进行肠化标志物共定位检测，利用抗体来源属性的不同，使用带不同颜色的荧光二抗对一抗分子进行标记。电镜切片主要观察有无杯状细胞、粘液、细胞表面绒毛出现。液氮保存组织用来提取组织蛋白及 RNA，检测过表达基因、下游调控分子及肠化标志物变化。

2.2 HDAC6 及 BA 通过组蛋白去乙酰化修饰抑制 FOXP3 的表达

a) FOXP3 在肠化中的表达：首先利用 Western blot、qRT-PCR 及免疫组织化学染色等技术检测该分子在肠化细胞模型及患者肠化生组织中的表达水平，并与 HDAC6 进行相关性分析。b) FOXP3 组蛋白去乙酰化：对细胞进行 FOXP3 敲减或过表达后利用 Western blot 技术检测 H3 及 H4 组蛋白及其乙酰化 H3K27、H3K18 蛋及 H4K5 白表达水平，利用 ChIP 可以检测基因组特定区域染色质中组蛋白的乙酰化状态。

c) FOXP3 组蛋白乙酰化：同时对细胞进行 BA 及乙酰基转移酶 EP300 观察 FOXP3 总蛋白及组蛋白的表达水平，以确定BA会引起该分子组蛋白的去乙酰化，并对下游的肠化标志物CDX2、KLF4及MUC2进行检测；

d) FOXP3 抑制肠型标志分子的表达：对细胞分别转染 FOXP3 过表达及敲除病毒载体，之后观察其对肠化的影响；

e) 功能回复：构建 FOXP3 过表达慢病毒载体，分别对细胞进行 BA 或 HDAC6 联合 FOXP3 过表达载体的转染，接着利用 Western blot，免疫荧光等技术观察 FOXP3 对二者促肠化的抑制作用，以验证过表达 FOXP3 可以阻断 BA 或 HDAC6 对肠化标志分子的促表达作用；

2.3 FOXP3 结合并抑制 HNF4α 的表达

a) 预测 FOXP3 与 HNF4α 启动子区的结合位点：通过 Jaspar 及 Promo 等转录因子预测网站预测二者的结合位点，选取打分高的位点来构建引物序列；

b) 启动子活性检测：根据以上序列构建包含不同序列的报告基因质粒，对细胞进行转录因子 FOXP3 过表达质粒及不同的报告基因进行共转染，利用荧光素酶报告基因实验检测各区段启动子活性，根据结果判断 FOXP3 与 HNF4α 启动子结合位点；

c) 转录因子结合实验：根据上一步实验推测的启动子结合区利用ChIP实验或EMSA实验验证FOXP3可以与 HNF4α 启动子区进行结合；

d) FOXP3 抑制 HNF4α 表达：分别对 FOXP3 高表达细胞进行 FOXP3 过表达慢病毒转染及对低表达细胞进行 FOXP3 敲减后通过 Western blot，免疫荧光技术检测 HNF4α 表达水平变化；

e) FOXP3 与 HNF4α 在肠化组织中表达：利用免疫组化染色技术检测 HNF4α 在肠化组织及正常组织中的表达水平并进行对比，分析 HNF4α 与 FOXP3 表达的相关性；

2.4 HNF4α 结合并促进 HDAC6 的表达

a) HNF4α 对 HDAC6 启动子活化作用：同前，分析 HNF4α 激活 HDAC6 的启动子序列，以证明 HNF4α 对 HDAC6 的转录激活作用；

b) HNF4α 与 HDAC6 启动子区结合：根据荧光素酶报告基因结果构建二者可能作用序列的引物，并进行 ChIP 实验或者 EMSA 实验来证明转录因子 HNF4α 可以与 HDAC6 启动子区结合。

c) HNF4α 对 HDAC6 表达调控：构建 HNF4α 过表达慢病毒载体，利用 Western blot，qRT-PCR 及免疫荧光等技术检测 HDAC6 及 FOXP3 分子的表达变化，以证明该分子对 HDAC6 及其下游分子具有调控作用。接着构建其敲减小干扰 RNA 对其进行下调，对细胞同时进行 BA 联合 siHNF4α 或 HDAC6 过表达联合 siHNF4α 处理，观察 HNF4α 是否可以抑制 BA 及 HDAC6 对下游肠化标志分子的促表达作用；

d) 临床相关性分析：分别对比并分析 HNF4α 与 HDAC6 或 FOXP3 在肠化生患者组织中的相关性。

2.5 BA 对 HDAC6 的调控机制

a) 筛选 BA 作用受体：使用 BA 刺激细胞后检测其可能受体 FXR 及 TGR5 等的变化，筛选出可能的作用受体；

b) 受体对 HDAC6 的调控：分别用基因表达调控和激动剂两种手段改变受体分子的表达水平，接着检测 HDAC6 分子的表达水平；

c) 受体的中介作用：对细胞进行 BA 联合受体特异性抑制剂处理，观察此受体的封闭是否可以阻断 BA 对 HDAC6 及下游信号通路的激活作用，以确定其对 HDAC6/FOXP3/HNF4α 的调控。

3．拟解决的关键问题：

3.1 确定 HDAC6 在 BA 诱导胃肠化中的表达及功能是本研究的关键理论问题

乙酰化是核酸及蛋白质的一种重要修饰手段，组蛋白去乙酰化酶（Histone deacetylases, HDACs）及组蛋白乙酰基转移酶（Histone acetyl transferases, HATs）共同调控着组蛋白乙酰化的动态平衡，并进一步在染色体的动态变化、DNA 损伤应答及蛋白活性等方面发挥重要的作用。目前已证实蛋白的乙酰化修饰与神经系统疾病、代谢性疾病及肿瘤等疾病密切相关，而其是否参与了胃肠化生未见报道。既往研究表明 HDAC6 在肿瘤的发生发展中发挥了重要的作用，针对该家族分子制备的小分子化学抑制剂目前已被批准应用于急性淋巴细胞白血病、非小细胞肺癌及雌激素受体阳性的乳腺癌，充分肯定了对其进行研究的临床价值。该分子在肠道屏障功能的维持及再生方面具有重要的作用，同时在胃癌中也出现了显著的升高，提示该分子可能会参与肠化的发生。那么，确定 HDAC6 在胃肠化组织及细胞中的表达及其功能是本研究要解决的关键理论问题。通过检测肠化患者组织及肠化细胞模型中该分子的表达，我们证实其在肠化过程中明显升高，而对其进行干预后则会影响下游肠化标志物的表达。因此我们提出了 HDAC6 介导的去乙酰化修饰在 BA 诱导的肠化模型中发挥了重要作用的科学假设。解决这个科学问题将有利于我们理解乙酰化修饰方式在促进胃粘膜肠化生中的作用及机制。

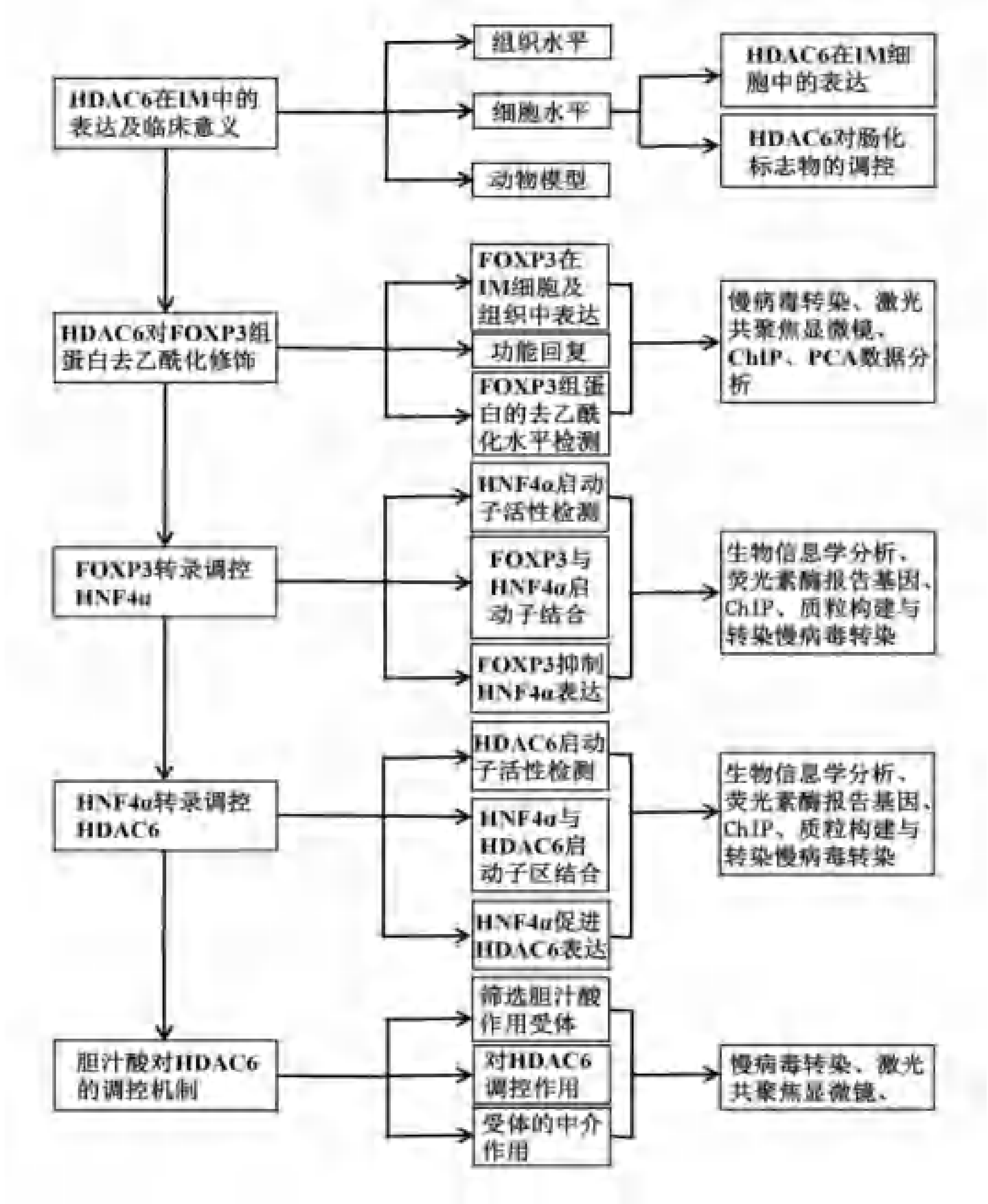
3.2 BA 诱导胃粘膜肠化小鼠模型的建立是本研究的关键技术问题

目前构建胃粘膜肠化生小鼠模型的方法主要包括三种：（1）手术，主要是胃肠吻合术，用于模拟人类的胆汁反流。这种方法的缺点是技术要求高，且小鼠在实验过程中的死亡率较高；（2）致癌剂，通过对小鼠周期性使用致癌剂诱导小鼠出现肠化并进一步发展为胃癌，但是此方法无法模拟出胆汁反流引起的肠化生；（3）转基因技术，对在肠化过程中起关键作用的分子如 CDX2，KLF4 等于小鼠胃粘膜进行特异性过表达来诱导肠化生的发生，这种方法可以较好的探索单个分子在引发肠化中的作用，但是同样也是无法验证 BA 的促肠化作用且试验周期较长。所以同时模拟胆汁反流及特异性研究 HDAC6 在肠化发生中的作用是本研究的关键技术问题。解决策略：构建 HDAC6 条件性过表达的转基因小鼠，促进该分子在小鼠胃粘膜特异性表达，同时对转基因鼠进行 BA 灌胃处理。通过对比单

纯转基因组及转基因加 BA 组既可以验证 BA 诱导肠化的作用，又可以探索 HDAC6 其中发挥的作用。这种方法在理论上可以缩短整个试验周期，同时可以使得本项目在小鼠体内水平得到很好的验证。

4．拟采取的核心研究方法及技术路线：

基因筛选及表达检测：RNA-seq、Western blot、qRT-PCR、免疫组化、免疫荧光；HDAC6 的去乙酰化作用：ChIP（组蛋白）、Western blot、质谱、基因突变、基因克隆、质粒构建、基因转染、病毒包装；FOXP3 及 HNF4α 转录功能研究：生物信息学分析、质粒构建、质粒转染、荧光素酶报告基因、ChIP（转录因子）、EMSA、基因突变、Western blot、qRT-PCR、免疫荧光；肠化标志物检测：Western blot、qRT-PCR、免疫荧光、免疫组化；肠化小鼠模型构建及验证：CRISPR/Cas9 技术、冰冻包埋、石蜡包埋、免疫组化、免疫荧光、电镜。



5．创新之处：

5.1 率先提出 HDAC6 介导的组蛋白乙酰化修饰参与 BA 介导胃粘膜肠化生的理论

组蛋白乙酰化是一种重要的表观遗传修饰方式，在包括肿瘤在内的多种疾病中发挥了重要的作用，但是在肠化中的作用未见报道。我们在前期的研究中利用 RNA-seq 技术发现 BA 诱导的肠化细胞模型中组蛋白去乙酰化酶 HDAC6 显著升高的现象，并进一步验证了该分子在肠化组织中表达水平明显高于正常组织，在肠化细胞中其 RNA 及蛋白水平呈显著升高且可以正向调控肠化标志分子。因此我们推测 HDAC6 可能通过去乙酰化作用参与了胃肠化生的进程，这个假设的提出既可以丰富肠化的表观调控方式，又可以合理解释 HDAC6 促进肠化发生的机制。而且此机制可能在胃癌的发生发展中也起到了重要的作用，这样有助于我们更好的理解从肠化进展到胃癌的分子机制。

5.2 率先揭示 HDAC6/FOXP3/HNF4α 正反馈环路在肠化生中的作用

在前期的预实验中我们首次发现在 BA 的刺激下及 HDAC6 过表达的情况下 FOXP3 均出现显著降低，提示该分子可能作为 HDAC6 下游靶点参与了肠化的过程。我们课题组在之前研究中已经证实 HNF4α 可以促进下游肠化标志分子的表达，而在本研究中，生物信息学分析结果显示 FOXP3 与该分子的启动子区具有结合位点，提示我们 FOXP3 可能转录调控 HNF4α。同时还发现 HDAC6 启动子区存在转录因子 HNF4α 的结合位点，因此我们首次提出在 BA 作用下 HDAC6、FOXP3 及 HNF4α 形成一个闭合环路促进肠化过程的发生。

6．研究工作的预期结果：

6.1 理论成果：本项目通过对 HDAC6 介导的乙酰化修饰介导了 BA 诱导胃肠化生的发生和进展这一研究假设的研究和证实，不仅能够阐明 HDAC6 在胃肠化生中的功能和机制，还将从表观遗传修饰的角度进一步理解和阐明这一过程，这些理论成果是既往从未报导过的。

6.2 论文发表：在国际主流 SCI 期刊上（IF>5）发表论著 1～2 篇，国内核心期刊发表 2～3 篇。

6.3 人才培养：培养 1 名博士生和 2～3 名硕士生。

7．年度工作计划及阶段目标：

2020.07—2020.12 检测 HDAC6 在肠化细胞及组织中的表达水平及对下游肠化标志物的调控，HDAC6 对 FOXP3 组蛋白的去乙酰化调控作用，动物模型的构建；

2021.01—2021.12 检测 FOXP3 在肠化细胞及组织中的表达水平，对肠化标志分子的调控作用，HNF4α 的转录调控作用；

2022.01—2022.12 检测 HNF4α 对 HDAC6 转录调控作用，及 HNF4α 对环路的促肠化作用的调控，动物模型的验证，探索 BA 对 HDAC6 的激活机制；

2023.01—2023.06 整理资料，撰写文章，参加国内外学术交流。

六、研究工作基础

1．与本项目有关的研究工作积累和已取得的研究工作成绩：

1.1 建立了稳定的 BA 诱导胃肠化生的细胞模型。为了更好的模拟胃粘膜肠化过程，我们选择了永生化的胃细胞系 GES-1 来构建肠化细胞模型。首先，在加药处理细胞前将细胞培养基换成无血清培养基饥饿处理 24h，已排除血清对药物的影响。接着，向培养基中加入 BA 继续培养 3-24h 后换回含血清培养基培养 48-72h 后提取 RNA 或蛋白及进行检测。经检测，利用这种方法处理细胞可以促进 CDX2、KLF4、MUC2、VIL1 等肠化标志物的显著升高，出现类似于肠细胞的表型。在前期我们利用此肠化细胞模型进行了一系列研究，得到了一些重要的发现。比如，BA 作用于细胞后首先激活了 FXR，再以一种 SHP 依赖性的调控方式促进了 CDX2 的表达（Zhou Haining, Shi Y, et al, ONCOLOGY LETTERS, 2018）；BA 还可以通过抑制胃细胞发育特异性转录因子的表达来促进 CDX2 的表达（Yuan T, Shi Y, et al, Cancer Cell Int, 2019）；miR92a/FOXD1/NF-κB 通路促进了 BA 刺激下 CDX2 过表达的肠化的发生（Li T, Shi Y, et al, GUT, 2019）。此外，本项目的细胞实验部分将在此模型的基础上展开。

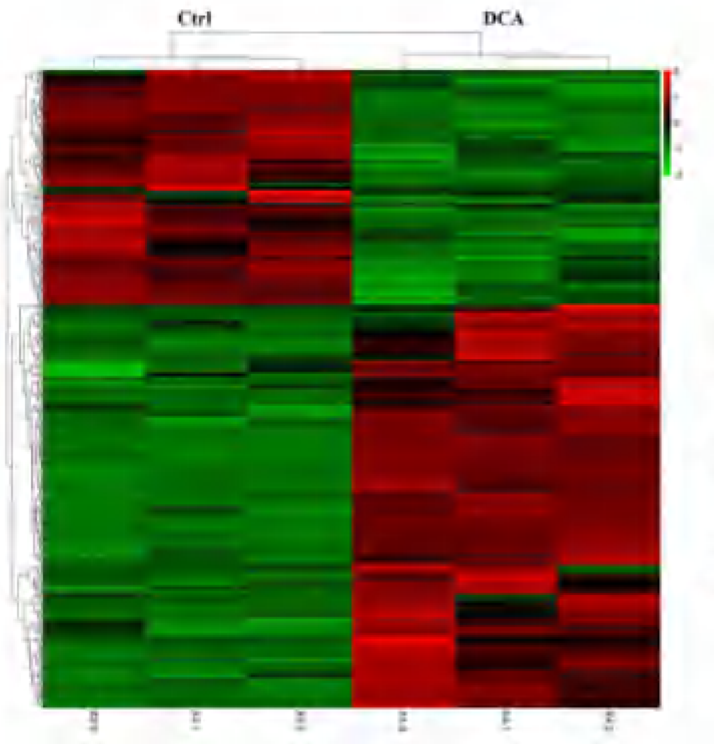
1.2 首次在 BA 诱导的胃肠化中发现并证实了 miR-92a 介导的信号通路（Li T, Shi Y, et al, GUT, 2019）。我们对上述肠化细胞模型进行 microRNA 测序，发现 BA 处理后引起了 miR-92 的显著升高，而在本课题组前期的研究中发现它在胃癌的发生和进展中起到了重要作用，因此我们推测该 microRNA 是否也参与了胃癌的癌前病变肠化生。肠化生是一系列肠相关转录因子变化导致的结果，因此我们对细胞模型又进行了转录因子测序。经过生物信息学分析及报告基因实验证实，miR-92a 可以通过作用于 FOXD1 的 3’UTR 区而抑制其表达。既往研究报道 NF-κB 可以转录调控 CDX2，而 NF-κB 分子的启动子区又有 FOXD1 的转录结合位点，报告实验及 ChIP 实验证实二者可以结合且 FOXD1 又可以对 NF-κB 进行转录调控。因此，我们证实了 mir-92a/FOXD1/NF-κB/CDX2 信号通路介导了 BA 诱导肠化生的发生。

1.3 胃癌增殖、转移分子机制的研究积累（Chao Lei, Shi Y, et al, Cell Death and Disease, 2017; Li hong, Shi Y, et al, Oncotarget, 2017; Wu qiong, Shi Yongquan, et al, Journal of Cell Science, 2013）。项目申请者长期从事胃癌增殖、转移分子机制的研究。对胃癌发生发展的分子机制、前沿进展以及存在的问题具有较为全面和深刻的理解与认识，结合自己的工作和研究结果，对胃癌发生、发展的分子机制有深刻的解析。

1.4 本项目预实验结果：

1.4.1 测序结果显示 DCA 处理后 HDAC6 显著升高

我们对 GES-1 细胞进行 DCA 处理，利用二代测序技术检测细胞中 mRNA 表达差异。结果显示 HDAC6 分子在 DCA 刺激下出现了显著的升高，提示我们该分子可能参与了 BA 诱导肠化的过程。下一步我们将在肠化患者的组织及肠化细胞模型中验证该分子的表达。



Gene	Fold Ctrl	Change DCA
HDAC6	0.0195	2.0744
MUC13	0.0220	0.7293
SLC7A7	0.0041	0.4988
MOGAT3	0.0098	0.5688
EPS8L3	0.0355	1.9983
CREB3L3	0.0449	1.8856
LBP	0.0318	1.4552
C11orf86	0.0467	2.1232
CYP21A2	0.0030	0.1433
HUNK	0.0035	0.1227

图 1：mRNA 测序显示 DCA 引起 GES-1 细胞中 HDAC6 的显著升高。红色代表上调的基因表达，绿色代表下调的基因表达。表格中显示了 DCA 处理后 10 种显著上调基因。

1.4.2 HDAC6 在肠化组织中呈高表达

接着，我们使用免疫组化技术检测 HDAC6 在正常组织、胃炎组织及肠化患者组织中的表达水平（图 2A），并进行了统计分析后可以看出与正常及胃炎组织相比该分子在肠化患者组织中显著升高（图 2B，2C）。同时我们在本院胃镜中心收集了 10 对肠化及周围正常组织，PCR 技术检测了该分子的 mRNA 水平，结果与芯片结果相似，该分子在肠化组织中明显高于正常组织（图 2D）。

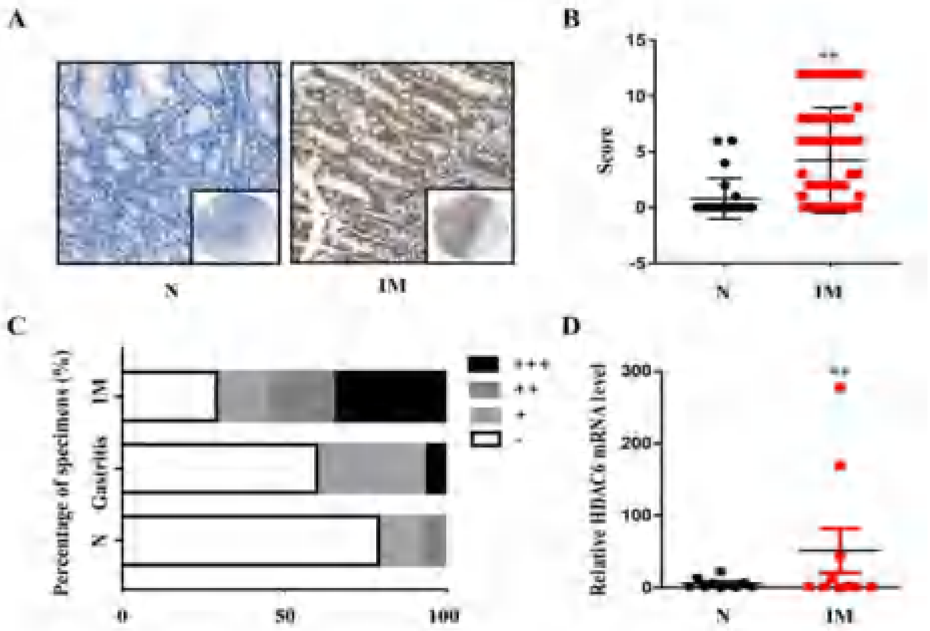


图 2：HDAC6 在胃肠化生组织中的表达。A：正常胃粘膜组织和肠化组织中 HDAC6 的免疫组化染色图片；B：HDAC6 表达水平的打分统计结果（**, $p < 0.01$）；C：HDAC6 在正常组织、胃炎组织及肠化生组织中的表达水平统计（-，阴性；+，1-4 分；++，5-8 分；+++，9-12 分）；D：10 对肠化组织及旁边正常组织中 HDAC6 的 mRNA 水平（**, $p < 0.01$）。

1.4.3 HDAC6 在 BA 诱导肠化细胞模型中显著升高

首先使用浓度梯度 DCA 刺激 GES-1 细胞，结果显示随着浓度的升高 HDAC6 的 mRNA 及蛋白水平逐渐表达升高，同时伴有肠化标志物 CDX2、KLF4 及 MUC2 的升高（图 3A，3B）。同时，免疫荧光结果也显示 100μM 的 DCA 引起 HDAC6 的显著升高（图 3D）。此外，我们还对小鼠原代胃粘膜细胞进行培养，接着对细胞进行 DCA 刺激，可以看出在原代细胞中 DCA 也可以促进 HDAC6 的表达（图 3C）。

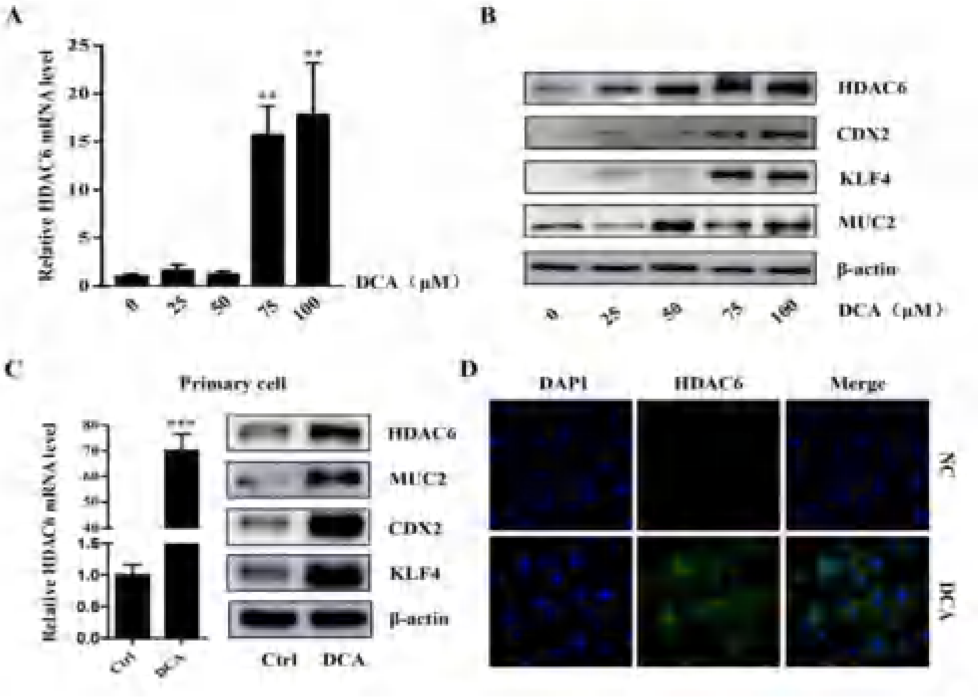


图 3：DCA 促进胃细胞中 HDAC6 的表达。A：浓度梯度 DCA 引起 GES-1 细胞中 HDAC6 的 mRNA 水平升高（**, $p < 0.01$）；B：浓度梯度 DCA 引起 HDAC6 蛋白水平升高；C：100μM 的 DCA 引起小鼠原代胃粘膜细胞中 HDAC6 的 mRNA 及蛋白水平的升高（***, $p < 0.001$）；D：100μM 的 DCA 刺激 GES-1 细胞后的免疫荧光图。

1.4.4 HDAC6 调控肠化标志物的表达

对 HDAC6 高表达的 AGS 细胞系进行 siHDAC6 处理后，可以发现 HDAC6 降低的同时伴随下游肠化标志物的降低，说明该分子对这几种标志物存在一定的调控作用。

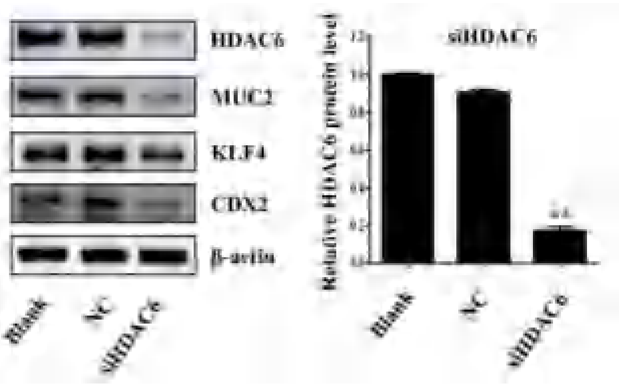


图 4：HDAC6 影响下游肠化标志物的表达。SiHDAC6 可以引起下游 CDX2、KLF4 及 MUC2 的降低。

1.4.5 HDAC6 抑制 FOXP3 表达

对 GES-1 细胞进行 DCA 处理后，提取蛋白以检测 FOXP3 蛋白水平，可以看出 DCA 抑制了 FOXP3 表达，结果与我们预期相符（图 5A）。接着，我们对 GES-1 细胞进行 HDAC6 过表达病毒及其阴性对照病毒转染后检测该分子变化，结果显示与 DCA 作用相似，HDAC6 的过表达引起了 FOXP3 的降低（图 5B），说明 HDAC6 确实可以抑制 FOXP3 分子的表达。接着对 GES-1 细胞进行 HDAC6 及 FOXP3 过表达病毒共转染后检测蛋白变化，可以看出 HDAC6 引起的下游 HNF4α 和肠化标志分子 CDX2、MUC2 及 KLF4 的升高能够被 FOXP3 抑制（图 5C）。相应地，在 AGS 细胞中 siFOXP3 可以引起下游 HNF4α 及下游肠化标志分子的显著升高（图 5D）。以上结果表明 HDAC6 可以降低 FOXP3 的表达，HNF4α 位于 FOXP3 分子的下游并受其逆向调控，同时下游的肠化分子也可被 FOXP3 抑制。

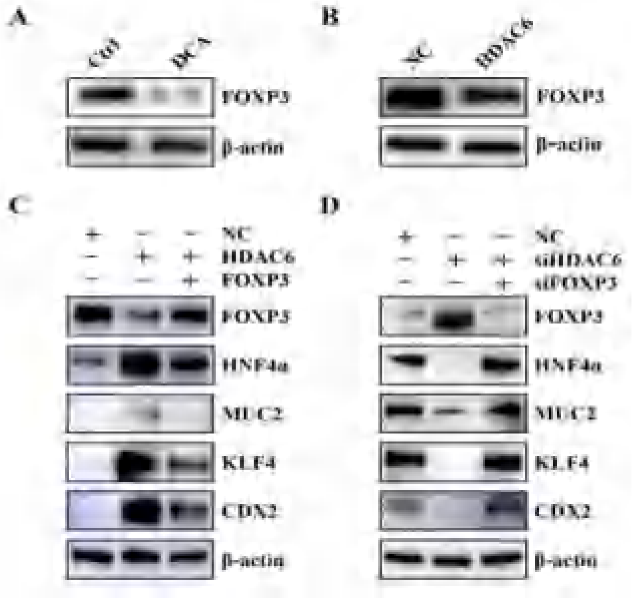


图 5：DCA 及 HDAC6 抑制 FOXP3 表达。A：Western blot 技术检测 DCA 处理 GES-1 细胞后 FOXP3 蛋白表达水平；B：GES-1 细胞进行 HDAC6 过表达后，利用 Western blot 技术检测 FOXP3 蛋白表达水平；C：在 GES-1 细胞中共转染 HDAC6 及 FOXP3 过表达慢病毒后利用 Western blot 技术检测 FOXP3，HNF4α 及肠化标志分子表达水平；D：对 AGS 细胞共转染 siHDAC6 及 siFOXP3 后检测下游分子变化。

2．已有的主要工作条件、尚缺少的实验条件及解决途径：

申请者所在单位为肿瘤生物学国家重点实验室，隶属于第四军医大学西京消化病医院，是一个集门急诊、临检中心、内镜中心、手术室、监护室、10 个病区 370 张床位为一体的消化专科医院。实验室先后承担了国家"973"项目首席科学家课题 1 项、"973"子课题 3 项、国家"863"课题 6 项，国家自然科学基金重大项目 1 项、面上项目 75 项、重点项目 2 项。研究队伍中有从美英日等国学成归来的中青年学者 26 名，其中中国工程院院士 1 名、长江学者特聘教授 4 名、国家杰出青年基金获得者 3 名，2009 年 1 人任中华消化学会主委，1 人获任中华消化学会常委兼秘书长，1 人当选 2013 年世界消化病大会主席。该团队 2001 年被国家自然科学基金委批准为首批创新研究群体。曾获国家科技进步一等奖 1 项、二等奖 1 项、三等奖 1 项，国家技术发明三等奖 1 项，军队科技进步一等奖 2 项，陕西省科技进步一等奖 2 项。近五年来在国际杂志发表论文 212 篇，平均影响因子 4.31 分，包括 Lancet、Gut、 Hepatology、PLoS Genet、JAMA、Nat Clin Pract Oncol、Ann Intern Med、JBC、 Clin Cancer Res、FASEB J、JCMM、Carcinogenesis、Proteomics、Mol Cancer Res 等。实验室总面积 3300 平方米，内设分子生物学实验室、蛋白组学实验室、基因芯片实验室、形态学实验室、载体室、细胞培养室、P2 病毒载体细胞培养室、单克隆抗体室、同位素实验室等。设备有包括：MALDI-TOF-TOF（ABscix）、QTRAP5500（Abscix）及其相关 Nano-HPLC、细胞高内涵检测（Cellomics，Thermos）、共聚焦显微镜（Olympus）、蛋白双向电泳系统(Bio-Rad)、Bio-RAD 蛋白分析 DIGE 全套系统，紫外检测扫描仪、蛋白质分析和纯化装置、超低温冰箱、低温超速离心机、流式细胞仪、384 孔 Roche480 Real-time PCR 仪、超纯水仪、电穿孔仪、无菌间及超净台、CO2 孵箱、倒置显微镜、PCR 仪、Bio-Rad 凝胶成像系统、冰冻切片机、自动脱水机等，固定资产价值 2500 余万元。研究所有近 1000 平方米的国际分子医学研究中心，与美国耶鲁大学、西北大学和英国牛津大学等多所大学的相关实验室有固定、长期实质性的研究协作。这将为我们的科研工作提供极大的支持。

3．课题负责人简介（包括负责人学历和研究工作简历，近期已发表与本项目有关的主要论著目录和获得学术奖励情况及在本项目中承担的任务。论著目录要求详细列出所有作者、论著题目、期刊名或出版社名、年、卷（期）、起止页码等；奖励情况也须详细列出全部受奖人员、奖励名称等级、授奖年等）：

项目申请者时永全博士，现任空军军医大学西京消化病院主任医师，教授，长期从事消化道肿瘤恶性演变的分子机制研究。课题负责人 2015 年入选国家中青年科技创新领军人才，2016 年入选国家万人计划，2017 年当选中华医学会内科学分会委员，2018 年当选中华医学会消化病学分会委员和消化肿瘤协作组组长，并荣获国之名医青年新锐。申请者及其所在实验室长期从事胃癌防治的研究工作，具有雄厚的理论与成果积累，"胃癌恶性表型相关分子群的发现及其序贯预防策略的建立和应用"于 2008 年 12 月获国家科技进步一等奖（申请者排名第 4），"第四军医大学消化系肿瘤研究创新团队"于 2016 年 12 月获国家科技进步创新团队奖（申请者排名第 11）。课题负责人在本项目中主要负责制定实验

方案，检查试验记录及原始数据，分析研究结果。

1) Ting Li, Hanqing Guo, Hong li, Yanzhi Jiang, Kun Zhuang, Chao Lei, Jian Wu, Haining Zhou, Ruixue Zhu, Xiaodi Zhao, Yuanyuan Lu, Chongkai Shi, Yongzhan Nie, Kaichun Wu, Zuyi Yuan, Dai-Ming Fan, Yongquan Shi. MicroRNA-92a-5p increases CDX2 by targeting FOXD1 in bile acids-induced gastric intestinal metaplasia. Gut, 2019 Oct, 68(10):1751-1763.

2) Ting Yuan, Zhen Ni, Chuan Han, Yali Min, Nina Sun, Caifang Liu, Miao Shi, Wenquan Lu, Na Wang, Feng Du, Qiong Wu, Ning Xie and Yongquan Shi. SOX2 interferes with the function of CDX2 in bile acid-induced gastric intestinal metaplasia. Cancer Cell Int. 2019 Jan 31;19:24.

3) Haining Zhou, Zhen Ni, Ting Li, Linna Su, Lianfeng Zhang, Na Liu and Yongquan Shi. Activation of FXR promotes intestinal metaplasia of gastric cells via SHP-dependent upregulation of the expression of CDX2. Oncology Letter. 2018 May 15(5):7617-7624.

4) Li H, Wu Q, Li T, Liu C, Xue L, Ding J, Shi Y, Fan D. The miR-17-92 cluster as a potential biomarker for the early diagnosis of gastric cancer: evidence and literature review. Oncotarget, 2017, 8(28): 45060-45071.

5) Li T, Guo H, Zhao X, Jin J, Zhang L, Li H, Lu Y, Nie Y, Wu K, Shi Y, Fan D. Gastric cancer cell proliferation and survival is enabled by a cyclophilin B/STAT3/microRNA-520d-5p signaling feedback loop. Cancer Res, 2017,77(5): 1227-1240.

6) Ke L, Zhang D, Chen Y, Zhang L, Zhu S, Wang A, Shang L, Cui X, Liu X, Shi Y, Fan D. Risk Factors of Intestinal Metaplasia in Northwest of China. J Clin Gastroenterol Treat. 2016;2:033.

7) Zhao XD, Lu YY, Guo H, Xie HH, He LJ, Shen GF, Zhou JF, Li T, Hu SJ, Zhou L, Han YN, Liang SL, Wang X, Wu KC, Shi YQ, Nie YZ, Fan DM. MicroRNA-7/NF-κB signaling regulatory feedback circuit regulates gastric carcinogenesis. J Cell Biol. 2015 Aug 17; 210 (4):613-27.

8) Su L, Liu X, Chai N, Lv L, Wang R, Li X, Nie Y, Shi Y, Fan D. The transcription factor FOXO4 is down-regulated and inhibits tumor proliferation and metastasis in gastric cancer. BMC Cancer. 2014 May 28;14:378.

9) Li T, Lu YY, Zhao XD, Guo HQ, Liu CH, Li H, Zhou L, Han YN, Wu KC, Nie YZ, Shi YQ, Fan DM. MicroRNA-296-5p increases proliferation in gastric cancer through repression of Caudal-related homeobox 1. Oncogene. 2014 Feb 6; 33(6):783-93.

10) Wang F, Li T, Zhang B, Li H, Wu Q, Yang L, Nie Y, Wu K, Shi Y, Fan D. MicroRNA-19a/b regulates multidrug resistance in human gastric cancer cells by targeting PTEN. Biochem Biophys Res Commun. 2013 May 10;434(3):688-94.

11) 聂爱英，梁丽娟，雷超，刘娜，时永全。饮食和生活习惯与胃癌的相关性研究进展。现代生物医学进展，2017；17(3):578-581.

12) 柯丽，张迪，陈瑜，张林慧，朱绍华，王安辉，尚磊，时永全。中国西北地区胃黏膜肠上皮化生危险因素调查。现代生物医学进展，2016；16 (34):6639-6643.

13) 柯丽，张迪，时永全。胃黏膜肠上皮化生的危险因素。世界华人消化杂志，2016；24(9): 1307-1314.

14) 张迪，柯丽，时永全。重视胃黏膜肠上皮化生的随访与监测。中华消化杂志，2015；35(3):155-157.

15) 苏琳娜，刘向强，吕丽芬，聂勇战，时永全。FXR 在胃黏膜肠化生及胃癌中的表达及其意义研究。现代生物医学进展，2014；14:1875-1878.

16) 张斌，时永全。胃黏膜肠化生调控分子的研究进展。中华消化病与影像杂志（电子版），2013；3（3）：157-161.

申 请 者：时永全

项目名称：HDAC6介导的去乙酰化修饰在胆汁酸诱导胃肠化生过程中的作用机制研究

资助类别：面上课题/自由探索课题

申请者承诺：

我保证申请书内容的真实性。如果获得基金资助，我将履行项目负责人职责，严格遵守肿瘤生物学国家重点实验室的有关规定，切实保证研究工作时间，认真开展工作，按时报送有关材料。若填报失实和违反规定，本人将承担全部责任。

签 字：

年 月 日

肿瘤生物学国家重点实验室（第四军医大学）审批意见：

盖 章

年 月 日