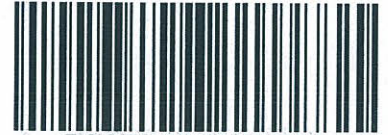


受理编号: _____

项目编号: 2016A030313769

文件编号: 粤科规财字(2016) 49号



2016A030313769

广东省自然科学基金项目 合同书

项目名称: 胰腺癌中miR-217精密调节丙酮酸激酶选择性表达的机制及作用研究

项目类别: 广东省自然科学基金-自由申请

项目起止时间: 2016-06-01 至 2019-06-01

管理单位(甲方): 广东省自然科学基金管理委员会

依托单位(乙方): 广东省人民医院(广东省医学科学院)

通讯地址: 广东省广州市越秀区广州市中山二路106号

邮政编码: 510080

单位电话: 020-83827812-20984

项目负责人: 侯宝华

联系电话: 020-83827812-60822

项目联系人: 侯宝华

联系电话: 13609006510

广东省科学技术厅
二〇一四年制

一、主要研究内容和要达到的目标

研究内容:

1. 细胞及动物实验观察miR-217对胰腺癌细胞糖代谢和增殖能力的影响

1.1 细胞试验通过建立miR-217稳定转染的胰腺癌细胞株;动物实验利用稳定转染miR-217或无义链对照的胰腺癌细胞株进行裸鼠皮下成瘤;

1.2 分析检测细胞永生化和糖代谢相关的指标,包括:1)细胞周期,2)凋亡比例,3)生长曲线,4)细胞增殖,5)糖酵解和氧化磷酸化关键酶的表达水平,6)代谢产物浓度分析,7)原位检测miR-217和PKM1、PKM2水平。

2. 分析miR-217调控PKM选择性剪切的机制

2.1 细胞水平证实miR-217靶向hnRNPA1和hnRNPA2:1)通过PCR和WB对miR-217、hnRNPA1、hnRNPA2、PKM1、PKM2的表达相关性进行研究;2)双荧光素酶报道基因验证miR-217对hnRNPA1和hnRNPA2 3'UTR的靶向性;

2.2 在稳定转染miR-217的细胞中分别转染包含hnRNPA1或hnRNPA2开放阅读框的质粒,分析一下指标以探讨miR-217对PKM的调控是否依赖hnRNPA1与hnRNPA2:1)细胞增殖;2)糖酵解率;3)细胞耗氧分析;4)PKM1与PKM2的表达水平。

3. 探讨PKM1通过结合FoxA1调控miR-217表达

3.1 细胞水平证实PKM1结合FoxA1:1)Co-IP研究内源性以及外源性蛋白(Flag-PKM1, HA-FoxA1)的结合关系;2)激光共聚焦实验及细胞核Western研究分析两者的共定位;

3.2 细胞水平证实miR-217表达受PKM1/FoxA1调控:1)ChIP分析miR-217启动子区域PKM1与FoxA1的结合情况与结合序列;2)野生型及突变型miR-217启动子报道载体分析;3)调控PKM1与FoxA1表达后对miR-217表达水平的影响分析。

研究目标:

1. 揭示miR-217对胰腺癌糖代谢及增殖的调控作用

2. 阐明miR-217调控PKM选择性剪切的机制

3. 探讨PKM1通过与FoxA1结合促进miR-217的表达这一正反馈机制

二、研究成果及形式

| | | | | | | | | |
|---------|------------------------|----|--------|----|--------|----|------|----|
| 论文及专著情况 | 国家统计局刊物以上刊物 发表论文(篇) | | 22 | | 专著(册) | | 0 | |
| 专利情况(项) | 发明专利 | | 实用新型专利 | | 外观设计专利 | | 国外专利 | |
| | 申请 | 授权 | 申请 | 授权 | 申请 | 授权 | 申请 | 授权 |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 其他 | | | | | | | | |

三、项目进度和阶段目标

1. 项目起止时间： 2016-06-01 至 2019-06-01

2. 项目实施进度及阶段主要目标：

| 开始日期 | 结束日期 | 主要工作内容 |
|------------|------------|---|
| 2016-06-01 | 2016-12-31 | miR-217的体内、体外调控肿瘤增殖、糖代谢的生物学功能 |
| 2017-01-01 | 2017-12-31 | 明确miR-217对hnRNPA1、hnRNPA2的靶向性，证实miR-217对PKM选择性剪切的重要作用 |
| 2018-01-01 | 2018-12-31 | 体内实验验证PKM1/FoxA1对miR-217的调控作用，建立正反馈调节的假说 |
| 2019-01-01 | 2019-06-01 | 整理数据，撰写论文 |

四、项目总经费及省科技厅经费预算

| | | | | | |
|--------------------------------------|--|----|--------|----|---------|
| 1. 省科技厅经费下达总额：（大写）壹拾万圆整；（小写）10.00万元； | | | | | |
| 2. 省科技厅经费年度下达计划： | | | | | |
| 年度 | 2016 年 | 年 | 年 | 年 | 年 |
| 经费(万元) | 10.00 | | | | |
| 3. 总经费开支预算计划： | | | | | |
| 经费筹集情况： | | | | | (单位：万元) |
| 省科技厅经费 | 自筹资金 | | | | 合计 |
| | 自有资金 | 贷款 | 地方政府投入 | 其它 | |
| 10.00 | | | | | 10.00 |
| 政府部门、境外资金及其他资金投入情况说明： | <div style="position: relative; height: 300px;"> 2016A030313769 </div> | | | | |
| | | | | | |

广东省自然科学基金项目合同书

| 经费预算 | | | (单位: 万元) | |
|-----------|-------|---|----------|---|
| | 总投入经费 | | 省科技厅经费 | |
| 支出经费 | 经费额 | 用途说明 | 经费额 | 用途说明 |
| 科研业务费: | 2.50 | 流式细胞仪细胞检测、病理切片、荧光显微镜、测序及在SCI杂志发表版面费和彩图费等 | 2.50 | 流式细胞仪细胞检测、病理切片、荧光显微镜、测序及在SCI杂志发表版面费和彩图费等 |
| 实验材料费: | 4.50 | 各种抗体及检测试剂盒、质粒、脂质体、细胞培养、细胞增殖/凋亡检测; 动物购买、饲养及实验耗材等 | 4.50 | 各种抗体及检测试剂盒、质粒、脂质体、细胞培养、细胞增殖/凋亡检测; 动物购买、饲养及实验耗材等 |
| 仪器设备费: | 0 | 本研究无需购置仪器设备 | 0 | 本研究无需购置仪器设备 |
| 实验室改装费: | 0 | 本研究无需改装实验室 | 0 | 本研究无需改装实验室 |
| 协作费: | 0 | 无 | 0 | 无 |
| 人员费: | 1.50 | 直接参加项目研究的研究生、博士后的劳务费用 | 1.50 | 直接参加项目研究的研究生、博士后的劳务费用 |
| 专家咨询费: | 0 | 无 | 0 | 无 |
| 国际合作与交流费: | 1.00 | 参加国际肝病学会学术交流、差旅费 | 1.00 | 参加国际肝病学会学术交流、差旅费 |
| 管理费: | 0.50 | 管理费, 按5%计算 | 0.50 | 管理费, 按5%计算 |
| 合计: | 10.00 | 总研究费用 | 10.00 | 总研究费用 |

五、人员信息

| 项目负责人 | | | | | | | | |
|-------|--------------------|----|----|----|-------|-----------|-------------------|-----|
| 姓名 | 证件号码 | 年龄 | 性别 | 职称 | 学历 | 在项目中承担的任务 | 所在单位 | 签名 |
| 侯宝华 | 410102196510269010 | 51 | 男 | 教授 | 博士研究生 | 免疫组化、PCR | 广东省人民医院（广东省医学科学院） | 侯宝华 |

| 项目组主要成员 | | | | | | | | |
|---------|--------------------|----|----|---------|----|-------------|-------------------|-----|
| 姓名 | 证件号码 | 年龄 | 性别 | 职称 | 学历 | 在项目中承担的任务 | 所在单位 | 签名 |
| 余敏 | 440981198603198139 | 30 | 男 | 医师 | 博士 | 分子生物学实验 | 广东省人民医院（广东省医学科学院） | 余敏 |
| 罗彩霞 | 440106198306194023 | 33 | 女 | 主管护师 | 学士 | 临床病例资料整理与分析 | 广东省人民医院（广东省医学科学院） | 罗彩霞 |
| 陈盛 | 51010219681024613x | 48 | 男 | 副主任医师 | 硕士 | 生化及代谢实验 | 广东省人民医院（广东省医学科学院） | 陈盛 |
| 王慧玲 | 362322198303166636 | 33 | 男 | 主治（管）医师 | 硕士 | 分子生物学实验 | 广东省人民医院（广东省医学科学院） | 王慧玲 |

广东省自然科学基金项目合同书

| | | | | | | | | |
|-----|--------------------|----|---|-----|----|---------|-------------------|-----|
| 卢昕 | 510302198806210513 | 28 | 男 | 医师 | 博士 | 动物实验 | 广东省人民医院（广东省医学科学院） | 卢昕 |
| 常亮 | 150430198109090193 | 35 | 男 | 未取得 | 硕士 | 动物实验 | 广东省人民医院（广东省医学科学院） | 常亮 |
| 李智德 | 654201199001012111 | 26 | 男 | 未取得 | 学士 | 生化及代谢实验 | 广东省人民医院（广东省医学科学院） | 李智德 |
| 李德智 | 441621199011194030 | 26 | 男 | 未取得 | 硕士 | 分子生物学实验 | 广东省人民医院（广东省医学科学院） | 李德智 |

六、依托单位与合作单位的合作协议

| 承担/参与单位名称 (盖章) | 工作分工 | 总经费分摊 (万元) | 省科技厅经费分配 (万元) |
|--------------------|-----------|---------------|------------------|
| 广东省人民医院 (广东省医学科学院) | 项目牵头、负责单位 | 10.00 | 10.00 |
| | 合计 | 10.00 | 10.00 |

七、合同条款

第一条 甲方与乙方根据《中华人民共和国合同法》及国家有关法规和规定，为顺利完成（2016）年胰腺癌中miR-217精密调节丙酮酸激酶选择性表达的机制及作用研究 专项项目（文件编号：粤科规财字（2016）49号）经协商一致，特订立本合同，作为甲乙双方在项目实施管理过程中共同遵守的依据。

第二条 甲方的权利义务：

1. 按合同书规定进行经费核拨的有关工作协调。
2. 根据甲方需要，在不影响乙方工作的前提下，定期或不定期对乙方项目的实施情况和经费使用情况进行检查或抽查。
3. 根据《广东省科技计划项目信用管理办法(试行)》对乙方进行科技计划信用管理。

第三条 乙方的权利义务：

1. 确保落实自筹经费及有关保障条件。
2. 按合同书规定，对甲方核拨的经费实行专款专用，单独列账，并随时配合甲方进行监督检查。
3. 使用财政资金采购设备、原材料等，按照《广东省实施〈中华人民共和国招标投标法〉办法》有关规定，符合招标条件的须进行招标。
4. 项目实施完成或实施到一定程度，须按照《广东省省级科技计划项目结题管理的实施细则（试行）》提出验收或终止结题的申请，并按甲方要求做好项目结题工作。
5. 在每年规定时间内向甲方如实提交上年度工作情况报告，报告内容包含上年度项目进展情况、经费决算和取得的成果等。
6. 按照国家和省有关规定，提交科技报告及其他材料。

第四条 在履行本合同的过程中，如出现广东省相关政策法规重大改变等不可抗力情况，甲方有权对所核拨经费的数量和时间进行相应调整。

第五条 对分年度拨款（滚动资助）项目，甲方有权利根据项目研究进展或中期考核情况变更或中止项目后续资助经费数额。

第六条 在履行本合同的过程中，当事人一方发现可能导致项目整体或部分失败的情形时，应及时通知另一方，并采取适当措施减少损失，没有及时通知并采取适当措施，致使损失扩大的，应当就扩大的损失承担责任。

第七条 本项目技术成果的归属、转让和实施技术成果所产生的经济利益的分享，除双方另有约定外，按国家和广东省有关法规执行。

第八条 根据项目具体情况，经双方另行协商订立的附加条款，作为本合同正式内容的一部分，与本合同具有同等效力。

第九条 本合同一式三份，各份具有同等效力。甲、乙方及课题负责人各执一份，三方签字、盖章后即生效，有效期至项目结题后一年内。各方均应负合同的法律责任，不应受机构、人事变动的影响。

第十条 乙方必须接受甲方聘请的本项目合同监理单位的监督和管理。监理单位按照甲方赋予的权利对本项目合同的履行进行审核、进度调查，对项目合同变更、经费使用情况进行监督管理及组织项目验收。

说明：1. 本合同书中，凡是当事人约定无需填写的内容，应在空白处划（/）。

2. 委托代理人签订本合同书的，应出具合法、有效的委托书。

八、本合同签约各方

管理单位（甲方）： 广东省自然科学基金管理委员会 （盖章）

法定代表人（或法人代理）：  （签章）



依托单位（乙方）： 广东省人民医院（广东省医学科学院） （盖章）

法定代表人（或法人代理）： 庄建  （签章）

联系人（项目主管）姓名： 周志凌  （签章）

Email: gghkjc@sina.com

电话： 020-83827812-20984

开户单位名称： 广东省人民医院

开户银行名称： 广州市工商银行白云路支行

开户银行帐号： 3602004409001385770

2016 年 6 月 17 日

联系人（课题负责人）姓名： 侯宝华 （签名）

Email: hbh1000@126.com

电话： 020-83827812-60822



2016 年 6 月 6 日

项目编号： 20191A011096

下达文号： 穗卫科教【2019】2号

广州市卫生健康科技项目 合同书

(2019年度)

项 目 名 称： 负载MUC1-VNTRn外泌体的优化构建及其抗胰腺癌作用的研究

项 目 类 别： 西医类-一般引导项目

管理单位（甲方）： 广州市卫生健康委员会

承担单位（乙方）： 广州医科大学附属肿瘤医院

推荐单位（丙方）： 广州医科大学

项 目 负 责 人： 龚远锋

手机： 13580310453

项 目 联 系 人： 龚远锋

手机： 13580310453

起 止 时 间： 2019年05月01日 -- 2021年04月30日

广州市卫生健康委员会
二〇一九年制



一、申报单位基本情况

| | | | | | | | | | | |
|----------------|--------|----|-------------------------|-----|----------|------------|-----|--------------------|-----|----|
| 单位 基本 信息 | 单位名称 | | 广州医科大学附属肿瘤医院 | | | 机构代码 | | 12440100455350760C | | |
| | 单位地址 | | 广州市越秀区横枝岗78号 | | | | | | | |
| | 单位网址 | | http://www.gzcancer.com | | | | | | | |
| | 推荐单位 | | 广州医科大学 | | | 单位科技管理部门名称 | | 科研管理科 | | |
| | 单位现有专利 | | | | | | | | | |
| | 总数 | 60 | 已申请 | 40 | 其中 发明 | 已申请 | 24 | 其中 实用型 专利 | 已申请 | 16 |
| 已授权 | | | 20 | 已授权 | | 8 | 已授权 | | 12 | |

二、项目基本情况

| | | | | | |
|-----------|---------------------------------|-------|------------------|-------------|-------------------|
| 项目名称 | 负载MUC1-VNTRn外泌体的优化构建及其抗胰腺癌作用的研究 | | | | |
| 项目类别 | 西医类-一般引导项目 | | | | |
| 项目起止时间 | 2019年05月01日 -- 2021年04月30日 | | | | |
| 主题词 | 胰腺癌；外泌体；核酸疫苗；粘蛋白1；树突状细胞 | | | | |
| | 姓名 | 职务 | 办公电话 | 手机 | E-mail |
| 项目负责人 | 龚远锋 | 主治医师 | 02066673666-3655 | 13580310453 | medgongyf@126.com |
| 项目联系人 | 龚远锋 | 主治医师 | 02066673777-3655 | 13580310453 | medgongyf@126.com |
| 所属学科分类及代码 | | 肿瘤免疫学 | | | |

项目内容和预期结果摘要

胰腺癌是消化道肿瘤中恶性程度最高的肿瘤之一，手术切除率低，对放化疗及靶向治疗效果欠佳，预后极差。在胰腺癌上皮细胞中MUC1高表达且糖基化不完全，使其胞外段特异性串联重复序列（variable numbers of tandem repeats, VNTR）暴露而成为胰腺癌免疫治疗的靶点。申请者在参与国家自然科学基金项目中（81000917，81370059）已筛选出了体外抑瘤作用较强的胰腺癌特异性MUC1-VNTR6核酸疫苗，并用PAMAM树枝状高聚物作为核酸疫苗的载体进行系列体内实验，但其体内的抑瘤效果仍欠佳。外泌体可用于携带肿瘤相关抗原，在外周循环中高效转运，并能诱导特异性免疫应答。最新研究还发现细胞外囊泡内化受体（EVIR），可有效促进树突状细胞特异性摄入标记外泌体，并增强其抗原提呈能力。本项目通过比较不同来源外泌体来优化构建负载MUC1-VNTRn外泌体载体体系，同时构建anti-MUC1 EVIR树突状细胞，以期最大限度优化和提高MUC1-VNTRn核酸疫苗免疫应答能力，并深入探索树突状细胞摄入和呈递抗原的具体机制，研究结果有望改善胰腺癌免疫治疗效果不佳的现状。

三、参加人员

1. 项目负责人

| | | | | | | | |
|------|------|------|-----|-----|----|-----|-------|
| 姓 名 | 龚远锋 | 性 别 | 男 | 年 龄 | 33 | 学 历 | 硕士研究生 |
| 技术职称 | 主治医师 | 从事专业 | 外科学 | | | 职 务 | 主治医师 |

本人将履行项目负责人职责，严格遵守广州市卫生健康科技项目的有关规定，切实保证研究工作时间，并组织项目组成员按计划认真开展研究工作，按时报送有关材料。

签名：

2. 其它参加人员

| 姓名 | 性别 | 年龄 | 技术职称 | 工作单位 | 承担项目工作 | 签名 |
|-----|----|----|------|--------------|-------------------------|----|
| 唐云强 | 男 | 53 | 主任医师 | 广州医科大学附属肿瘤医院 | 标基因片段的合成，慢病毒载体、稳转细胞株的构建 | |
| 朱满生 | 男 | 32 | 主治医师 | 广州医科大学附属肿瘤医院 | 外泌体分离、鉴定 | |
| 徐睿 | 男 | 30 | 主治医师 | 广州医科大学附属肿瘤医院 | Western Blot、PCR | |
| 唐辉 | 男 | 31 | 医师 | 广州医科大学附属肿瘤医院 | Elispot、ELISA、流式细胞仪检测 | |
| 林坤鹏 | 男 | 29 | 医师 | 广州医科大学附属肿瘤医院 | 树突状细胞的诱导、培养 | |
| 吴万波 | 男 | 26 | 其他 | 广州医科大学附属肿瘤医院 | 肿瘤细胞培养 | |
| 张伯活 | 男 | 29 | 其他 | 广州医科大学附属肿瘤医院 | 动物实验 | |

四、项目内容（研究目标、内容和拟解决的关键问题）

【研究目标】

- [1] 在正常细胞、肿瘤细胞、血浆来源外泌体中筛选出能稳定可靠负载核酸疫苗的外泌体；
- [2] 比较外泌体、纳米材料、脂质体的转运效率及其诱导特异性免疫应答作用及具体机制；
- [3] 明确anti-MUC1 EVIR在树突状细胞摄入、呈递抗原中的作用和具体机制。

【研究内容】

一、比较正常细胞、肿瘤细胞、血浆来源外泌体负载MUC1-VNTRn核酸疫苗的优劣

选用正常细胞、健康人血浆和胰腺导管腺癌患者血浆。分离、纯化、鉴定不同来源外泌体。其原始状态下AF647(荧光)+MUC1-VNTRn表达情况。电镜比较外泌体数目、直径、形态。选用胰腺癌细胞或其它肿瘤细胞株（如结肠癌LoVo、HT-29），构建AF647(荧光)+MUC1-VNTRn稳转肿瘤细胞株。分离、纯化、鉴定不同肿瘤细胞来源外泌体。直接用慢病毒或电穿孔技术将AF647(荧光)+MUC1-VNTRn基因转入外泌体中。

二、体外负载MUC1-VNTRn核酸疫苗的外泌体抗胰腺癌的作用及机制。

（1）免疫微环境中的树突状细胞：与负载MUC1-VNTRn的外泌体共培养，检测树突状细胞分子表型判断成熟程度，用基因芯片初筛及RT-qPCR确认负载MUC1-VNTRn外泌体的树突状细胞和对照组空白外泌体的树突状细胞，其miRNA或基因表达水平改变。

（2）特异性细胞毒性T细胞：激活的树突状细胞与T淋巴细胞共培养，检测细胞因子如IFN- γ 、TNF- α T细胞数、及对MUC1+和MUC1-胰腺癌细胞或乳腺癌细胞的杀伤作用。

三、与脂质体、PAMAM树枝状高聚物纳米材料载体相比较，体内外泌体转运体系的效率及参与免疫应答机制。

（1）在小鼠腹腔注射负载AF647(荧光)+MUC1-VNTRn的外泌体、脂质体、PAMAM树枝状高聚物纳米颗粒及裸核疫苗。a) 外周循环中是否检测到外泌体、脂质体、PAMAM树枝状高聚物纳米颗粒及MUC1-VNTRn片段。b) 在脑、肾、肝、肺、胰、脾组织中是否检测到上述物质。c) 分别检测各组激活外周循环中CD11b+单核细胞程度。d) 联用anti-CD47抗体，抑制CD47识别SIRP α ，检测各组AF647+ CD11b+单核细胞数。

（2）体内抑瘤实验。腹腔注射或肌肉注射负载AF647(荧光)+MUC1-VNTRn的外泌体、脂质体、PAMAM树枝状高聚物纳米颗粒及裸核疫苗，检测肿瘤组织a) 胶原纤维形成。b) 细胞凋亡率。c) Ki-67指数。最终小鼠总体生存时间。

四、anti-MUC1 EVIR的构建及其在树突状细胞摄入呈递抗原中的作用和具体机制。

（1）设计与合成包裹anti-MUC1 EVIR的慢病毒载体，将anti-MUC1 EVIR和CtrlR转入树突状细胞，免疫荧光染色，激光共聚焦显微镜观察anti-MUC1-scFv在树突状细胞上的表达情况。

（2）将实验三中稳定负载AF647(荧光)+MUC1-VNTRn诱导最强细胞免疫反应及抑瘤效应的外泌体，体外转入树突状细胞。

a) anti-MUC1-scFv特异性摄入VNTRn(+) 外泌体，对照组VNTRn(-) 外泌体。

b) 通过荧光观察EVIR和CtrlR树突状细胞摄入外泌体效率。

c) 在转入后15min-2h时间间隔内，用蛋白酶处理外泌体，摄入慢的外泌体被消化掉，荧光摄入下降，间接判断EVIR和CtrlR树突状细胞摄入外泌体效率。

【拟解决的关键问题】

问题一：经皮下或肌肉等外周接种的核酸疫苗或其它疫苗如何高效靶向转运到淋巴结或肿瘤微环境中。

问题二：抗原提呈细胞如何高效摄入抗原和呈递给效应细胞。

五、项目技术路线和研究方法概述

【研究方法】

[1] 不同来源外泌体的分离、纯化、鉴定

超滤离心法：用真空抽滤对样品进行澄清；PBS平衡Ultra-15超滤管，离心4000g x 10 min；从超滤管内管及收集管吸走PBS，向超滤管加入15 mL样品，4000g x 30 min；倒空收集管，加入14mL PBS进行缓冲液置换，轻柔吸打样品数次，4000g x 30 min；从浓缩管吸回处理好的样品，100 uL PBS重悬，加入蛋白酶抑制剂保存。

鉴定：Western Blot检测外泌体上CD47、CD63、TSG101及ALIX表达情况。

[2] 电镜比较不同来源外泌体数目、直径、形态

[3] AF647(荧光)+MUC1-VNTRn核酸疫苗的构建

[4] 树突状细胞的培养与分子表型鉴定

[5] Elispot法检测活化分泌IFN- γ 、TNF- α 的特异性细胞毒性T细胞数

[6] 体外细胞毒性T细胞杀伤效应的检测

[7] 负载MUC1-VNTRn外泌体的树突状细胞和对照组空白外泌体的树突状细胞，送上海康成生物公司miRStar™芯片初筛miRNA或基因表达水平改变。

[8] 生物信息学预测miRNA或基因在负载肿瘤抗原的外泌体激活树突状细胞的作用。在TCGA数据库中提取胰腺癌患者数据，采用Gene Ontology (GO, www.geneontology.org/)和Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG, www.genome.jp/kegg/)系统分析数据，重点关注免疫相关的基因或信号通路。

[9] 用流式细胞仪检测负载AF647(荧光)+MUC1-VNTRn的外泌体、脂质体、PAMAM树枝状高聚物纳米颗粒在正常小鼠体内分布

[10] 体内抑瘤实验：panc02-MUC1稳转细胞株的构建，注射在小鼠右腿胫前肌。在肿瘤后第4天、第8天和第12天分别将AF647(荧光)标记的各组负载MUC1-VNTRn疫苗的载体注射到荷瘤小鼠腹腔中，观察约4周，记录小鼠的生存时间。解剖肿瘤组织，测量肿瘤的长径及短径，石蜡包埋切片，a) masson染色显示胶原纤维。b) TUNEL法检测细胞凋亡率。c) Ki-67免疫组化计算阳性细胞核数目。

[11] 胰蛋白酶室温消化后的外泌体注射到荷瘤小鼠腹腔中，重复[9] c)检测激活外周循环中CD11b+单核细胞程度和[10]抑瘤实验。

[12] anti-MUC1 (1:1000稀释) 10 uL经尾静脉注射到荷瘤第4天后小鼠身上，重复[9] c)和[10]实验。

[13] anti-MUC1 EVIR的设计与合成。

anti-MUC1 EVIR的设计参考(Nature Methods, 2017)。IgK 信号肽序列：MDFQVQIFSFLISASVIMSRG。dLNGFR从购买表达dLNGFR的质粒中钓取，双酶切位点：Fw (AgeI): AAAAAACCGGTCTTCTGGGGGTGCCCTTG; Rv (Mlu): AAAAAACGCGTAGTTAGCCTCCCCATCTCC。anti-MUC1 EVIR全基因由TaKaRa公司合成。

[14] 将anti-MUC1 EVIR和CtrlR通过慢病毒转入树突状细胞，免疫荧光染色，激光共聚焦显微镜观察。

六、项目预期成果及效益（社会效益、经济效益等）

本项目预期发表第一标注SCI收录论文1~2篇。培养博士1名，硕士2名。

903201770007

七、项目计划进度

| 起止时间 | 主要工作内容 |
|---------------------|--|
| 2019年05月 — 2019年09月 | 比较正常细胞、肿瘤细胞、血浆来源外泌体负载MUC1-VNTRn核酸疫苗的优劣； |
| 2019年12月 — 2020年04月 | 体外负载MUC1-VNTRn核酸疫苗的外泌体抗胰腺癌的作用及机制； |
| 2020年05月 — 2020年09月 | 与脂质体、PAMAM树枝状高聚物纳米材料载体相比较，体内外泌体转运体系的效率及参与免疫应答机制； |
| 2020年10月 — 2021年01月 | anti-MUC1 EVIR的构建及其在树突状细胞摄入呈递抗原中的作用和具体机制； |
| 2021年02月 — 2021年04月 | 论文撰写、发表、项目结题。 |

八、经费投入及支出预算（单位：万元）

1. 经费筹集

| 资金来源 | 合计 | 市卫生健康委 | 单位配套 | 其他 |
|-------|------|--------|------|------|
| | 3.00 | 1.50 | 0.00 | 1.50 |
| 新增经费 | | | | |
| 小计 | 3.00 | 1.50 | 0.00 | 1.50 |
| 2019年 | 3.00 | 1.50 | 0.00 | 1.50 |

2. 经费支出预算

| 序号 | 支出项目 | 合计 | 来源 | 经费额 | 用途 |
|-------|--------------------|------|--------|------|---------------|
| 直接费用： | | | | | |
| 1 | 仪器设备费 | 0.00 | 市卫生健康委 | 0.00 | 无 |
| | | | 单位配套 | 0.00 | 无 |
| | | | 其他 | 0.00 | 无 |
| 2 | 材料费 | 1.00 | 市卫生健康委 | 0.50 | 试剂、耗材费 |
| | | | 单位配套 | 0.00 | 无 |
| | | | 其他 | 0.50 | 试剂、耗材费 |
| 3 | 测试化验加工费 | 1.20 | 市卫生健康委 | 0.60 | 直接用于实验测试加工费 |
| | | | 单位配套 | 0.00 | 无 |
| | | | 其他 | 0.60 | 直接用于实验测试加工费 |
| 4 | 燃料动力费 | 0.00 | 市卫生健康委 | 0.00 | 无 |
| | | | 单位配套 | 0.00 | 无 |
| | | | 其他 | 0.00 | 无 |
| 5 | 会议费、差旅费、国际合作与交流费 | 0.00 | 市卫生健康委 | 0.00 | 无 |
| | | | 单位配套 | 0.00 | 无 |
| | | | 其他 | 0.00 | 无 |
| 6 | 出版/文献/信息传播/知识产权事务费 | 0.80 | 市卫生健康委 | 0.40 | 主要用于支付论文发表出版费 |
| | | | 单位配套 | 0.00 | 无 |
| | | | 其他 | 0.40 | 主要用于支付论文发表出版费 |
| 7 | 劳务费 | 0.00 | 市卫生健康委 | 0.00 | 无 |
| | | | 单位配套 | 0.00 | 无 |
| | | | 其他 | 0.00 | 无 |

| | | | | | |
|-------|-------|------|--------|------|---|
| 8 | 专家咨询费 | 0.00 | 市卫生健康委 | 0.00 | 无 |
| | | | 单位配套 | 0.00 | 无 |
| | | | 其他 | 0.00 | 无 |
| 9 | 其他 | 0.00 | 市卫生健康委 | 0.00 | 无 |
| | | | 单位配套 | 0.00 | 无 |
| | | | 其他 | 0.00 | 无 |
| 间接费用： | | | | | |
| 1 | 管理费用 | 0.00 | 市卫生健康委 | 0.00 | 无 |
| | | | 单位配套 | 0.00 | 无 |
| | | | 其他 | 0.00 | 无 |
| 2 | 绩效支出 | 0.00 | 市卫生健康委 | 0.00 | 无 |
| | | | 单位配套 | 0.00 | 无 |
| | | | 其他 | 0.00 | 无 |
| 3 | 其他 | 0.00 | 市卫生健康委 | 0.00 | 无 |
| | | | 单位配套 | 0.00 | 无 |
| | | | 其他 | 0.00 | 无 |
| 合计 | | | 市卫生健康委 | 1.50 | |
| | | | 单位配套 | 0.00 | |
| | | | 其他 | 1.50 | |

九、项目申报单位与其他参与单位分工及经费分配情况

| | | | | |
|--------------|---------------|------|------------------------|------|
| 项目申报单位 | 广州医科大学附属肿瘤医院 | | | |
| 工作分工 | 本单位为项目唯一完成单位。 | | | |
| 经费预算 分配情况 | 分配经费 (万元) | 3.00 | 其中市卫生健康委 经费 (万元) | 1.50 |

其他参与单位：

无

十、合同条款

第一条 本《合同书》是为了保证顺利实施完成广州市卫生健康科技项目（项目编号：20191A011096）而设计，经协商一致签订，作为项目实施过程监督检查和项目完成后验收的基本依据，任何一方应严格履行。

第二条 甲方义务：

1. 按照《合同书》规定核拨经费；
2. 监督检查乙方项目实施情况和经费使用情况；
3. 在收到乙方项目验收申请后组织验收。

第三条 乙方义务：

1. 按照《合同书》规定的内容组织实施项目，接受并配合甲方、丙方以及各级财政、审计部门，或上述部门委托的机构进行评估、稽查、审计和检查，并按要求提供项目任务与预算执行情况和有关财务资料；

2. 按照《合同书》规定的开支范围对甲方核拨的经费实行专款专用，单独列帐管理，保证自筹资金按时到位和其它配套条件的落实；

3. 项目完成后，乙方应在三个月内向甲方申请对项目进行验收。

4. 项目研究过程中，需严格遵守相关法律法规和医学伦理道德要求，否则一切后果均由项目承担单位负责。

第四条 丙方义务：

1. 协助甲方对项目的实施过程进行跟踪、检查和提供相关信息，并对所提供信息的客观真实性负责；

2. 负责监督乙方严格遵守《合同书》规定的任务；

3. 加强对乙方的财务监管，负责监管乙方对甲方拨付的经费实行专款专用、单独列帐管理和乙方自筹资金按时到位及其它配套条件的落实。

第五条 项目承担单位（乙方）属非独立法人单位的，其法律责任由丙方承担。

第六条 在履行本合同的过程中，如遇到市财政计划改变及不可抗力情况，甲方对所核拨经费的数量和时间可进行相应变更。

第七条 项目执行过程中乙方如需调整任务目标、进度、负责人等事项，或项目不能按期完成，应及时书面报告丙方，经丙方签署意见后，向甲方提出任务调整内容或延期时间及其理由的申请，由甲方审核批准后进行相应的变更。否则其后果由自行变更的一方负责。

第八条 按照《广州市卫生健康委 广州市财政局关于印发〈广州市卫生健康科技项目经费管理办法〉的通知》（穗卫科教〔2017〕22号）对项目经费进行管理。

第九条 项目负责人在进行科研工作总结、发表论文专著、成果鉴定、成果申报时须注明“广州市卫生健康科技项目”及项目编号，否则不作为该项目的验收或鉴定的有效资料。

第十条 乙方因某种原因（如项目所依托的技术、资金、设备仪器或人力条件不能落实，原定方案及研究路线不合理等）或不可抗力因素，致使项目计划无法执行，须终止任务的，应提出申请，由丙方签署意见，报甲方审核批准后执行，并视不同情况部分或全部退还所有拨付经费；如乙方没有提出终止的申请，甲方根据项目实施过程监督检查的情况，有权终止任务的实施。

第十一条 属技术保密的项目，经协商订立如下技术保密条款：

- 1、本合同保密内容范围为： / 。
- 2、本合同保密期限为： / 。
- 3、乙方应与可能知悉保密内容的人员签订技术秘密保护协议。
- 4、各方应建立技术秘密保护制度。
- 5、属技术保密的项目必须经市负责技术保密部门审查后，确定可否发表或用于国际合作和交流。

第十二条 违约责任：

1. 乙方无正当理由造成项目工作停滞、延误或失败，未能通过验收，甲方有权追缴部分或者全部经费，由此造成的经济损失由乙方承担；

2. 乙方违反经费使用规定，未按合同书规定的开支范围对甲方拨付经费实行专款专用、单独列帐，以及经甲方检查确认计划进度不符合合同书约定的，甲方有权警告令其整改，由此产生的损失由乙方负担；情节严重的，甲方有权终止任务，乙方应当返还甲方已拨付的经费；

第十三条 本《合同书》正式文本一式四份，各份均具有同等效力。甲方存两份，乙方一份，丙方一份。本《合同书》签订各方均负有相应的法律责任，不受机构、人事变动而影响。

说明：1. 本合同书中，凡是当事人约定无需填写的条款，应在该条款的空白处划（/）。

| | |
|--|--------------------------------------|
| <p>管 理 单 位（甲方）： 广州市卫生健康委员会</p> <p>法 定 代 表 人： _____（签章）</p> <p>项 目 经 办 人： _____（签章）</p> <p>联 系 电 话： _____</p> | <p>(单位盖章)</p> <p>年 月 日</p> |
| <p>承 担 单 位（乙方）： 广州医科大学附属肿瘤医院</p> <p>法 定 代 表 人： 崔书中 _____（签章）</p> <p>科 技 部 门 负 责 人： 林生趣 _____（签章）</p> <p>财 务 部 门 负 责 人： 关昶妍 _____（签章）</p> <p>项 目 经 办 人： _____（签章）</p> <p>联 系 电 话： _____</p> | <p>(单位盖章)</p> <p>年 月 日</p> |
| <p>推 荐 单 位（丙方）： 广州医科大学</p> <p>法 定 代 表 人： _____（签章）</p> <p>项 目 经 办 人： _____（签章）</p> <p>联 系 电 话： _____</p> | <p>(单位盖章)</p> <p>年 月 日</p> |



201707010323

广州市科技计划项目合同书

穗科创字(2017)112号 批文号:

项目编号: 201707010323

广州市科技计划项目 合同书

(前期资助一次性拨付类)

项目名称: miR-217/hnRNPA1-hnRNPA2/PKM2-Kras通路精细调控胰腺癌代谢的
机制研究

计划类别: 科学研究专项

专题名称: 一般项目

起止时间: 2017-05-01到2020-04-30

承担单位: 广东省人民医院(广东省医学科学院)

组织单位: 广东省卫生和计划生育委员会

责任处室: 社基处

填表日期: 2017-01-25 10:34

广州市科技创新委员会制
(2016年版)



201707010323

广州市科技计划项目合同书

项目名称: 2017年度广州市科技计划项目
项目编号: 201707010323

项目承担单位承诺书 合同书

(项目承担单位盖章处)



201707010323

广州市科技计划项目合同书

填写说明

一、本合同书的项目编号和下达批文号由市科技创新委员会（以下简称“市科创委”）统一确定。

二、本合同书由申报书在后台自动转换生成，如有错漏之处需修正，请联系市科创委项目责任处室在后台修改。

三、经费预算中的“经费”是指项目执行过程中所发生的所有直接费用和间接费用，一般包括：劳务费、设备费、材料费、燃料动力费、测试化验加工费、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、专家咨询费、其他直接费用和间接费用。

（一）劳务费：指项目研究开发过程中支付给项目组成员及项目组临时聘用人员的人力资源成本费，可包括项目临时聘用人员的社会保险补助。项目组成员所在单位有事业费拨款、工资性收入的部分，不得在财政资助的项目经费中重复列支。

（二）设备费：指项目研究开发过程中所必需的专用仪器、设备、样品、样机购置费及设备试制费，不得用于购置通用与办公用品。项目研发过程应尽量使用广州地区大型科学仪器协作共用网的仪器设备，避免重复购置。确需购置的，需经专家评审论证其必要性。

（三）材料费：是指在项目研究开发过程中需要消耗的各种原材料、辅助材料、低值易耗品、元器件、试剂、实验动物、部件、外购件、包装物的采购、运输、装卸、整理等费用。

（四）燃料动力费：是指在项目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。

（五）测试化验加工费：是指在项目研究开发过程中由于承担单位自身的技术、工艺和设备等条件的限制，必须支付给外单位（包括项目承担单位内部独立经济核算单位）的检验、测试、设计、化验及加工等费用。

（六）差旅费：是指在项目研究开发过程中开展科学实验（试验）、科学考察、业务调研、业务培训、学术交流等所发生的外埠（国内）差旅费、市内交通费用等。

（七）会议费：是指在项目研究开发过程中为组织开展学术研讨、咨询以及协调项目（课题）等活动而发生的会议费用。

（八）国际合作与交流费：是指在项目研究开发过程中项目研究人员出国及外国专家来华工作的费用。

（九）出版/文献/信息传播/知识产权事务费：是指在项目研究开发过程中需要支付的出版费、资料费、专用软件购买费、文献检索费、专业通信费、专利申请及其他知识产权事务等费用。

（十）专家咨询费：是指在项目研究开发过程中支付给临时聘请的咨询专家的费用。专家咨询费不得支付给参与项目研究及其管理相关的工作人员。



201707010323

广州市科技计划项目合同书

(十一) 其他直接费用：是指在项目研究开发过程中发生的除上述费用之外的其它直接支出，应当在申请预算时单独列示，单独核定。

(十二) 间接费用：是项目承担单位在组织实施项目过程中发生的无法在直接费用中列支的相关费用。主要包括承担单位为项目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。其中绩效支出是指项目承担单位为提高科研工作绩效安排的相关支出。

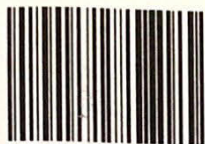
四、本项目如涉及多家（包含两家）单位参加，乙方应在签定本合同书时与合作单位就任务分工、经费和知识产权分配等问题签订有关合同或协议（仅委托其他单位进行常规试验、提供社会化科技服务和少量辅助科研工作的情况除外），作为本合同书的附件。

五、项目承担单位需具有独立法人资格，高等院校、科研院所不具备独立法人资格的二级单位不得作为项目承担单位。

六、组织单位指项目申报时的推荐单位，主要是高等院校、科研院所、区级科技主管部门、上级政府主管部门、市属企业集团（总公司）等。

七、项目基本信息表中单位特性指项目承担单位的资质或获得的称号，如高新技术企业、软件企业、技术先进型服务企业、创新型企业、科技小巨人企业等。单位类型按以下类型填写：高等院校、科研院所、国有企业、民营企业、股份制企业、中外合资企业、港/澳/台商投资企业、外商投资企业等。

八、本合同书适用于广州市前期资助类科技计划项目，有特殊要求另行制定的除外。



201707010323

广州市科技计划项目合同书

一、项目基本信息表

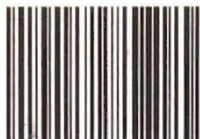
| | | | | |
|-------------|--------|---|----------|--------------------|
| 项目名称 | | miR-217/hnRNPA1-hnRNPA2/PKM2-Kras通路精细调控胰腺癌代谢的机制研究 | | |
| 研究类别/所属技术领域 | | 生物、医药/临床医学/肿瘤外科 | | |
| 承担单位 | 名称 | 广东省人民医院（广东省医学科学院） | | |
| | 通信地址 | 广州市中山二路106号广东省人民医院科教处 | | |
| | 邮政编码 | 510080 | 传真 | 020-83826085 |
| | 单位特性 | 其他 | 单位类型 | 其他 |
| | 组织机构代码 | 45586199-0 | 统一社会信用代码 | Q1044010401349470I |
| | 法定代表人 | 庄建 | 电子邮箱 | hbh1000@126.com |
| | 联系人 | 周志凌 | 联系电话 | 18620129172 |

(一) 项目负责人

| | | | | | |
|-----------|-------|------|--------------------|-------------|-----------------|
| 姓名 | 侯宝华 | 性别 | 男 | 出生年月 | 1965-10-26 |
| 国籍 | 中国 | 民族 | 汉族 | 学位授予国家(或地区) | 中国 |
| 学历 | 博士研究生 | 学位 | 博士 | 手机号码 | 13609006510 |
| 证件名称 | 身份证 | 证件号码 | 410102196510269010 | 固定电话 | 020-83827812 |
| 职务 | 主任 | 职称 | 正高 | 电子邮箱 | hbh1000@126.com |
| 在项目中承担的任务 | 项目负责人 | | | 签名 | |

(二) 项目组主要研究开发人员

| | | | | | | | | |
|----|---|---|----|----|----|--------|-----|----|
| 姓名 | 年 | 性 | 职务 | 职称 | 学历 | 在项目中承担 | 所在单 | 签名 |
|----|---|---|----|----|----|--------|-----|----|



201707010323


广州市科技计划项目合同书

| | 龄 | 别 | | | | 的任务 | 位 | |
|-----|----|---|-------|-------|-------|-------------|-------------------|--|
| 侯宝华 | 50 | 男 | 主任 | 正高 | 博士研究生 | 项目负责人 | 广东省人民医院（广东省医学科学院） | |
| 周雨 | 29 | 男 | 住院医师 | 初级 | 博士研究生 | 分子生物学实验 | 广东省人民医院（广东省医学科学院） | |
| 林叶 | 37 | 男 | 副主任医师 | 副高 | 硕士研究生 | 临床数据分析，动物实验 | 广东省人民医院（广东省医学科学院） | |
| 殷子 | 29 | 男 | 住院医师 | 初级 | 博士研究生 | 临床数据分析 | 广东省人民医院（广东省医学科学院） | |
| 夏武政 | 32 | 男 | 主治医师 | 中级 | 博士研究生 | 分子生物学实验 | 广东省人民医院（广东省医学科学院） | |
| 卢昕 | 27 | 男 | 住院医师 | 初级 | 博士研究生 | 动物实验 | 广东省人民医院（广东省医学科学院） | |
| 李德智 | 25 | 男 | 硕士研究生 | 硕士研究生 | 本科 | 分子生物学实验 | 广东省人民医院（广东省医学科学院） | |



201707010323

广州市科技计划项目合同书

| | | | | | | | | |
|---------|----|---|-----------|-----------|----|--------------|--|---|
| | | | | | | | 院) | |
| 黄剑 宇 | 24 | 男 | 硕士研究 生 | 硕士研究 生 | 本科 | 细胞培养、PC R | 广东省 人民医 院 (广 东省医 学科学 院) |  |



二、主要内容

1、项目目标

- (1) 证实miR-217对胰腺癌糖代谢、谷氨酰胺代谢及增殖的调控作用;
- (2) 阐明miR-217通过PKM选择性剪切调控胰腺癌糖代谢的具体分子机制;
- (3) 明确miR-217通过抑制Kras调控谷氨酰胺代谢的具体分子机制;
- (4) 探讨miR-217、hnRNPA1和hnRNPA2的潜在靶向价值,为胰腺癌的个体化治疗提供新的标志物或靶点;

2、项目内容 (项目主要内容、拟解决的主要技术问题、难点,拟采用的技术路线、方法、工艺流程)

项目主要内容:

2.1 细胞及动物实验观察miR-217对胰腺癌细胞糖代谢、谷氨酰胺代谢和增殖能力的影响,评估miR-217靶向治疗价值

(1) 细胞试验通过建立miR-217稳定转染的胰腺癌细胞株;建立NOD/SCID鼠皮下瘤模型与血道转移瘤模型,观察上调或下调miR-217对肿瘤大小与增殖的影响。

(2) 分析检测细胞永生代、糖代谢和谷氨酰胺代谢相关的指标,包括:1) 细胞周期,2) 凋亡比例,3) 生长曲线,4) 细胞增殖,5) 糖酵解、谷氨酰胺代谢关键酶的表达水平,6) 代谢产物浓度分析,7) 原位检测miR-217和PKM1、PKM2、GOT1、GLUD1水平。

2.2分析miR-217通过调控hnRNP控制细胞的糖代谢与谷氨酰胺代谢

(1) 细胞水平证实miR-217靶向hnRNPA1和hnRNPA2: 1) 通过PCR和WB对miR-217、hnRNPA1、hnRNPA2的表达相关性进行研究; 2) 双荧光素酶报道基因验证miR-217对hnRNPA1和hnRNPA2 3'UTR的靶向性;

(2) 在稳定转染miR-217的细胞中分别转染包含hnRNPA1或hnRNPA2开放阅读框的质粒,分析以下指标以探讨miR-217对hnRNPA1与hnRNPA2的调控作用是否影响细胞的糖酵解与谷氨酰胺代谢: 1) 细胞增殖; 2) 糖酵解与谷氨酰胺代谢率; 3) 细胞耗氧分析; 4) 糖酵解与谷氨酰胺代谢关键酶的表达水平。

2.3分析miR-217调控PKM选择性剪切的机制

(1) RT-PCR、Western blot检测转染miR-217或转染对照序列对胰腺癌细胞hnRNPA1、hnRNPA2以及PKM1、PKM2表达水平的影响;

(2) 在稳定转染miR-217的细胞中分别转染包含hnRNPA1或hnRNPA2开放阅读框的质粒,分析以下指标以探讨miR-217对PKM的调控是否依赖hnRNPA1与hnRNPA2: 1) 细胞增



201707010323

广州市科技计划项目合同书

殖; 2) 糖酵解率; 3) 细胞耗氧分析; 4) PKM1与PKM2的表达水平。

2.4探讨PKM1通过结合FoxA1调控miR-217表达

(1) 细胞水平证实PKM1结合FoxA1: 1) Co-IP研究内源性以及外源性蛋白 (Flag-PKM1, HA-FoxA1) 的结合关系; 2) 激光共聚焦实验及细胞核Western研究分析两者的共定位;

(2) 细胞水平证实miR-217表达受PKM1/FoxA1调控: 1) ChIP分析miR-217启动子区域PKM1与FoxA1的结合情况与结合序列; 2) 野生型及突变型miR-217启动子报道载体分析; 3) 调控PKM1与FoxA1表达后对miR-217表达水平的影响分析。

2.5明确miR-217通过hnRNP调控Kras的功能

(1) 细胞水平证实hnRNP调控Kras: 1) Co-IP研究内源性以及外源性蛋白 (Flag-hnRNP, HA-Kras) 的结合关系; 2) 激光共聚焦实验及细胞核Western研究分析两者的共定位; 3) 双荧光素酶报道基因验证hnRNPA1和hnRNPA2对Kras 3'UTR的靶向性;

(2) 细胞水平证实Kras功能表达受miR-217/hnRNP调控: 调控miR-217与hnRNP表达后对Kras表达与功能 (谷氨酰胺代谢类型) 的影响

拟解决的主要技术问题、难点:

3.拟解决的关键技术问题。

1. 证实miR-217在调控胰腺癌细胞糖酵解及谷氨酰胺代谢中的关键作用, 并阐明其机制

2. 初步探讨miR-217作为靶点在靶向胰腺癌代谢治疗中的潜在价值

4.项目主要创新点。

(1) 提出以microRNA-217中心的对胰腺癌两条重要代谢途径的关键调控作用, 以及PKM1作为转录辅助因子而非代谢酶参与代谢调控的正反馈机制;

(2) 如假说被进一步证实, 则miR-217作为同时调控糖酵解及谷氨酰胺代谢的小RNA, 有希望为胰腺癌提供新的治疗靶点。

拟采用的技术路线、方法、工艺流程:

1. 细胞及动物实验观察miR-217对胰腺癌细胞代谢和增殖能力的影响

(1) 构建稳定表达miR-217的细胞系: 购买表达miR-217和对照序列的慢病毒, 胰腺癌细胞以 1×10^4 /孔铺于96孔板中, 37°C 孵育过夜后慢病毒处理细胞 ($\text{MOI}=20$), 继续培养36h后重新接种并以嘌呤霉素筛选2-4周, GFP荧光检测转染效率等情况。嘌呤霉素筛选至未见死亡细胞后接种于96孔板, 进一步选出稳定表达miR-217的细胞以及表达对照序列的细



胞。RT-PCR分析miR-217表达情况;

(2) 采用CCK-8及MTT试剂盒评估过表达miR-217的胰腺癌细胞株与对照细胞株的增殖能力, 绘制增殖曲线, 详见已发表文章;

(3) 细胞耗氧率评估miR-217对肿瘤细胞耗氧率: 采用生物微氧分析仪系统分析细胞耗氧率, 将105/ml密度的细胞悬液移入测氧室, 细胞悬液内的溶解氧因细胞氧化磷酸化而不断消耗, 每隔200-500ms测定悬液氧浓度, 直指氧浓度信号为0, 绘制曲线;

(4) miR-217对胰腺癌细胞代谢影响。①放射性标记法测定糖酵解率: 本实验原理为细胞将放射性标记的5-3H-Glucose代谢成3H₂O, 用液体闪烁计数器测量3H放射强度, 糖酵解率为3H₂O/5-3H-Glucose, 比值越大说明糖酵解通路越活跃。取106体外培养的Capan-2细胞, 于1ml Krebs缓冲液中37℃孵育30min, 然后加入10nM放射性标记的葡萄糖, 继续孵育1小时。然后每种细胞取50ul加入PCR管装入装有0.5ml H₂O闪烁计数瓶中, 用液体闪烁计数器测量3H放射强度。②ELISA法检测糖酵解、三羧酸以及谷氨酰胺代谢的中间产物与关键酶活性。糖酵解中间产物及关键酶: 1,6-二磷酸果糖、丙酮酸、乳酸、己糖激酶、丙酮酸激酶、乳酸脱氢酶; 三羧酸中间产物及关键酶: 柠檬酸、琥珀酸、苹果酸、丙酮酸脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶、琥珀酰辅酶A合成酶; 谷氨酰胺代谢中间产物及关键酶: 谷氨酸脱氢酶1、谷氨酸转氨酶1、谷氨酸转氨酶2、谷氨酰胺酶1、胞浆苹果酸酶1和苹果酸脱氢酶1等。③Nova多参数生化分析仪测量细胞培养液中谷氨酸、谷氨酰胺、葡萄糖、乳酸、pH、pO₂、pCO₂等参数的变化。

(5) 皮下成瘤实验检测miR-217的作用: (1) 购买4-5周龄的联合免疫缺陷小鼠(NOD/SCID), 皮下注射高低表达miR-217的胰腺癌细胞株。模型建立后, 每3天测量皮下肿瘤的大小和体重, 4-6周后处死动物, 处死后测量皮下肿瘤的大小和重量, 检查肺、肝转移情况, 并称重湿肺重量, 并留取原位肿瘤及远处转移标本。建立小鼠胰腺癌移植瘤体内转移模型。(3) 皮瘤组织的进一步验证。免疫组化分析: 8周后处死小鼠, 进行免疫组化染色, 检测组织糖酵解、谷氨酰胺中间产物和关键酶的表达情况。

2. 分析miR-217通过调控hnRNP调节糖酵解与谷氨酰胺代谢

(1) RT-PCR、Western blot检测转染miR-217或转染对照序列对胰腺癌细胞hnRNPA1、hnRNPA2表达水平的影响。总RNA抽提使用Trizol或miRVana试剂盒进行, 定DNase取出污染DNA后逆转录为cDNA。qRT-PCR使用SYBR green PCR (Roche), 总体系20ul进行。mRNA选择β-actin为内参, microRNA选择U6为内参。细胞蛋白抽提首先以RIPA buffer裂解细胞, 定量后每孔20ug蛋白进行SDS-PAGE电泳转移至PVDF膜, 二抗采用化学发光法进行。详见已发表文章。

(2) 双荧光素酶报道基因系统验证miR-217靶向性: 采用Promega公司的Dual-Glo®Luciferase Assay System双荧光素酶报道基因系统, 构建3'UTR野生型或突变型的载



体，以海肾荧光素酶作为内参，转染细胞48h后测定荧光素酶活性，简介评估miR-217对3'UTR的靶向性。

3. 分析miR-217调控PKM选择性剪切的机制

(1) RT-PCR、Western blot检测转染miR-217或转染对照序列对胰腺癌细胞hnRNPA1、hnRNPA2以及PKM1、PKM2表达水平的影响；

(2) 分别构建表达hnRNPA1或hnRNPA2 ORF的质粒，采用慢病毒转染方法建立稳定表达hnRNPA1或hnRNPA2的细胞；通过lipo2000瞬时转染miR-217，观察miR-217对PKM1、PKM2的表达调控作用是否依赖hnRNPA1或hnRNPA2。mRNA的检测采用qRT-PCR进行，蛋白检测采用Western blot进行，详见已发表文章。

4. 探讨PKM1通过结合FoxA1调控miR-217表达

(1) 验证PKM1与FoxA1结合：采用Co-IP实验分析PKM1与FoxA1的结合情况。检测内源性蛋白采用结合PKM1或FoxA1抗体琼脂糖珠子（Protein A/G agarose beads），检测外源性蛋白采用结合了标签抗体（Flag, HA）的琼脂糖珠子。抽提细胞核蛋白，定量后与琼脂糖珠孵育3-5h，IP buffer洗去未结合蛋白后再次定量，进行Western blot检测。无抗体、IgG、PKM2结合的琼脂糖珠作为阴性对照，细胞裂解蛋白作为阳性对照。

(2) 共聚焦显微镜检测PKM1和FoxA1的细胞内定位情况：进行细胞铺片后以PKM1和FoxA1抗体进行双染色，荧光探针二抗进行标记，细胞核采用DAPI染色后进行共聚焦显微镜拍摄。

(3) miR-217启动子报道载体分析PKM1/FoxA1的转录活性：建立包含野生型或突变型miR-217启动子基因序列的荧光素酶报道载体，高低表达PKM1和/或FoxA1，24、48h检测荧光素酶活性，间接反应PKM1和/或FoxA1对miR-217启动子的结合、转录能力。

(4) ChIP分析miR-217启动子区域PKM1和FoxA1的占位情况：细胞转染标签抗体Flag和HA标记的Flag-PKM1、HA-FoxA1，孵育48h后以甲醛固定蛋白-DNA复合体，甘氨酸灭活甲醛、超声打碎细胞DNA片段至200-1000bp，IP后保留PKM1、FoxA1结合的DNA片段，逆转录、扩增后进行Sanger测序判断是否为miR-217启动子序列。

5. 明确miR-217通过hnRNP调控Kras

(1) RT-PCR、Western blot检测转染miR-217或转染对照序列对胰腺癌细胞



201707010323

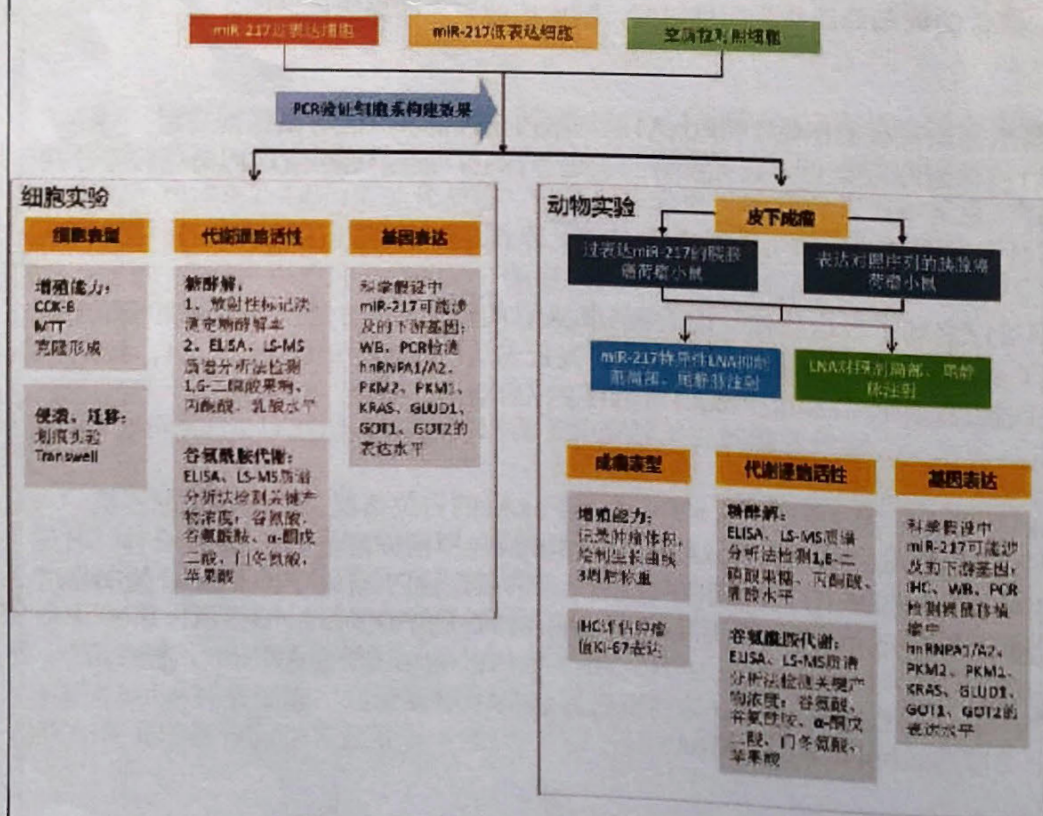
广州市科技计划项目合同书

胞hnRNPA1、hnRNPA2以及Kras表达水平的影响；

(2) 分别构建表达hnRNPA1或hnRNPA2 ORF的质粒，采用慢病毒转染方法建立稳定表达hnRNPA1或hnRNPA2的细胞；通过lipo2000瞬时转染miR-217，观察miR-217对Kras的表达调控作用是否依赖hnRNPA1或hnRNPA2。mRNA的检测采用qRT-PCR进行，蛋白检测采用Western blot进行，详见已发表文章。

(3) 细胞水平证实hnRNP调控Kras：1) 采用Co-IP实验分析hnRNP与Kras的结合情况。检测内源性蛋白采用结合hnRNP或Kras抗体琼脂糖珠子（Protein A/G agarose beads），检测外源性蛋白采用结合了标签抗体（Flag，HA）的琼脂糖珠子。抽提细胞核蛋白，定量后与琼脂糖珠孵育3-5h，IP buffer洗去未结合蛋白后再次定量，进行Western blot检测。无抗体、IgG、PKM2结合的琼脂糖珠作为阴性对照，细胞裂解蛋白作为阳性对照。Co-IP研究内源性以及外源性蛋白（Flag-hnRNP，HA-Kras）的结合关系；2) 激光共聚焦实验及细胞核Western研究分析两者的共定位；3) 双荧光素酶报道基因验证hnRNPA1和hnRNPA2对Kras 3'UTR的靶向性；

路线1: microRNA-217对肿瘤表型和代谢影响的体内外实验

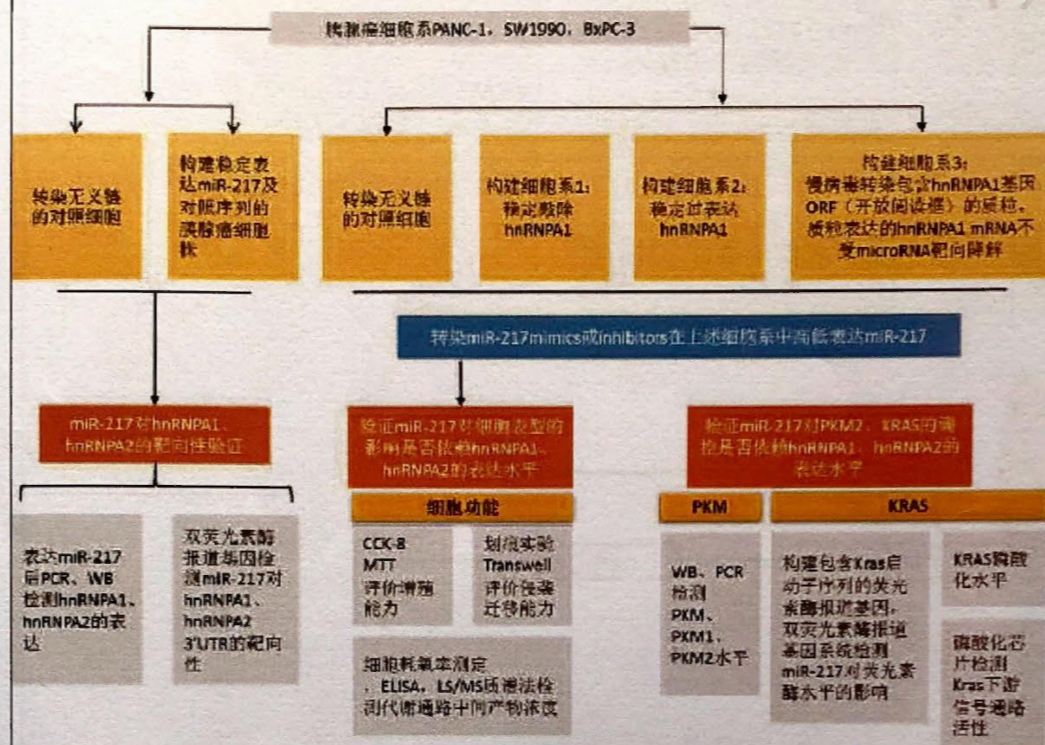




201707010323

广州市科技计划项目合同书

路线2: miR-217通过靶向hnRNP A1/A2调控PKM及KRAS的机制



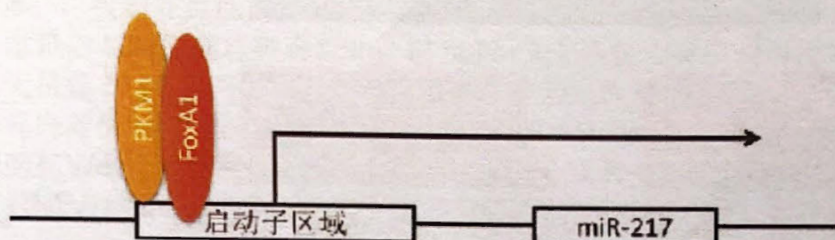
路线3: PKM1/FoxA1对miR-217的表达调控



201707010323

广州市科技计划项目合同书

| PKM1与FoxA1结合 | miR-217启动子活性分析 | PKM1/FoxA1对miR-217启动子结合序列分析 |
|--------------------------|----------------------------------|--|
| Co-IP检测内源性PKM1与FoxA1结合情况 | 构建包含野生型、突变型miR-217启动子序列的荧光素酶报道基因 | ChIP结合Sanger测序分析PKM1和FoxA1对miR-217启动子的结合序列 |
| Co-IP检测外源性PKM1与FoxA1结合情况 | 高低表达PKM1，检测荧光素酶活性 | |
| 共聚焦显微镜检测PKM1与FoxA1共定位 | 高低表达FoxA1，检测荧光素酶活性 | |



3、项目特色和创新点

项目主要创新点:

- (1) 提出以microRNA-217中心的对胰腺癌两条重要代谢途径的关键调控作用，以及PKM1作为转录辅助因子而非代谢酶参与代谢调控的正反馈机制；
- (2) 如假说被进一步证实，则miR-217作为同时调控糖酵解及谷氨酰胺代谢的小RNA，有希望为胰腺癌提供新的治疗靶点。

4、项目实施过程中可能遇到的风险及规避措施

风险

我们前期通过大规模芯片筛选发现 miR-217在胰腺癌早期复发的人群中显著高表达，本项目的科学问题来源于临床标本大规模筛查研究的发现，是科学可行的。我们进一步通过大量预实验发现 hnRNPA1，hnRNPA2是miR-217的靶基因，因此，本课题的科学设想来源于预实验的发现，为课题的顺利开展打下坚实基础。在开展胰腺癌复发的实验研究过程中，课题组已系统的掌握了相关理论知识和实验方法，并进一步完善了本项目的实验设计和实施计划，以确保本项目的科学严谨性。上述预实验的开展与充分的实验规划，为本项目的可行性和科学性提供了实验依据支持。故本项目具备较好的可行性，风险较低。

规避措施

我们前期通过大规模芯片筛选发现 miR-217在胰腺癌早期复发的人群中显著高表达，本项目的科学问题来源于临床标本大规模筛查研究的发现，是科学可行的。我们进一步通过大量预实验发现 hnRNPA1，hnRNPA2是miR-217的靶基因，因此，本课题的科学设想来源于预实验的发现，为课题的顺利开展打下坚实基础。在开展胰腺癌复发的实验研究过程中，课题组已系统的掌握了相关理论知识和实



201707010323

广州市科技计划项目合同书

验方法，并进一步完善了本项目的实验设计和实施计划，以确保本项目的科学严谨性。上述预实验的开展与充分的实验规划，为本项目的可行性和科学性提供了实验依据支持。故本项目具备较好的可行性，风险较低。

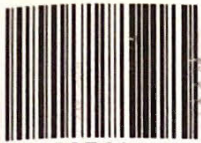


201707010323

广州市科技计划项目合同书

三、主要验收指标

| 1、主要技术指标（如形成的新技术、新产品、新装置、论文专著等数量、指标及其水平、取得国际、国家、行业标准等，无则填“0”） | | | |
|---|------------|-------|------|
| 序号 | 成果形式 | | 成果数量 |
| 1 | 发明专利（项） | 申 请 | 0 |
| | | 授 权 | 0 |
| 2 | 实用新型专利（项） | 申 请 | 1 |
| | | 授 权 | 0 |
| 3 | 外观设计专利（项） | 申 请 | 0 |
| | | 授 权 | 0 |
| 4 | 国外专利（项） | PCT受理 | 0 |
| | | 授 权 | 0 |
| 5 | 获得省级奖项（项） | | 0 |
| 6 | 获得国家级奖项（项） | | 0 |
| 7 | 引进人才（人） | | 0 |
| 8 | 培养人才（人） | 博 士 | 1 |
| | | 硕 士 | 2 |
| | | 学 士 | 0 |
| 9 | 科技人才奖励（人） | | 0 |
| | | 牵 头 | 0 |



201707010323

广州市科技计划项目合同书

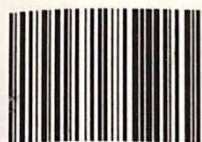
| | | | |
|-----------------|---------------------|-----------|---------|
| 10 | 技术标准制定（个） | 参 与 | 0 |
| 11 | 软件著作权（项） | | 0 |
| 12 | 论文论著（篇） | SCI | 2 |
| | | EI | 0 |
| | | ISTP | 0 |
| | | | 0 |
| | | | 0 |
| 13 | 创新平台（载体）项目必填 | 技术服务数量（项） | 0 |
| | | 服务企业数量（家） | 0 |
| 序号 | 成果形式 | 成果数量 | 参数/指标说明 |
| 14 | 新产品（或新材料、新装备、新品种/系） | 0 | |
| 15 | 新工艺（或新方法、新模式、新技术） | 0 | |
| 其他成果及形式说明。 | | | |
| 无 | | | |
| 2、主要技术经济指标及社会效益 | | | |
| 累计新增销售收入（万元） | | 0 | |



201707010323

广州市科技计划项目合同书

| | |
|--------------------|---|
| 累计新增利税（万元） | 0 |
| 其他主要技术经济指标及社会效益说明。 | |
| 无 | |



201707010323

四、经费预算

(单位: 万元)

| 总投入经费20 | | | | | | | |
|----------------|-----|----------|------------------------|-------|------|------|----|
| 资金来源 | 小计 | 市科技创新委经费 | 国家财政经费 | 省财政经费 | 自筹资金 | | |
| | | | | | 自有资金 | 银行贷款 | 其它 |
| 2017年 | 20 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2018年 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2019年 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 合计 | 20 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 支出预算 | | | | | | | |
| 支出科目 | 小计 | 市科技创新委经费 | | 自筹经费 | | | |
| | | 经费额 | 用途说明 | 经费额 | 用途说明 | | |
| 一、劳务费 | 2 | 2 | 劳务费 | 0 | | | |
| 1.项目负责人 | 0.5 | 0.5 | 项目负责人劳务费 | 0 | | | |
| 2.主要研究、开发、推广人员 | 1.5 | 1.5 | 参加项目的研究生劳务费 | 0 | | | |
| 二、设备费 | 0 | 0 | 无 | 0 | | | |
| 1.购置费 | 0 | 0 | 无 | 0 | | | |
| 2.试制费 | 0 | 0 | 无 | 0 | | | |
| 三、材料费 | 7 | 7 | 试验所需的培养基、抗体等试剂以及实验裸鼠费用 | 0 | | | |

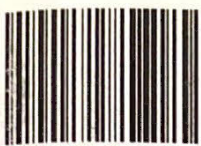


201707010323

广州市科技计划项目合同书

| | | | | | |
|--------------------------|-----|-----|-----------------------|---|--|
| 四、燃料动力费 | 0 | 0 | 无 | 0 | |
| 五、测试化验加工费 | 6.6 | 6.6 | 本项目给华大基因 行测序所需费用 | 0 | |
| 六、差旅费 | 0.6 | 0.6 | 参加会议差旅费 | 0 | |
| 七、会议费 | 0.6 | 0.6 | 举办课题相关学术 讨论会议费用 | 0 | |
| 八、国际合作与交流费 | 0 | 0 | 无 | 0 | |
| 九、出版/文献/信息 传播/知识产权事务费 | 1.2 | 1.2 | 发表SCI论文所需 的彩图费、版面费 | 0 | |
| 十、专家咨询费 | 0 | 0 | 无 | 0 | |
| 十一、其它直接费用 | 0 | 0 | 无 | 0 | |
| 十二、间接费用 | 2 | 2 | 间接费用、科研管 理费 | 0 | |
| 合计 | 20 | 20 | | 0 | |

注：自筹资金由乙方筹措，支出预算按乙方实际需要填报，应按照国家规范的支出科目分不同经费来源编制，对各项支出的主要用途和测算理由等进行详细说明，对单项10万元以上设备仪器和软件的购建费应重点说明。按项目实施要求需分期投入的，应编制分期投入安排计划。项目申报时已支出的费用不再列入支出预算。属财政预算管理单位的，不得与部门预算项目支出重复申报，并应编制政府采购计划。项目承担单位应制定内部管理办法，建立健全内部控制制度，加强对项目经费的监督管理，对项目经费及其自筹经费分别进行单独核算。



201707010323

五、计划进度和阶段目标

| 时间进度 | 阶段目标主要内容及成果 | 自筹资金（到位） | |
|-----------------------|--|----------|------|
| | | 金额（万元） | 出资单位 |
| 2017-05-01至2018-04-30 | miR-217的体内、体外调控肿瘤增殖、糖代谢、谷氨酰胺代谢的生物学功能 | 0 | |
| 2018-05-01至2019-04-30 | 明确hnRNPA1、hnRNPA2的体内外调控肿瘤增殖、糖代谢、谷氨酰胺代谢的生物学功能 | 0 | |
| 2019-05-01至2020-04-30 | 证实miR-217通过hnRNP调控Kras功能，进而影响胰腺癌谷氨酰胺代谢；整理资料，撰写文章 | 0 | |
| 合计 | | 0.00 | |

注：项目执行期为2年及以上的，以1年为阶段节点填写计划进度和阶段目标。

设备仪器购置明细表

金额单位：万元

| 序号 | 名称 | 购置来源 | 数量 | 预计费用 | | 是否政府采购 | 备注 |
|----|----|------|-----|------|----|--------|----|
| | | | 台或套 | 单价 | 总价 | | |
| 1 | | | 0 | 0 | 0 | 是 | |
| | 合计 | | 0 | | 0 | | |

注：1. 单台（套）价格50万元（广州市属单位30万元）及以上的设备仪器填写此表，并及时办理进入“广州地区大型科学仪器协作共用网”手续，以提高使用率。
2. 企业单位无法进行政府采购，请在“是否政府采购”填“否”。



201707010323

六、共同条款

第一条 甲、乙、丙三方根据《中华人民共和国合同法》及国家有关法规和规定，经协商一致，特订立本合同，作为甲、乙、丙三方在合同执行中共同遵守的依据。

第二条 甲、乙、丙三方应当严格履行《广州市科技计划项目管理办法》（穗科信（2015）6号）中规定的职责，严格按照《广州市科技计划项目经费管理办法》（穗科创（2015）7号）实施项目经费管理。

第三条 甲方应在项目执行期满（执行期以本《合同书》“五、计划进度和阶段目标”为准，下同）时按相关管理办法组织项目验收。

1.对通过验收的项目，签发《验收证书》；

2.对未通过验收的项目，要求其承担单位限期整改，整改后仍不能通过验收的，终止合同，收回尚未使用和使用不符合规定的财政经费。

第四条 乙方应：

1.按照《合同书》规定的内容组织实施项目，接受并配合甲方、丙方以及各级财政、审计部门，或上述部门委托的机构进行评估、稽查、审计、检查和绩效评价，并按要求提供项目任务与预算执行情况和有关财务资料；

2.保证自筹资金按时到位和其它配套条件的落实；

3.在项目研究开发过程中优先考虑使用“广州地区大型科学仪器协作共用网”的仪器设备，项目购置的设备仪器若符合入网条件应及时办理入网手续对社会共用共享，提高设备仪器的使用率。按照《中华人民共和国采购法》要求，对符合政府采购范围的设备仪器，执行政府采购；

4.项目合同执行期内确需进行变更的，须在到期3个月前及时申请合同变更，经丙方同意，由甲方审核批准；

5.项目合同执行期满向甲方提出验收申请，提前完成合同规定任务的可提前申请验收；

6.项目未通过验收的，按相关管理办法限期整改并重新提出验收申请；

7.办理《验收证书》和科技成果登记手续；

8.按照科技经费管理相关要求对项目资金单独设帐，按照预算专款专用；

9.项目验收时，须提交科技报告。

第五条 乙方因某种原因（如技术或市场情况发生变化，项目所依托的技术、资金、设备仪器或人力条件不能落实，原定技术方案及路线不合理等）或不可抗力因素，致使项目计划无法执行，须终止合同的，应向甲方提出申请，经丙方同意，由甲方审核批准，收回尚未使用和使用不符合规定的财政经费；如乙方没有提出终止申请，甲方根据项目研究开发过程监督检查情况，有权终止项目，收回财政经费。



201707010323

广州市科技计划项目合同书

；乙方在执行期满无故不提交验收申请，经甲方催办仍不提交的，甲方有权终止项目，收回财政经费，因乙方不及时报告或申请所导致的各方损失，由乙方承担。乙方违反约定造成项目工作停滞、延误或失败，未能通过验收的，应承担违约责任。

第六条 丙方应：

- 1.协助甲方对项目的实施过程进行跟踪、检查和提供相关信息，并对所提供信息的客观真实性负责；
- 2.负责监管乙方严格遵守《合同书》规定的任务；
- 3.督促乙方按时到位自筹资金并保证和落实其他配套条件。

第七条 在履行本合同的过程中，当事人一方发现可能导致项目失败或部分失败的情形时，应及时通知另一方，并采取适当措施减少损失，没有及时通知并采取适当措施，致使损失扩大的，应当就扩大的损失承担责任。

第八条 在履行本合同的过程中，如遇到市财政计划改变等不可抗力情况，甲方对所核拨经费的数量和时间可进行相应变更。

第九条 本项目技术成果及知识产权的归属、转让和实施技术成果所产生的经济利益的分享，除另有约定外，按国家和省、市有关规定执行；正式发表的论文、论著应标注“广州市科技计划项目资助”字样及项目编号；项目所取得的技术成果和知识产权应优先广州产业化或推广转让；需向外地转让或产业化的，须事先以书面形式征得甲方同意。

第十条 属技术保密的项目，经协商订立如下技术保密条款：

1.本合同书保密内容范围为：本合同及其补充协议和附件、乙方因履行本合同所接触或知晓的甲方工作秘密（包括但不限于甲方的任何技术性资料、以及甲方为完成本合同提供的任何其他信息资料并且在提供时未说明是公开信息的）；

2.本合同书保密期限为：

3.乙方（包括但不限于乙方雇员、代理人、顾问等人员，下同）采取有效的保密措施以避免泄露给任何第三方；在本合同有效存续期间及合同终止后，未经甲方事先的书面同意，不得以任何方式公布、发表、公开、披露、散播、复制此种保密信息的任何部分，或对其加以任何形式的利用或使用；如甲方要求，乙方必须签署甲方提供的保密协议。乙方应与可能知悉保密内容的人员签订技术保密保护协议，保密义务不得低于本合同书的约定；

4.双方应建立技术保密制度；

5.属技术保密的项目必须经市负责技术保密部门审查后，方可确定可否发表或用于国际合作与交流。

第十一条 根据项目具体情况，经协商订立如下附加条款作为本合同正式内容的一部分：



201707010325

广州市科技计划项目合同书

1.\

2.\

第十二条 违约责任

乙方无正当理由造成项目工作停滞、延误或失败，未能通过验收的，甲方有权终止项目，收回财政经费，由此造成的经济损失由乙方承担；经检查确认项目计划进度不符合合同约定的，甲方有权警告并责令乙方整改，由此产生的损失由乙方负担；情节严重的，甲方有权终止项目，收回财政经费。

第十三条 廉洁责任

乙方应严格遵守国家、省、市关于科技专项经费使用的有关法律、法规，相关政策以及廉洁建设的各项规定，建立健全促进科研诚信的规章制度，积极开展人员廉洁从业、诚信科研教育，防范科技项目组成员在科研活动中出现下列违法违规行为：

1.在项目申报、研发过程中提供虚假信息或材料，抄袭、剽窃他人科研成果，捏造、变造或篡改科研数据；

2.向甲方、组织单位、评审机构及其工作人员赠送礼金、有价证券、任何形式的贵重物品和回扣、好处费、感谢费等；

3.为甲方、组织单位、评审机构及其工作人员报销应由对方或个人支付的费用；

4.为甲方、组织单位、评审机构工作人员个人装修住房、婚丧嫁娶、配偶子女的工作安排以及出国（境）、旅游等提供方便；

5.为甲方、组织单位、评审机构及其工作人员组织有可能影响公正执行公务的宴请、健身、娱乐等活动；

6.其他：\

乙方及其工作人员有上述行为之一的，一经查实，甲方有权按照科研诚信管理规定采取终止项目合同、不拨付财政经费、限制项目申报等处理；涉嫌犯罪的，移交司法机关追究刑事责任。甲方、组织单位、评审机构及其工作人员有涉及上述行为之一的，乙方应及时向甲方或其上级机关或纪检监察、司法等有关机关检举举报。

第十四条 争议解决

因本合同书所产生的争议，各方应友好协商解决；协商不成的，各方同意由本合同签订地人民法院管辖。

第十五条 通知与送达

甲方在本合同履行过程中向乙方或丙方发出或者提供的所有通知、文件、文书、资料等，均以本合同所列明的乙方或丙方地址送达。乙方或丙方如果迁址，应当书面通知甲方；未履行书面通知义务的，甲方按原地址邮寄相关材料即视为已履行送达义务。当面交付上述材料的，在交付之时视为送达。



201707010323

广州市科技计划项目合同书

本合同一式五份，各份具有同等效力。甲方、市财政局和丙方各存一份，乙方存二份。本合同签订各方均负有相应的法律责任，不受机构、人事变动而影响。

说明：本《合同书》中，凡是三方约定无需填写的条款，在该条款的空白处划（\）。



201707010323

广州市科技计划项目合同书

广州市科技计划项目



201707010323

广州市科技计划项目合同书

七、合同书各方签章

签订地点：广州市越秀区

广州市科技创新委员会（甲方）：

项目经办人（签章）

陈洁

联系电话：83124145

责任处室负责人（签章）

华国彭



项目承担单位（乙方）：广东省人民医院（广东省医学科学院）

项目负责人（签章）

修群

财务负责人（盖章）

柯以明

财务负责人联系电话：81827812-20372

帐户名：广东省人民医院

帐号：3602004409001385770

开户银行：广州市工商银行白云路支行

法定代表人：（签章）

庄建



组织单位（丙方）：广东省卫生和计划生育委员会

项目经办人（签章）

李建中





| | |
|--------|--------------------|
| 项目批准号 | 81672475 |
| 申请代码 | H1617 |
| 归口管理部门 | |
| 依托单位代码 | 51008008C0226-0455 |



国家自然科学基金委员会 资助项目计划书

资助类别：面上项目

亚类说明：

附注说明：常规面上项目

项目名称：miR-217/hnRNP A1-hnRNP A2/PRK2-Kras通路精细调控胰腺癌代谢的机制研究

直接费用：52万元 执行年限：2017.01-2020.12

负责人：侯宝华

通讯地址：广东省广州市中山二路106号

邮政编码： 电 话：83827812

电子邮件：hbh1000@126.com

依托单位：广东省人民医院

联系人：温丽云 电 话：020-83827812 20971

填表日期：2016年09月06日

国家自然科学基金委员会制



国家自然科学基金委员会资助项目计划书填报说明

- 一、项目负责人收到《关于国家自然科学基金资助项目批准及有关事项的通知》（以下简称《批准通知》）后，请认真阅读本填报说明，参照国家自然科学基金相关项目管理办法及《国家自然科学基金资助项目资金管理办法》（请查阅国家自然科学基金委员会官方网站首页“政策法规”-“管理办法”栏目），按《批准通知》的要求认真填写和提交《国家自然科学基金委员会资助项目计划书》（以下简称《计划书》）。
- 二、填写《计划书》时要求科学严谨、实事求是、表述清晰、准确。《计划书》经国家自然科学基金委员会相关项目管理部门审核批准后，将作为项目研究计划执行和检查、验收的依据。
- 三、《计划书》各部分填写要求如下：
 - （一）简表：由系统自动生成。
 - （二）摘要及关键词：各类获资助项目都必须填写中、英文摘要及关键词。
 - （三）项目组主要成员：计划书中列出姓名的项目组主要成员由系统自动生成，与申请书原成员保持一致，不可随意调整。如果批准通知中“项目评审意见及修改意见表”中“对研究方案的修改意见”栏目有调整项目组成员相关要求的，待项目开始执行后，按照项目成员变更程序另行办理。
 - （四）资金预算表：按批准资助的直接费用填报资金预算表和预算说明书，其中的劳务费、专家咨询费金额不应高于申请书中相应金额。国家重大科研仪器研制项目、重大项目还应按照预算评审后批复的直接费用各科目金额填报资金预算表、预算说明书及相应的预算明细表。
 - （五）正文：
 1. 面上项目、青年科学基金项目、地区科学基金项目：如果《批准通知》中没有修改要求的，只需选择“研究内容和研究目标按照申请书执行”即可；如果《批准通知》中“项目评审意见及修改意见表”中“对研究方案的修改意见”栏目明确要求调整研究期限和研究内容等的，须选择“根据研究方案修改意见更改”并填报相关修改内容。
 2. 重点项目、重点国际（地区）合作研究项目、重大项目、国家重大科研仪器研制项目：须选择“根据研究方案修改意见更改”，根据《批准通知》的要求填写研究（研制）内容，不得自行降低、更改研究目标（或仪器研制的技术性能与主要技术指标以及验收技术指标）或缩减研究（研制）内容。此外，还要突出以下几点：
 - （1）研究的难点和在实施过程中可能遇到的问题（或仪器研制风险），拟采用的研究（研制）方案和技术路线；
 - （2）项目主要参与者分工，合作研究单位之间的关系与分工，重大项目还需说明课题之间的关联；
 - （3）详细的年度研究（研制）计划。

3. 国家杰出青年科学基金、优秀青年科学基金和海外及港澳学者合作研究基金项目：须选择“根据研究方案修改意见更改”，按下列提纲撰写：
 - (1) 研究方向；
 - (2) 结合国内外研究现状，说明研究工作的学术思想和科学意义（限两个页面）；
 - (3) 研究内容、研究方案及预期目标（限两个页面）；
 - (4) 年度研究计划；
 - (5) 研究队伍的组成情况。
4. 对于其他类型项目，参照面上项目的方式进行选择和填写。

简表

| | | | | | | | | |
|--------|-----------|---|-----|------|-------------------|----------|-----|---------------|
| 申请者信息 | 姓 名 | 侯宝华 | 性 别 | 男 | 出生年月 | 1965年10月 | 民 族 | 汉族 |
| | 学 位 | 博士 | | | 职 称 | 主任医师 | | |
| | 电 话 | 83827812 | | 电子邮件 | hbh1000@126.com | | | |
| | 传 真 | | | 个人网页 | | | | |
| | 工 作 单 位 | 广东省人民医院 | | | | | | |
| | 所 在 院 系 所 | 普通外科 | | | | | | |
| 依托单位信息 | 名 称 | 广东省人民医院 | | | | | 代 码 | 51008008C0226 |
| | 联 系 人 | 温丽云 | | 电子邮件 | 1356370587@qq.com | | | |
| | 电 话 | 020-83827812-20971 | | 网站地址 | | | | |
| 合作单位信息 | 单 位 名 称 | | | | | | | 代 码 |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| 项目基本信息 | 项 目 名 称 | miR-217/hnRNPA1-hnRNPA2/PKM2-Kras通路精细调控胰腺癌代谢的机制研究 | | | | | | |
| | 资 助 类 别 | 面上项目 | | | 亚 类 说 明 | | | |
| | 附 注 说 明 | 常规面上项目 | | | | | | |
| | 申 请 代 码 | H1617:消化系统肿瘤 | | | | | | |
| | 基 地 类 别 | | | | | | | |
| | 执 行 年 限 | 2017.01-2020.12 | | | | | | |
| | 直 接 费 用 | 52万元 | | | | | | |

项目摘要

中文摘要(500字以内):

胰腺癌是高度恶性肿瘤,其主要依赖糖酵解和独特的非经典谷氨酰胺代谢获得生存优势。我们在前期研究中发现胰腺癌的糖酵解与谷氨酰胺代谢状态与胰腺恶性生物学行为、预后密切相关,目前认为这两条代谢途径是靶向胰腺癌代谢的理想靶点,但具体机制未明。芯片分析证实microRNA-217显著低表达与胰腺癌的糖酵解、谷氨酰胺代谢情况联系密切,且生物信息学分析与初步实验表明microRNA-217通过靶基因不均一核糖核蛋白(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein)家族成员hnRNP A1、hnRNP A2调控胰腺癌糖酵解与谷氨酰胺代谢。据此我们提出“MicroRNA-217/hnRNP/PKM2-KRAS通路精细调控胰腺癌代谢的分子机制研究”这一假说。本课题拟进一步实验明确调控两条代谢途径的关键分子机制。旨在揭示两种代谢转换的上游调控机制,为胰腺癌的治疗提供新思路。

关键词: 胰腺外分泌肿瘤;糖酵解;谷氨酰胺代谢

Abstract(limited to 4000 words):

Pancreatic cancer is a highly lethal tumor, which depends on glycolysis and unique non-classical glutamine metabolism to gain energy support and survival advantage. We found in the previous study that the status of glycolysis and glutamine metabolism is closely related with biological behavior and prognosis of pancreatic cancer. Therefore, these two metabolic pathways are ideal targets for targeting pancreatic cancer, but the exact mechanisms are far from known. Microarray analysis performed by us showed that low expression of microRNA-217 significantly associated with the status of glycolysis, glutamine metabolism in pancreatic cancer, and bioinformatics analysis and preliminary test indicated that heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein) family members hnRNP A1, hnRNP A2 were the potential target for microRNA-217. Accordingly, we proposed the hypothesis that “microRNA 217/hnRNP/PKM2-KRAS axis may regulate the glycolysis and glutamine metabolism in pancreatic cancer”. The project is intended to varify the key regulators in these two metabolic pathways. This research may be helpful to elucidate the new mechanism of metabolism in pancreatic cancer and represent potential target for improvement of current pancreatic cancer treatment.

Keywords: pancreatic exocrine tumor; glycolysis; glutamine metabolism

项目组主要成员

| 编号 | 姓名 | 出生年月 | 性别 | 职称 | 学位 | 单位名称 | 电话 | 证件号码 | 项目分工 | 每年工 作时间 (月) | | | | |
|-----|-----|---------|----|------|----|---------|-------------|--------------------|--------------|-------------------|-----|--|-----|--|
| 1 | 侯宝华 | 1965.10 | 男 | 主任医师 | 博士 | 广东省人民医院 | 83827812 | 410102196510269010 | 项目负责人 | 8 | | | | |
| 2 | 林叶 | 1979.03 | 男 | 主治医师 | 硕士 | 广东省人民医院 | 13570065200 | 440102197903220613 | 肿瘤代谢状态评估 | 6 | | | | |
| 3 | 周雨 | 1987.01 | 男 | 医师 | 博士 | 广东省人民医院 | 18665550915 | 370303198701121039 | 高低表达关键酶细胞株构建 | 8 | | | | |
| 4 | 王慧玲 | 1983.03 | 男 | 主治医师 | 硕士 | 广东省人民医院 | 15625052378 | 362322198303165636 | 临床标本收集, 资料整理 | 6 | | | | |
| 5 | 夏武政 | 1983.11 | 男 | 博士生 | 硕士 | 广东省人民医院 | 18620147919 | 430223198311177236 | 病例随访, 数据统计 | 10 | | | | |
| 6 | 李智德 | 1990.01 | 男 | 硕士生 | 学士 | 广东省人民医院 | 15521285736 | 654201199001012111 | 分子生物学 | 8 | | | | |
| 7 | 吴忠仕 | 1987.06 | 男 | 硕士生 | 学士 | 广东省人民医院 | 13268259887 | 450521198706272518 | 病毒包装, 质粒构建 | 10 | | | | |
| 8 | 李德智 | 1990.11 | 男 | 硕士生 | 学士 | 广东省人民医院 | 13539989404 | 441621199011194030 | 分子机制研究 | 6 | | | | |
| 9 | 黄剑宇 | 1991.08 | 男 | 硕士生 | 学士 | 广东省人民医院 | 15626046833 | 441802199108183831 | 动物实验 | 8 | | | | |
| 总人数 | | | 高级 | | 中级 | | 初级 | | 博士后 | | 博士生 | | 硕士生 | |
| 9 | | | 1 | | 2 | | 1 | | 0 | | 1 | | 4 | |



国家自然科学基金项目直接费用预算表（定额补助）

项目批准号：81672475

项目负责人：侯宝华

金额单位：万元

| 序号 | 科目名称 | 金额 |
|----|----------------------|---------|
| 1 | 一、项目直接费用 | 52.0000 |
| 2 | 1、设备费 | 0.0000 |
| 3 | (1)设备购置费 | 0.00 |
| 4 | (2)设备试制费 | 0.0000 |
| 5 | (3)设备改造与租赁费 | 0.00 |
| 6 | 2、材料费 | 35.0000 |
| 7 | 3、测试化验加工费 | 10.0000 |
| 8 | 4、燃料动力费 | 0.00 |
| 9 | 5、差旅/会议/国际合作与交流费 | 2.0000 |
| 10 | 6、出版/文献/信息传播/知识产权事务费 | 2.5000 |
| 11 | 7、劳务费 | 2.5000 |
| 12 | 8、专家咨询费 | 0.00 |
| 13 | 9、其他支出 | 0.00 |
| 14 | 二、自筹资金 | 0.00 |

预算说明书（定额补助）

（请按《国家自然科学基金项目资金预算表编制说明》中的要求，对各项支出的主要用途和测算理由及合作研究外拨资金，单价≥10万元的设备等内容进行详细说明，可根据需要另加附页。）

本项目直接经费合计 52 万元。具体预算说明如下：

1. 设备费：无

2. 材料费：35万元

主要用于购买：各种常规生物化学及分子生物学试剂及耗材，各类试剂盒，各种抗体，实验动物的购买及饲养，成像实验与结果分析，共计35万元。

| 材料名称 | 单价 | 购置数量 | 金额（万元） |
|---------------|--------|------|--------|
| 细胞培养基料费 | | | |
| 进口胎牛血清 | 0.3 | 10 | 3 |
| 胰蛋白酶 | 0.025 | 8 | 0.2 |
| 细胞培养基 | 0.015 | 40 | 0.6 |
| 培养基 | 0.08 | 10 | 0.8 |
| 移液管 | 0.11 | 10 | 1.1 |
| 离心管、冻存管 | 0.015 | 20 | 0.3 |
| 抗生素 | 0.09 | 10 | 0.9 |
| 无血清培养基 | 0.025 | 20 | 0.5 |
| 细胞培养基 | 0.005 | 100 | 0.5 |
| 实验动物购买及饲养 | 0.02 | 1000 | 2 |
| 各式抗体 | | | |
| 一抗 | 0.3 | 20 | 6 |
| 二抗 | 0.1 | 20 | 2 |
| 蛋白质检测相关费用 | | | |
| 蛋白质抽提试剂及耗材 | 0.001 | 600 | 0.6 |
| 蛋白质定量试剂及耗材 | 0.0002 | 500 | 0.1 |
| 蛋白marker | 0.025 | 20 | 0.5 |
| western化学发光试剂 | 0.07 | 20 | 1.4 |
| PVDF膜 | 0.15 | 10 | 1.5 |
| 蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂 | 0.1 | 20 | 2 |
| 引物合成 | | | |
| 引物 | 0.006 | 100 | 0.6 |
| RNA提取试剂盒 | 0.2 | 5 | 1 |
| PCR试剂及耗材 | 0.12 | 5 | 0.6 |
| DNA ladder | 0.02 | 10 | 0.2 |
| 内切酶、连接酶 | 0.03 | 20 | 0.6 |
| 感受态细胞 | 0.02 | 20 | 0.4 |
| DNA胶回收试剂盒 | 0.05 | 10 | 0.5 |
| 质粒DNA提取试剂盒 | 0.05 | 10 | 0.5 |
| 转染试剂 | 0.25 | 8 | 2 |
| 感受态细胞 | 0.02 | 20 | 0.4 |
| DNA胶回收试剂盒 | 0.05 | 10 | 0.5 |
| 质粒DNA提取试剂盒 | 0.05 | 10 | 0.5 |
| 转染试剂 | 0.25 | 8 | 2 |
| siRNA | 0.03 | 40 | 1.2 |
| 免疫组化 | | | |
| 一抗稀释液 | 0.12 | 15 | 1.8 |
| 二抗显色液 | 0.1 | 15 | 1.5 |
| 合计 | | | 35 |

3. 测试化验加工费：10万元

| 材料名称 | 单价 | 使用数量 | 金额（万元） |
|-----------|------|------|--------|
| 基因芯片 | 0.6 | 10 | 6 |
| 流式细胞检测与分选 | 0.1 | 10 | 1 |
| 蛋白质质谱 | 0.1 | 10 | 1 |
| 荧光显微镜 | 0.05 | 40 | 2 |
| 合计 | | | 10 |

4. 燃料动力费：无

5. 差旅费：0.5万元

用于项目组成员参加国内学术会议。拟参加4人次，每人0.125万元，共0.5万元。

6. 会议费：0.5万元

用于项目研究过程中专家指导会议，包括会议场地费、会务费、资料费等。拟邀请专家2人次，每人0.25万元，共0.5万元。

7. 国际合作与交流费：1.0万元

用于项目组成员参加国外学术会议。拟参加2人次，每人0.5万元，共1万元。

8. 出版/文献/信息传播/知识产权事务费：2.5万元

拟发表国际期刊论文2篇，版面费及彩图费共1.5万元；国内期刊计2篇，共0.5万。文献、资料印刷、文献检索、信息传播费：共0.5万元。

9. 劳务费：2.5万元

用于参加研究的博士生的劳务费发放。共5人，500元/月，共2.5万元

10. 专家咨询费：无

11. 其他支出：无

12. 其他支出：无

项目负责人签字：

张华

科研部门公章：



财务部门公章：





报告正文

研究内容和研究目标按照申请书执行。



国家自然科学基金资助项目签批审核表

| <p>我接受国家自然科学基金的资助，将按照申请书、项目批准意见和计划书负责实施本项目（批准号：81672475），严格遵守国家自然科学基金委员会关于资助项目管理、财务等各项规定，切实保证研究工作时间，认真开展研究工作，按时报送有关材料，及时报告重大情况变动，对资助项目发表的论著和取得的科研成果按规定进行标注。</p> <p>项目负责人（签章）： 2016年9月19日</p> | <p>我单位同意承担上述国家自然科学基金项目，将保证项目负责人及其研究队伍的稳定和研究项目实施所需的条件，严格遵守国家自然科学基金委员会有关资助项目管理、财务等各项规定，并督促实施。</p> <p>委托单位（公章） 2016年9月20日</p> | | | | | | | | | | | | | | |
|--|---|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|--|--|--|--|--|--|
| 本栏目由基金委填写 | <p>科学处审查意见：</p> <p>建议年度拨款计划（本栏目为自动生成，单位：万元）：</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>年度</th> <th>总额</th> <th>第一年</th> <th>第二年</th> <th>第三年</th> <th>第四年</th> <th>第五年</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>金额</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>负责人（签章）： 2016年10月25日</p> | 年度 | 总额 | 第一年 | 第二年 | 第三年 | 第四年 | 第五年 | 金额 | | | | | | |
| | 年度 | 总额 | 第一年 | 第二年 | 第三年 | 第四年 | 第五年 | | | | | | | | |
| 金额 | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>科学部审查意见：</p> <p>负责人（签章）： 2016年10月25日</p> | | | | | | | | | | | | | | | |
| 本栏目主要用于重大项目等 | <p>相关局室审核意见：</p> <p>负责人（签章）： 年 月 日</p> | | | | | | | | | | | | | | |
| | <p>委领导审批意见：</p> <p>委领导（签章）： 年 月 日</p> | | | | | | | | | | | | | | |