

立项编号: cstc2018jcyjAX0592

重庆市基础研究与前沿探索项目 (重庆市自然科学基金)任务书

项目名称	肺腺癌分拣输出外泌体 microRNA 生成高侵袭性循环 肿瘤细胞的研究
承担单位	中国人民解放军第三军医大学 (签章)
项目负责人	邓波
通讯地址	重庆市沙坪坝区高滩岩正街 30 号
联系电话	13637782166
起止年限	2018-07-01 至 2021-06-30

重庆市科学技术委员会

二〇一八年五月制

填 写 说 明

- 1、本任务书由重庆市科委、项目承担单位共同签订，甲方为重庆市科委，乙方为项目承担单位。
- 2、本任务书是项目经费拨付和结题的依据。任务书的内容根据《基础研究与前沿探索项目（重庆市自然科学基金）项目申报书》自动生成。
- 3、立项编号由项目管理系统统一分配。

一、考核指标

(一) 考核指标概述

研究目标

本课题将通过 CanpatrolTM 二代 CTC 检测技术、叶酸受体 CTC 检测法、肿瘤捕手 CTC 检测法、细胞实验及动物实验等多技术手段,从分子、细胞、动物水平以及组织标本等层次围绕以下目标进行研究:

明确在肺腺癌组织中“hnRNPR 高表达---外泌体 miR-24-3p 排出胞外,细胞中 miR-24-3p 丰度降低---导致 BCAR1 高表达---从而促使生成 CTCs。下调癌组织 hnRNPR 表达抑制肿瘤转移”。

本研究将从“hnRNPR 分拣包装外泌体 microRNA”这个新视点为揭示 CTCs 播散转移的相关机制奠定基础。

本项目关于循环肿瘤细胞及外泌体 microRNA 部分的转化医学研究,有望为肺癌的早期诊断提供新的靶标;为肺癌的精准分期及精准治疗提供新的依据;为肺癌的靶向治疗开辟新的道路。本项目拟发表高水平 SCI 论文 1 篇。研究目标

本课题将通过 CanpatrolTM 二代 CTC 检测技术、叶酸受体 CTC 检测法、肿瘤捕手 CTC 检测法、细胞实验及动物实验等多技术手段,从分子、细胞、动物水平以及组织标本等层次围绕以下目标进行研究:

明确在肺腺癌组织中“hnRNPR 高表达---外泌体 miR-24-3p 排出胞外,细胞中 miR-24-3p 丰度降低---导致 BCAR1 高表达---从而促使生成 CTCs。下调癌组织 hnRNPR 表达抑制肿瘤转移”。

本研究将从“hnRNPR 分拣包装外泌体 microRNA”这个新视点为揭示 CTCs 播散转移的相关机制奠定基础。

本项目关于循环肿瘤细胞及外泌体 microRNA 部分的转化医学研究,有望为肺癌的早期诊断提供新的靶标;为肺癌的精准分期及精准治疗提供新的依据;为肺癌的靶向治疗开辟新的道路。本项目拟发表高水平 SCI 论文 1 篇。

(二) 考核指标及验收依据

编号	考核指标	验收依据
1	SCI 论文 1 篇	论文正式见刊

二、项目组成员

姓 名	证件号码	性别	学历	职称	专业	工作单位	联系电话	项目中的分工	每年工作时间(月)	签 字
邓波		男	博士研究生	副高	胸外科学	中国人民解放军第三军医大学	13637782166	项目总体设计, 临床病例入组, 数据分析	9	
钱凯		男	硕士研究生	中级	临床医学	中国人民解放军第三军医大学	13883907025	动物实验	9	
程念		女	本科	中级	护理学	中国人民解放军第三军医大学	13212373536	临床标本收集, CTCs 检测	8	
蒋彬		男	硕士研究生	中级	临床医学(外科学)	中国人民解放军第三军医大学	18623415885	细胞实验	8	
康珀铭		男	硕士研究生	中级	临床医学	中国人民解放军第三军医大学	13594634070	细胞实验	8	
李彦宁		男	硕士研究生	中级	胸心外科	中国人民解放军第三军医大学	13527496929	分子克隆	9	
陶绍霖		男	硕士研究生	初级	外科学(胸心外科)	中国人民解放军第三军医大学	13618234327	分子克隆	9	

三、项目经费

甲方为乙方提供本项目研究经费 10.0 万, 在签约后一次拨付; 乙方自筹或匹配经费 0.0 万。

四、相关责任

1、甲方在项目执行过程中不得无故撤销或终止项目。

2、乙方及专项牵头单位在项目实施过程中应建立相应的规章制度，加强安全管理，确保人员及设备安全，对科研安全负全部责任。项目执行过程中应严格遵守重庆市科委科技计划项目管理的各项规定并承担相应权责，按约定保证项目实施所需的人力、物力、财力，督促项目负责人和本单位项目管理部门按重庆市科委的规定及时报送有关报表和材料并按期结题。

3、乙方及专项牵头单位要严格按照《重庆市科技计划项目资金管理办法(试行)(渝财教【2015】275号)》的要求，对项目资金单独设帐，严格按照预算专款专用，严禁挤占挪用项目经费、超预算范围开支的行为，严禁违反规定自行调整项目经费预算，严禁编制虚假预算套取项目经费，严禁项目结题后不及时进行财务结算、长期挂账报销费用，严禁提供虚假配套承诺或不及时足额提供配套资金。乙方及专项牵头单位在项目执行过程中，必须接受甲方对经费使用及项目进度的监督和检查，并按甲方要求及时提供年度计划执行情况报告，逾期不报，甲方有权暂停资助。

4、乙方在项目执行过程中，项目任务书中签订内容、人员和完成时间原则上不作变更；如因某种原因需对计划任务书内容作调整，应向市科委提交书面申请，并经市科委批准后签订修改(补充)任务书。专项牵头单位在项目执行过程中，依据签订的协议内容，对乙方实行监管，项目实施情况需及时向甲方报告。

5、乙方及专项牵头单位在项目执行过程中，如遇重大变化(如:与任务书研究内容有出入、技术措施或某些条件不落实等)致使计划无法执行，应主动及时要求中止任务或延长结题时间。对要求中止任务的，应视不同情况，部分或全部退还所拨经费；对要求延期结题的，延期结题时间不能超过一年，超出一年后结题的，视为总结结题，按照《重庆市科技计划项目管理办法》中规定，终止负责人三年项目申报资格。如乙方及专项牵头单位没有提出中止任务的要求，甲方根据调查情况有权提出终止任务的处理意见，有权延期或停止资助，甚至收回项目全部经费，并减少乙方申报数量；情节严重的，取消申报资格，直至追究法律责任。

6、乙方应在本计划任务书规定的完成时间前2个月向甲方提出结题申请，并根据甲方要求完成项目结题验收有关事宜。约束性指标未全部完成或选择性指标完成率未达85%的项目不能验收结题；结题验收未通过的，按《重庆市科技计划项目管理办法》中有关规定追究乙方及专项牵头单位责任。结题验收通过后，该项目才能作为

正式完成。

7、乙方及专项牵头单位应建立健全促进科研诚信、科技行为廉洁的规章制度,组织开展廉洁自律宣传教育,监督并认真查处本单位在科研过程中出现的违规违纪行为。乙方及专项牵头单位不得在有关人员职称、简历以及研究基础等方面提供虚假信息,不得在项目实施中抄袭、剽窃他人科研成果,不得捏造或篡改科研数据,不得在涉及人体的研究中违反知情同意、保护隐私等规定,不得违反实验动物保护规范等。

8、乙方及专项牵头单位不得向甲方工作人员行贿;不得报销应由甲方工作人员个人支付的任何费用;不得为甲方工作人员购置或提供通讯工具、交通工具、高档办公用品等贵重物品。乙方及专项牵头单位在项目立项和实施过程中贿赂甲方工作人员,或者为其报销应由个人支付的费用、购买贵重物品等,被纪检监察机关或司法机关查证属实的,甲方有权终止项目实施并追缴拨付的全部科研经费;若甲方工作人员主动向纪检监察机关上缴乙方及专项牵头单位提供的贿赂或者贵重物品,甲方同样有权终止项目实施并追缴拨付的全部科研经费。

9、乙方及专项牵头单位发现甲方工作人员在科技管理工作中有索贿、暗箱操作等违反廉政建设规定的行为,应及时向科技纪工委举报并积极协助查处工作。

其他约定:

责任约定签订的约定书、合同协议及签订的其他相关约定以附件形式上传

五、任务书签订各方

甲方: 重庆市科委代表: 科技人才与基础研究处 处长 余国胜 (签章)

项目管理人员 熊新 (签章)

(单位签章)



乙方: 项目第一承担单位负责人 王云贵 (签章)

项目负责人 邓波 (签章)

帐户名: 中国人民解放军陆军军医大学

帐号: 111607545708

开户银行: 中国银行重庆长江路支行

(单位签章)

二〇 年 月 日



申请代码	H1615
受理部门	
收件日期	
受理编号	8157102478



国家自然科学基金 申 请 书

(2015 版)

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：	肺腺癌通过BCAR1生成高侵袭性循环肿瘤细胞及免疫逃避的研究		
申 请 人：	邓波	电 话：	023-68757987
依托单位：	中国人民解放军第三军医大学		
通讯地址：	重庆市渝中区大坪长江支路10号		
邮政编码：	400042	单位电话：	023-68752517
电子邮箱：	superdb@163.com		
申报日期：	2015年03月10日		

国家自然科学基金委员会



基本信息

申请人信息	姓名	邓波	性别	男	出生年月	1978年07月	民族	汉族
	学位	博士	职称	副教授	每年工作时间(月)	8		
	电话	023-68757987		电子邮箱	superdb@163.com			
	传真			国别或地区	中国			
	个人通讯地址	重庆市渝中区大坪长江支路10号						
	工作单位	中国人民解放军第三军医大学/第三附属医院(所)						
	主要研究领域	肺癌的复发与转移						
依托单位信息	名称	中国人民解放军第三军医大学						
	联系人	张宁	电子邮箱	ningzhang@tmmu.edu.cn				
	电话	023-68752517	网站地址	www.tmmu.com.cn				
合作研究单位信息	单位名称							
项目基本信息	项目名称	肺腺癌通过BCAR1生成高侵袭性循环肿瘤细胞及免疫逃避的研究						
	英文名称	Study on BCAR1 in occurrence of M-circulating lung adenocarcinoma cells and immune evasion						
	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	H1615				H1606		
	基地类别							
	研究期限	2016年01月 — 2019年12月				研究方向: 肿瘤细胞极性、迁移、EMT/MET与肿瘤转移		
	申请经费	90.0000万元						
中文关键词		肺肿瘤; 上皮间质转化; BCAR1; 循环肿瘤细胞; 自然杀伤细胞						
英文关键词		lung cancer; epithelial-mesenchymal transition; BCAR1; circulating tumor cells; NK cells						



中文摘要	<p>肺腺癌(LAC)转移存在两个关键环节：通过上皮间质转化(EMT)生成间质型循环肿瘤细胞(M-CTCs)逃避失巢凋亡；活化血小板使M-CTCs逃避NK细胞杀伤。我们发现LAC中BCAR1高表达预后差；癌组织及外周血BCAR1高表达分别与M-CTCs增多及NK失活密切相关；BCAR1\Crk复合物激活p38MAPK诱发EMT及活化血小板。我们拟通过临床观察、细胞及动物等多层面研究证实如下假设：“BCAR1\Crk\p38MAPK信号轴诱发EMT及活化血小板，从而催生M-CTCs及促使免疫逃避”。我们已获得BCAR1单抗可阻断BCAR1\Crk复合物形成；在此基础上拟通过细胞内抗体同时抑制癌细胞及血小板中BCAR1信号通路，从而预防M-CTCs形成及免疫逃避。本项目将阐明LAC复发转移机制，并有重要临床价值：LAC患者应检测癌组织及监测外周血BCAR1表达，BCAR1胞内抗体有望预防肿瘤转移。</p>
英文摘要	<p>There are two critical steps in the metastasis of lung adenocarcinoma(LAC): ① In order to evade anoikis, LAC will induce epithelial-mesenchymal transition (EMT) to generate M-circulating tumor cells which are highly invasive, and ② The platelets are supposed to be activated to help M-CTCs survive from the killing of natural killer cells. We had found that the high expression of BCAR1 in lung cancer predicts poor prognosis, and are significantly related to the increasing of M-CTCs and decreasing of NK activity. Additionally, we had found BCAR1\Crk complex can induce EMT and activate platelets via the activation of p38MAPK signaling cascade. We postulated BCAR1\Crk\p38MAPK cascade enhances the occurrence of M-CTCs and immune evasion. We aimed to verify the abovementioned hypothesis via the clinical observation and studies in vivo and vitro. Importantly, we had obtained the McAb of BCAR1 which can block the formation of BCAR1\Crk complex effectively. We will block the BCAR1 signaling cascade simultaneously in cancer cells and platelets by using intracellular BCAR1 antibody so as to avoid the occurrence of M-CTCs and immune evasion. This project is supposed to elucidate the mechanism of tumor recurrence or metastasis. In LAC cases, we should test and screen the expression of BCAR1 in tumor tissue and peripheral blood. Intracellular BCAR1 antibody is supposed to prevent the tumor metastasis.</p>



项目组主要参与者（注：项目组主要参与者不包括项目申请人）

编号	姓名	出生年月	性别	职 称	学 位	单位名称	电话	电子邮箱	证件号码	每年工作时间（月）
1	钱凯	1984-08-20	男	主治医师	硕士	中国人民解放军第三军医大学	023-68757985	qk1984@126.com		8
2	冯涌耕	1987-04-12	男	助教	硕士	中国人民解放军第三军医大学	023-68757985	fengyonggeng_1@163.com		8
3	王颖建	1984-11-15	男	助教	硕士	中国人民解放军第三军医大学	023-68757985	wangyj@hotmail.com		8
4	范小青	1979-03-14	女	技术员	其他	中国人民解放军第三军医大学	023-68757918	wrp79wrp@163.com		8
5	张景阁	1986-06-18	女	实验员	硕士	中国人民解放军第三军医大学	023-68757918	zhangjingge@163.com		8
6	于杰	1987-11-23	男	博士生	其他	中国人民解放军第三军医大学	023-68757986	15023236536@163.com		9
7	曾小飞	1982-05-01	男	硕士生	学士	中国人民解放军第三军医大学	023-68757985	zengxiaofei1982@sina.cn		8
8	张全	1989-01-23	男	硕士生	学士	中国人民解放军第三军医大学	023-68757987	zhangquan_1989@163.com		8

总人数	高级	中级	初级	博士后	博士生	硕士生
9	1	1	4		1	2



国家自然科学基金项目资金预算表（定额补助）

项目名称：肺腺癌通过BCAR1生成高侵袭性循环肿瘤细胞及免疫逃避的研究

项目负责人：邓波

金额单位：万元

序号	科目名称	金额	备注
	(1)	(2)	(3)
1	一、项目资金支出	90.0000	/
2	(一) 直接费用	75.0000	直接用于实验的开支
3	1、设备费	0.0000	
4	(1) 设备购置费	0.0000	
5	(2) 设备试制费	0.0000	
6	(3) 设备改造与租赁费	0.0000	
7	2、材料费	37.5000	抗体、酶等分子生物学试剂费
8	3、测试化验加工费	22.0000	CTCs检测、TMA制作等
9	4、燃料动力费	0.0000	
10	5、差旅费	1.0000	CSCO会议交通差旅费、食宿费用等
11	6、会议费	1.0000	用于承办项目成果专家指导会议
12	7、国际合作与交流费	2.0000	前往美国Mayo Clinic实验室交流
13	8、出版/文献/信息传播/知识产权事务费	3.5000	论著出版，专利申请、维持，文献检索、查新
14	9、劳务费	8.0000	直接参加项目研究的研究生的劳务费
15	10、专家咨询费	0.0000	
16	11、其他支出	0.0000	
17	(二) 间接费用	15.0000	为研究提供房屋，水、电、管理费等
18	其中：绩效支出	3.7500	
19	二、自筹资金	0.0000	



预算说明书

本项目经费合计90万元，其中直接费用：75万元，间接费用15万元。具体预算说明如下：

(一) 直接费用

1. 设备费

无

2. 材料费：37.5万元。

(1) 抗体：5万元。

利用IHC及WB检测组织中蛋白表达，利用WB检测血小板中蛋白表达，购买检测抗体。

(2) 内切酶和连接酶：1万元。

分子克隆常用内切酶、连接酶等，用于构建重组表达质粒进行双酶切，Cell signal公司产品，500U/支，约需6000U。

(3) 检测试剂盒：5万元。

进行检测WB、IHC、ELISA、巢巢凋亡检测等

(4) 实验动物费：合计3.5万元

清洁级NOD-SCID小鼠：共3.5万元。

清洁级NOD-SCID小鼠600只(20大组，每组10只，重复3次)，用于构建荷瘤模型实验，观察BCAR1抗体及BCAR1-RNAi慢病毒载体对M-CTCs及CTM的影响，小鼠单价25元/只，饲养费1.2元/天，需要饲养30天，共25元/只×600只+1.2元/天×30天×600只=35000。

(5) 细胞实验相关费用：合计11万元。

用于肺腺癌细胞功能研究及血小板功能研究，观察BCAR1抗体及BCAR1-RNAi慢病毒载体对M-CTCs及CTM的影响

(6) 常用生化试剂：合计6万元。

主要用于配置培养基、琼脂糖凝胶电泳缓冲液、SDS-PAGE蛋白电泳液以及其他常规生化试剂等。

(7) 常规耗材：合计6万元。

主要用于常规分子克隆、表达纯化以及动物实验中使用的耗材。

3. 测试化验加工费：22万元

(1) CanPatroltm检测费用：20万元

用于M-CTCs及CTM检测，1000元/例，大约200例，合计20万元。

(2) 免疫病理切片及TMA制作：1.0万元。

主要用于观察并测定BCAR1在肺癌组织中的表达丰度。拟制作10张组织芯片，每张1000元。

(3) 电镜超微结构处理和观察费：0.8万元

(4) 实验相关其他测试费用：0.2万元。主要用于与课题相关的紫外可见分光光度计检测，基因测序，ELISA检测，蛋白纯度检测等。

4. 燃料动力费：无

5. 差旅费：合计1万元

项目组成员2人参加2017年CSCO会议交通差旅费(来回机票1600×2=3200元)，食宿费用(300/天×3×2=1800元)等，合计5000元。在会议上争取以壁报形式报告实验进展。项目组成员2人参加2018年CSCO会议交通差旅费(来回机票1600×2=3200元)，食宿费用(300/天×3×2=1800元)等，合计5000元。在会议上争取以壁报形式报告实验进展。

6. 会议费：1.0万元。

本项目进行期间，用于承办项目成果专家指导会议和项目成果鉴定会，包括会议场地费、会务费，资料费等。

项目成果鉴定会会议场地，资料费：用于本项目完成前对本项目中BCAR1抗体作为生物制品进行申报的专家指导会议和最后项目成果鉴定会。共举行1次，会期2天，每次预计参加人员10名(包括项目组成员5人，学生3人，以及2名专家)。会议室租用费用：7000元/天，会议资料费3000元/次，合计1万元。

承办会议时布置会场费用等。

7. 国际合作与交流费：2.0万元。

用于在项目研究开发过程中，项目组研究人员前往美国Mayo医学中心Dr. Yang Ping实验室交流(机票住宿等，拟派2人，费用包括飞机票、签证费、住宿费和注册费等。

费用包括：[机票食宿(8000元)+签证保险费(2000元)]×2人=2.0万元。

8. 出版/文献/信息传播/知识产权事务费3.5万元

用于SCI论文发表，书籍购买、文献检索、资料费，新药申请、专利申请与维持费以及知识产权顾问费等。

(1) 学术论文发表费用：合计2.6万元。

国际期刊平均5000元/篇，四年共计4篇，计2万元；国内期刊平均2000元/篇，三年共计3篇，计0.6万元。

(2) 论文、文献印刷费、上网费、文献资料费：合计0.9万元。

① 文献、资料印刷费：文献打印、印刷0.2万元×3年=0.6万元。

② 上网费：2台×50元/月/台×12月/年×3年=0.3万元。

9. 劳务费：合计8万元

没有工资性收入的在校研究生、博士和临时聘用人员的劳务费用。

间接经费：15万元

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，主要包括依托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：3.0万元

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。



报告正文

(一) 立项依据与研究内容 (4000-8000 字):

1. **项目的立项依据** (研究意义、国内外研究现状及发展动态分析,需结合科学研究发展趋势来论述科学意义;或结合国民经济和社会发展中迫切需要解决的关键科技问题来论述其应用前景。附主要参考文献目录);

(1) 肺腺癌细胞发生上皮间质转化(EMT)生成间质型循环肿瘤细胞(M-CTCs)逃避失巢凋亡;肺腺癌患者血小板活化可帮助 CTCs 逃避 NK 细胞杀伤。

我们新近发表于 JAMA 的研究发现:肺癌作为第一大癌症杀手,发病已趋于年轻化[1]。肺腺癌是非小细胞肺癌中最常见的一种亚型且易发生复发转移,70%患者在确诊时已发生转移而影响手术疗效[2],而术后发生转移更进一步降低了患者的生存率。我们的临床研究发现,即使在 Ia 期肺腺癌中,术后五年无病生存率也仅为 75.4%,约 23%的患者复发或转移[3]。全球每年约 500,000 人死于肺腺癌,针对肺腺癌抗复发转移治疗是目前的研究热点[2]

2013 年,《Nature》、《Science》等报道[4,5]肿瘤通过上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)丢失上皮细胞的某些表型(形态、表面抗原、基因表达等)并获得间质细胞的表型,产生干细胞及间质特性,增加运动能力,使肿瘤细胞脱落并进入血管,从而形成循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs);CTCs 随血液流动、播散,最终形成复发或转移[4,5]。CTCs 分为单纯上皮型(未发生 EMT 并具有上皮标志物),单纯间质型(发生了 EMT 仅具有间质标志物)与混合型(发生了 EMT 兼具间质及上皮标志物,根据标志物成份又分为三亚类:即间质为主,上皮为主及间质上皮均衡)[5]。单纯间质型及以间质标志物为主的混合型 CTCs 统称为 M-CTCs,反之称为 E-CTCs。多项研究证实,进入循环系统后大量 E-CTCs 发生失巢凋亡(细胞与细胞外基质或相邻细胞脱离接触而诱发的凋亡,即 anoikis);而发生过 EMT 的 M-CTCs 更易抵抗失巢凋亡[5-7];较之 E-CTCs, M-CTCs 更具存活力和侵袭性,并与化疗耐药、肿瘤复发转移及预后更为相关[5-7]。

除发生失巢凋亡外,绝大多数 CTCs 在外周血中会被免疫系统消灭[8]。NK 细胞是一种细胞毒性淋巴细胞,它优先杀伤主要组织相容性复合体 I (MHC-I)



低表达或不表达的细胞，在肿瘤免疫中发挥着关键的作用。而我们的研究发现肺腺癌细胞会丢失 MHC-I [9]。那么，肺腺癌 M-CTCs 如何逃避 NK 细胞杀伤呢？

研究表明肺腺癌患者外周血小板明显活化并帮助癌细胞免疫逃避[10]：一方面血小板包被在 CTCs 表面使 CTCs 共同表达 MHC-I，从而逃避 NK 细胞的自然杀伤作用[11]；另一方面血小板活化释放的 TGF- β 可下调 NK 细胞活化受体 NKG2D 蛋白表达、抑制 NK 细胞活性[12]，TGF- β 还可抑制 NK 细胞产生干扰素- γ 和细胞毒性反应，从而协助肺癌细胞逃避 NK 细胞的杀伤[13]。

(2) 我们发现肺腺癌高表达 BCAR1 预后差，BCAR1 促进细胞侵袭、诱发 EMT、活化血小板；BCAR1 高表达与 M-CTCs 生成及 NK 细胞活性降低密切相关。

人们最初在 v-Crk/v-Src 转化鸡胚细胞中发现一种分子量为 130kDa 的蛋白，为 v-Src 和 v-Crk 的连接位点，具有酪氨酸激酶活性，故命名 p130cas（又名 *Breast cancer anti-oestrogen resistance 1*，即 BCAR1，并非 BRCA1）[14,15]。

BCAR1/p130cas 主要由氨基末端结构域、底物结合区及羧基末端结构域组成

[14,15]。2006 年《cell》杂志上研究揭示 BCAR1 是细胞外基质与胞内信号传导之间的桥梁分子：细胞与胞外基质接触后激活整合素 \rightarrow FAK 激活并结合到 BCAR1 氨基端 \rightarrow 磷酸化 BCAR1 羟基端 \rightarrow BCAR1 与 Src 激酶结合 \rightarrow BCAR1 活化 \rightarrow 形成

BCAR1/Crk 复合体 \rightarrow Crk 通路被激活 [14,15]。2010 年《Nature Reviews Cancer》杂志述评指出“BCAR1 作为细胞支架蛋白家族的重要成员，在肿瘤生物学中发挥主角作用，将成为肿瘤研究的焦点”[16]。2013 年我们于《Carcinogenesis》综述了 BCAR1 在多种恶性肿瘤中的促瘤效应 [17]。

我们在国家自然科学基金青年项目资助下 [NSFC81101782]，在肺癌中开展了 BCAR1 相关生物学功能的系列研究 [详见工作基础(1)-(8)]：发现 BCAR1 蛋白在肺癌组织中高表达，而在癌旁组织中低表达 [18]；肺癌分期越晚，组织分化程度越低，癌组织 BCAR1 表达越高 [19,20]；我们联合美国 Mayo 医学中心，开展多中心临床研究证实肺癌 BCAR1-mRNA 及蛋白表达水平越高，预后越差 [19,20]。

我们的后续研究发现 BCAR1 高表达可促进肺腺癌细胞克隆形成、迁徙及侵袭 [20]。我们发现 RNAi 可使肺癌细胞 BCAR1 表达降低 80% 以上；BCAR1-RNAi 后，肺腺癌 A549 细胞克隆形成的能力显著降低；细胞侵袭、迁移的能力显著降低；细胞周期发生阻滞 [20]。我们的研究进而发现 BCAR1 高表达诱导肺腺癌细胞发



生 EMT[21]。我们证实了 BCAR1 高表达促进 E-Cadherin 降解,促使 A549 细胞失去极性并形成伪足,促进细胞发生迁移、侵袭,从而发生 EMT, BCAR1-RNAi 可显著抑制 A549 细胞发生 EMT[21]。重要的是,我们发现其他细胞因子如 TGF- β 1 诱发 EMT 同样需要通过 BCAR1 信号通路实现, BCAR1-RNAi 可阻断 TGF- β 1 诱发 EMT[21]。

我们对肺腺癌组织 BCAR1 表达与治疗前 M-CTCs 数量进行了研究,发现癌组织 BCAR1 表达与 M-CTCs 数量显著相关[详见工作基础(6)]。根据前期研究及文献报道,我们推测肺腺癌组织中 BCAR1 \rightarrow 诱发 EMT \rightarrow 生成 M-CTCs \rightarrow 逃避失巢凋亡(图 1)。有趣的是,研究证实结肠腺癌、肺腺癌细胞 BCAR1 上调及活化的确可帮助癌细胞逃避失巢凋亡[22, 23]。

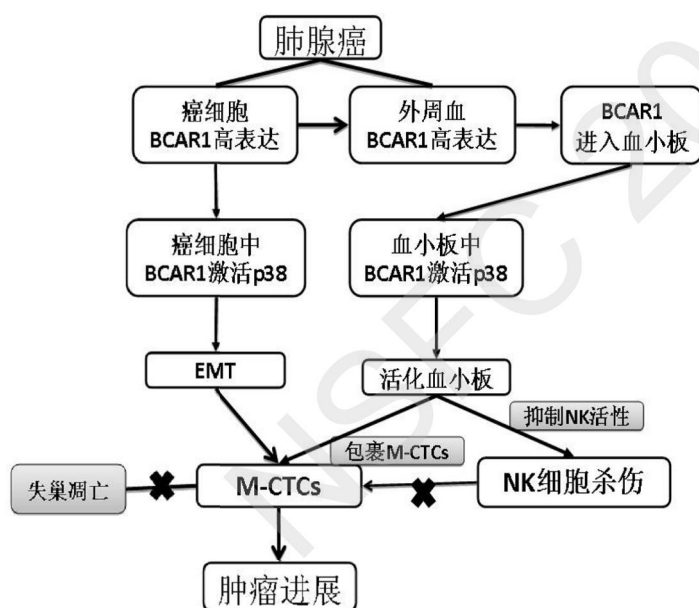


图1 BCAR1导致M-CTCs产生并发生免疫逃避

我们的最新研究发现,肺腺癌患者外周血 BCAR1 高表达[18];肺癌分期越晚,外周血 BCAR1 丰度越高,手术后外周血 BCAR1 含量逐渐缓慢降低[18, 19]。外周血 BCAR1 可进入并活化血小板 [详见工作基础(7)]: 在健康人的洗涤血小板中加入肺癌患者血浆 (富含 BCAR1 且去除血小板) 孵育 3h 后,透射电子显微镜

显示外周血 BCAR1 可通过内吞作用 (endocytosis) 进入血小板中, WB 显示血小板中 BCAR1 含量显著增加;流式细胞术显示血小板表面 P-selectin 表达显著增高,血小板活化。

我们对肺腺癌术前外周血 BCAR1 与 NK 细胞活性的关系做了初步研究,发现外周血 BCAR1 越高, TGF- β 1 表达越高, NK 细胞活性越低[详见工作基础(8)]。根据前期研究及文献报道,我们推测肺腺癌患者外周血中 BCAR1 \rightarrow 活化血小板 \rightarrow 释放 TGF- β 1 \rightarrow NK 细胞活性降低 \rightarrow CTCs 免疫逃避 (图 1); 另外活化血小板可覆

盖于 M-CTCs 表面，共表达 MHC- I，逃避 NK 细胞的杀伤（图 1）。

综上，BCAR1 信号通路在肺腺癌细胞及血小板中均发挥了重要的促瘤作用，但具体分子机制如何？

(3)BCAR1 与 Crk 形成复合物，激活 p38MAPK 信号通路，从而发挥促瘤作用。BCAR1 单克隆抗体可有效阻止 BCAR1\Crk 复合物形成。我们拟通过 BCAR1 胞内抗体同时抑制肺腺癌细胞及血小板中 BCAR1\Crk\p38MAPK 信号通路，从而预防 M-CTCs 形成及免疫逃避。

《cell》研究表明BCAR1被上游信号活化后其底物结合区可暴露出与接头蛋白 Crk的连接位点 (pTyr-X-X-Pro)，形成BCAR1\Crk复合体，Crk的SH3结构域进一步与下游分子DOCK180结合[14,15]，从而激活RAC1[24]；RAC1可进一步激活丝裂原活化蛋白激酶（p38MAPK）信号通路[25]（图2）。我们的研究证实BCAR1可激活p38MAPK信号通路：肺腺癌细胞BCAR1-RNAi后p-p38MAPK表达显著降低，p38MAPK信号通路被抑制[20,21]；在健康人的洗涤血小板中加入肺癌患者血浆（富含BCAR1且去除血小板）孵育3h后，WB显示血小板中p-p38MAPK含量显著增加。

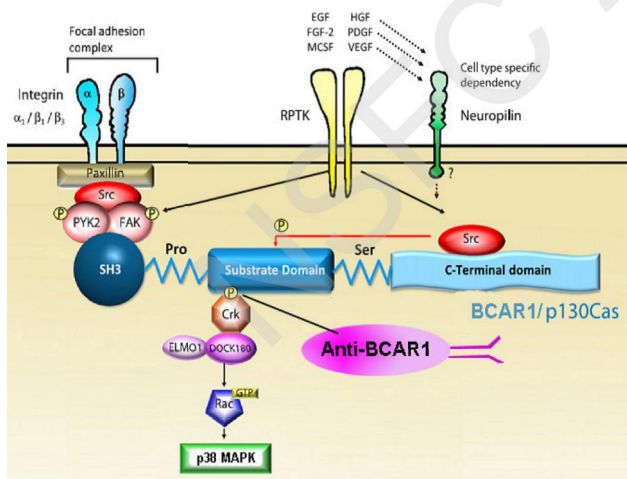


Fig.2 Signaling pathway of anti-BCAR1 on p38MAPK inactivity

血小板[27]。

由此可见，肺腺癌细胞中BCAR1激活p38MAPK信号通路诱发EMT，BCAR1在血小板中激活p38MAPK活化血小板。因此，同时阻止癌细胞及血小板中BCAR1与Crk形成复合物，可阻断BCAR1激活p38MAPK信号通路，有望抑制BCAR1的促瘤效应。

项目组目前已成功构建BCAR1-RNAi病毒载体[20,21]；项目组所在的全军胸外科研究所有丰富的杂交瘤抗体工程经验[28]。在此基础上我们以p130cas蛋白为

加。

目前研究证明p38MAPK信号通路的激活在肺腺癌细胞EMT过程中发挥关键作用，p38MAPK抑制剂可阻断TGF-β1、Wnt、PI3K/AKT等EMT诱导剂诱发EMT[26]。而研究亦证实血小板中p38MAPK信号通路激活后使血小板表面粘附分子P-selectin表达增加从而活化



抗原免疫BALB/c小鼠，建立杂交瘤细胞系，成功纯化鼠抗人BCAR1特异性单克隆抗体（Anti-BCAR1）[详见工作基础(9)]。Anti-BCAR1可以高亲和力结合并封闭BCAR1中pTyr-X-X-Pro区域。通过GST-pull down分析，我们发现Anti-BCAR1可有效阻止A549细胞中BCAR1/crk复合体的形成[详见工作基础(9)]。

近来细胞内抗体技术（通过特异的信号肽将抗体运输到细胞内以结合靶蛋白）备受关注，《Nature Immunology》杂志将其列为抗体工程重要进展[29, 30]。研究表明蛋白质转导域（protein transduction domain, PTD）介导的抗体转运可在低温条件下发生，与被转运蛋白的大小无关，且不存在细胞特异性[30]；相比RNAi，此法不会造成任何永久性的基因组改变，安全可靠、作用特异性强、亲和力高、半衰期长、可有效抑制靶蛋白的功能[30]。胞内抗体在治疗肿瘤、移植排斥反应和神经退行性病变等方面被寄予厚望[29, 30]。我们下一步拟将PTD的编码序列插入到抗体编码序列的末端，重新表达制备PTD-Anti-BCAR1抗体，使之可以穿过细胞膜进入细胞内部。我们相信，PTD-Anti-BCAR1将有效阻止癌细胞及血小板中BCAR1\Crk复合物形成，抑制BCAR1激活p38MAPK信号通路（图2）。

综上，我们完全有理由相信肺腺癌细胞通过BCAR1\p38MAPK信号通路，生成高侵袭性M-CTCs逃避失巢凋亡；外周血BCAR1进入血小板后激活p38MAPK信号通路、活化血小板帮助M-CTCs逃避NK细胞杀伤。本项目将有望阐明肺腺癌复发转移理论，并具有重要的临床价值：在肺腺癌患者应检测癌组织中BCAR1表达及动态监测外周血BCAR1表达，并给予BCAR1细胞内抗体预防M-CTCs形成及免疫逃避。

参考文献

1. Wang Y, Midthun DE, Wampfler JA, Deng B, Stoddard SM, et al. (2015) Trends in the proportion of patients with lung cancer meeting screening criteria. JAMA 313: 853-855.
2. Imielinski M, Berger AH, Hammerman PS, Hernandez B, Pugh TJ, et al. (2012) Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing. Cell 150: 1107-1120.
3. Deng B, Cassivi SD, de Andrade M, Nichols FC, Trastek VF, et al. (2014) Clinical outcomes and changes in lung function after segmentectomy versus lobectomy for lung cancer cases. J Thorac Cardiovasc Surg 148: 1186-1192 e1183.
4. Marx V (2013) Tracking metastasis and tricking cancer. Nature 494: 133-136.
5. Yu M, Bardia A, Wittner BS, Stott SL, Smas ME, et al. (2013) Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. Science 339: 580-584.
6. Frisch SM, Schaller M, Cieply B (2013) Mechanisms that link the oncogenic epithelial-mesenchymal transition to suppression of anoikis. J Cell Sci 126: 21-29.



7. Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, Donaldson MC, Wittner BS, et al. (2014) Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell* 158: 1110-1122.
8. Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV, La Jeunesse CM, Flick MJ, et al. (2005) Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. *Blood* 105: 178-185.
9. Deng B, Wang RW, Jiang YG, Lin YD, Tan QY, et al. (2008) Human leukocyte antigen-ABDR genes in pulmonary adenocarcinoma cell lines. *Chest* 134: 890.
10. Gong L, Cai Y, Zhou X, Yang H (2012) Activated platelets interact with lung cancer cells through P-selectin glycoprotein ligand-1. *Pathol Oncol Res* 18: 989-996.
11. Placke T, Orgel M, Schaller M, Jung G, Rammensee HG, et al. (2012) Platelet-derived MHC class I confers a pseudonormal phenotype to cancer cells that subverts the antitumor reactivity of natural killer immune cells. *Cancer Res* 72: 440-448.
12. Crane CA, Han SJ, Barry JJ, Ahn BJ, Lanier LL, et al. (2010) TGF-beta downregulates the activating receptor NKG2D on NK cells and CD8+ T cells in glioma patients. *Neuro Oncol* 12: 7-13.
13. Trotta R, Dal Col J, Yu J, Ciarlariello D, Thomas B, et al. (2008) TGF-beta utilizes SMAD3 to inhibit CD16-mediated IFN-gamma production and antibody-dependent cellular cytotoxicity in human NK cells. *J Immunol* 181: 3784-3792.
14. Sawada Y, Tamada M, Dubin-Thaler BJ, Cherniavskaya O, Sakai R, et al. (2006) Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas. *Cell* 127: 1015-1026.
15. Geiger B (2006) A role for p130Cas in mechanotransduction. *Cell* 127: 879-881.
16. Cabodi S, del Pilar Camacho-Leal M, Di Stefano P, Defilippi P (2010) Integrin signalling adaptors: not only figurants in the cancer story. *Nat Rev Cancer* 10: 858-870.
17. Deng B, Li Y, Zhang Y, Bai L, Yang P (2013) Helicobacter pylori infection and lung cancer: a review of an emerging hypothesis. *Carcinogenesis* 34: 1189-1195.
18. Deng B, Huang W, Tan QY, Fan XQ, Jiang YG, et al. (2011) Breast cancer anti-estrogen resistance protein 1 (BCAR1/p130cas) in pulmonary disease tissue and serum. *Mol Diagn Ther* 15: 31-40.
19. Deng B, Sun Z, Jason W, Yang P (2013) Increased BCAR1 predicts poor outcomes of non-small cell lung cancer in multiple-center patients. *Ann Surg Oncol* 20 Suppl 3: S701-708.
20. Huang W, Deng B, Wang RW, Tan QY, He Y, et al. (2012) BCAR1 protein plays important roles in carcinogenesis and predicts poor prognosis in non-small-cell lung cancer. *PLoS One* 7: e36124.
21. Deng B, Tan QY, Wang RW, Jiang YG, Zhou JH, et al. (2014) P130cas is required for TGF-beta1-mediated epithelial-mesenchymal transition in lung cancer. *Oncol Lett* 8: 454-460.
22. Wei L, Yang Y, Zhang X, Yu Q (2002) Anchorage-independent phosphorylation of p130(Cas) protects lung adenocarcinoma cells from anoikis. *J Cell Biochem* 87: 439-449.
23. Casanova I, Parreno M, Farre L, Guerrero S, Cespedes MV, et al. (2006) Celecoxib induces anoikis in human colon carcinoma cells associated with the deregulation of focal adhesions and nuclear translocation of p130Cas. *Int J Cancer* 118: 2381-2389.
24. Wang H, Linghu H, Wang J, Che YL, Xiang TX, et al. (2010) The role of Crk/Dock180/Rac1 pathway in the malignant behavior of human ovarian cancer cell SKOV3. *Tumour Biol* 31: 59-67.
25. Gonzalez-Villasana V, Fuentes-Mattei E, Ivan C, Dalton HJ, Rodriguez-Aguayo C, et al. (2015)



- Rac1/Pak1/p38/MMP-2 axis regulates angiogenesis in ovarian cancer. Clin Cancer Res.
26. Desai S, Laskar S, Pandey BN (2013) Autocrine IL-8 and VEGF mediate epithelial-mesenchymal transition and invasiveness via p38/JNK-ATF-2 signalling in A549 lung cancer cells. Cell Signal 25: 1780-1791.
27. Qiu W, Chen N, Zhang Q, Zhuo L, Wang X, et al. (2014) Resistin increases platelet P-selectin levels via p38 MAPK signal pathway. Diab Vasc Dis Res 11: 121-124.
28. Zou YB, Guo W, Jiang YG, Wang RW, Zhao YP, et al. (2010) Preparation of a novel monoclonal antibody specific for WIG-1 and detection of its expression pattern in human esophageal carcinoma. Hybridoma (Larchmt) 29: 431-436.
29. McEwan WA, Tam JC, Watkinson RE, Bidgood SR, Mallery DL, et al. (2013) Intracellular antibody-bound pathogens stimulate immune signaling via the Fc receptor TRIM21. Nat Immunol 14: 327-336.
30. Shin MC, Zhang J, Min KA, Lee K, Moon C, et al. (2014) Combination of antibody targeting and PTD-mediated intracellular toxin delivery for colorectal cancer therapy. J Control Release 194: 197-210.

2. 项目的研究内容、研究目标, 以及拟解决的关键科学问题(此部分为重点阐述内容);

2.1 研究目标

本课题将通过 Canpatrol™ 二代CTC检测技术、细胞内抗体工程技术、细胞实验及动物实验等多技术手段, 从分子、细胞、组织以及动物水平等层次围绕以下目标进行研究:

明确 BCAR1 在肺腺癌组织诱发 EMT 导致 M-CTCs 产生, 在外周血中导致血小板活化从而帮助 CTCs 免疫逃避, 从而诱导肿瘤发生转移的生物学机制; 明确应用胞内抗体可抑制癌细胞及血小板 BCAR1 功能, p38MAPK 信号通路失活, M-CTCs 生成减少, CTCs 被 NK 细胞杀伤, 肿瘤转移被抑制。

本研究将从“BCAR1 调控”这个新视点为揭示 M-CTCs 产生及免疫逃避的相关机制奠定基础, 为肺癌抗转移治疗提供新的思路。

2.2 研究内容

本项目的科研设计将依据随机, 对照和重复的三大原则。根据不同情况, 分别采用组间对照和自身前后对照, 并进行质量控制及相应的统计分析。本项目将分别从人体组织血液标本、细胞、动物等多个层面进行研究。

2.2.1 研究肺腺癌组织及外周血 BCAR1 与 M-CTCs 数量、血小板及 NK 细胞活



性的相关性及其临床意义（技术路线图1）。

①前瞻性研究：在第三军医大学大坪医院胸外科收集 160 例新鲜肺腺癌组织、癌旁组织、治疗前外周血。病例选择：吸烟及非吸烟患者各80例。TNM 分期：I 期40 例，II 期40 例，III期40 例，IV期40 例。利用采用实时定量 PCR（RT-PCR）、免疫组化检测（IHC）及Western-Blotting(WB)检测组织标本中BCAR1\p38\p-p38\MHC-I 表达。利用ELISA对外周血BCAR1\TGF-beta1进行检测。利用CanPatrol™检测技术对总CTCs，M-CTCs进行筛选、捕获并计数，利用RT-PCR检测CTCs中BCAR1、MHC-I表达情况。以3.8%枸橼酸钠作为抗凝剂并进行离心，收集血液上清，获得富含血小板的血浆，采用流式细胞仪检测血小板表面P-selectin表达；收集血小板，采用RT-PCR、WB检测血小板中BCAR1、p38、p-p38表达。采用血小板聚集检测仪检测血小板活性。采用同位素释放法检测Nk细胞活性。

对癌组织中BCAR1\p-p38表达、总CTCs、M-CTCs数量行相关分析；对外周血中BCAR1表达，血小板中BCAR1、p-p38MAPK表达及血小板表面P-selectin表达，血小板活性及NK细胞活性进行相关分析。

②质量控制：在第三军医大学大坪医院胸外科收集 40 例肺腺癌患者的新鲜癌组织、癌旁标本及治疗前外周血。病例选择：非吸烟患者20例，吸烟患者20例。TNM 分期：I期10例，II 期10例，III期10例，IV期10例。同时将这些组织标本进行实时定量 PCR（RT-PCR）、免疫组化检测（IHC）及Western-Blotting检测组织标本中BCAR1-mRNA及蛋白表达。通过线性相关分析(Pearson Correlation),验证上述步骤到的RNA及蛋白结果是否存在线性相关。收集血小板，采用RT-PCR、WB检测血小板中BCAR1表达。通过线性相关分析,验证上述步骤到的RNA及蛋白结果是否存在线性相关。

③COX model分析癌组织、外周血BCAR1表达、M-CTCs、血小板活化状态、NK细胞活性与五年总生存率，无病生存率，复发转移的关系。

④统计学分析和检验效能：拟使用线性相关估计蛋白表达水平之间或蛋白与mRNA的相关性，同时校正必要的混杂因素。本项目中，已纳入 200 例病例，按照 0.05 的显著水平，检测到 0.5 以上的相关系数，检验效能完全可达到 90%以上。



2.2.2 通过细胞实验研究肺腺癌组织BCAR1及外周血BCAR1表达对M-CTCs产生、血小板及NK活性的影响（技术路线图2）。

细胞株：肺腺癌细胞株（ABC-1，A549，PC3）。

BCAR1细胞内抗体构建（技术路线图2A）：①质谱测序获得Anti-BCAR1基因序列。②Anti-BCAR1 cDNA的制备：根据Anti-BCAR1基因序列，合成携带有Anti-BCAR1 cDNA的载体质粒。经转染人HeLa细胞，提取细胞总RNA，按照RT试剂盒说明操作将RNA反转录为cDNA。设计PCR引物，上游引物和下游引物PCR。③PTD-Anti-BCAR1 cDNA的制备：以Anti-BCAR1为模板采用上游引物固定，下游引物逐步延伸的方法，将PTD的编码序列引入到Anti-BCAR1 cDNA的3'端。④Anti-BCAR1(rh-Anti-BCAR1)及PTD-Anti-BCAR1(rh Anti-BCAR1-PTD)的表达及鉴定：将PCR产物及载体分别经酶切后构建重组质粒。将测序正确的重组质粒转化至大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞，挑选阳性重组子，提取质粒，经Nco I +Xho I进行酶切鉴定证实为所构建的重组质粒。Western blot鉴定目的蛋白（5）Ni²⁺亲和层析柱纯化rh-Anti-BCAR1及rh Anti-BCAR1-PTD

（1）将BCAR1细胞内抗体运送至肺腺癌细胞系中，研究BCAR1抑制前后以下指标变化：以WB法检测p-p38MAPK表达；观察细胞形态有无延伸等；以CCK8法、克隆形成实验检测细胞增殖、克隆形成能力等；以侵袭小室实验、划痕实验检测细胞迁徙和侵袭能力；以PARP cleavage及流式细胞检测细胞凋亡；以流式细胞检测细胞周期。以激光共聚焦显微镜及Western-blotting检测EMT转录调节因子Snail1、Snail2、Slug等。以Western-blotting检测E-Cadherin、 α -Catenin、 β -Catenin、波形蛋白、纤连蛋白、N-钙粘蛋白等。应用CytoSelect™细胞失巢凋亡分析试剂盒检测细胞BCAR1上调及下调前后细胞失巢凋亡情况。以TGF- β 1、Wnt、PI3K/AKT等EMT刺激因子，孵育BCAR1抑制后的肺腺癌细胞，重复上述实验步骤。

（2）收集40例肺腺癌患者治疗前全血20ml，以3.8%枸橼酸钠作为抗凝剂并进行离心，收集血液上清，获得富含血小板的血浆（PRP）。再离心，去除血小板，4000rpm，10min，吸取上清后再次离心，4000rpm，20min，得到血小板缺乏的血浆（PPP），ELISA测量BCAR1丰度。取健康志愿者静脉血20ml，按静脉血与ACD抗凝剂以7:1比例混合并离心。获得洗涤血小板。将肺癌患者血小板缺乏的血浆与



健康志愿者洗涤血小板各50u1, 37°C孵育3h。收集血小板, 采用流式细胞仪检测血小板表面P-selectin表达; 采用RT-PCR、WB检测血小板中BCAR1、p-p38MAPK、TGF- β 1表达。观察不同BCAR1丰度血浆的对血小板表面P-selectin表达, 血小板中BCAR1、p-p38MAPK表达的影响。应用血小板聚集仪检测不同刺激条件下血小板聚集功能变化(技术路线图2B)。

在血小板中加入BCAR1细胞内抗体, 重复上述步骤。

(3) 将NK细胞株与步骤②得到的活化血小板孵育。分析血小板中BCAR1表达、p-p38MAPK表达、TGF- β 1表达、血小板表面P-selectin与NK活性及增殖能力的相关性。在血小板中加入BCAR1细胞内抗体孵育, 重复上述步骤(技术路线图2B)。

2.2.3 通过动物实验研究 肺腺癌组织及外周血BCAR1表达对荷瘤动物的M-CTCs产生、血小板及NK细胞活性的影响(技术路线图3)。

细胞株: 肺腺癌细胞株(ABC-1, A549, PC3)

将200只NOD-SCID小鼠平均分为10组(每组20只)。在无菌超净台下, 每NOD-SCID小鼠的颈部皮下分别注射入0.5ml 肿瘤细胞悬液, 细胞数为 2×10^6 个。

每天观察NOD-SCID小鼠全身状况、活动情况及颈部皮下肿瘤生长情况, 当出现实质性包块时作为成瘤标志, 当出现实质性包块时继续饲养。A组瘤内注射BCAR1细胞内抗体, B组瘤内注射PTD-GFP, C组尾静脉注射BCAR1细胞内抗体, D组尾静脉注射PTD-GFP, E组瘤内注射+尾静脉注射BCAR1细胞内抗体, F组瘤内注射+尾静脉注射PTD-GFP, G组瘤内注射生理盐水, H组尾静脉注射生理盐水, I组瘤内注射+尾静脉注射生理盐水, J组不做任何注射。4w后取其全身血。观察血小板表面P-selectin表达, 血小板中BCAR1、p-p38MAPK表达的影响。应用血小板聚集仪检测不同刺激条件下血小板聚集功能变化。MTT法检测NK细胞活性(NK细胞检测前3天, 输注入NK细胞或给予NK刺激剂)。CanPatrol™法检测小鼠全身血总CTCs、M-CTCs数量。分离M-CTCs, RT-PCR检测M-CTCs表面MHC-1表达, 免疫荧光检测血小板在CTCs表面附着情况。

2.3 拟解决的关键科学问题

本项目拟解决如下科学问题: ①通过大样本数据分析明确癌组织及血小板

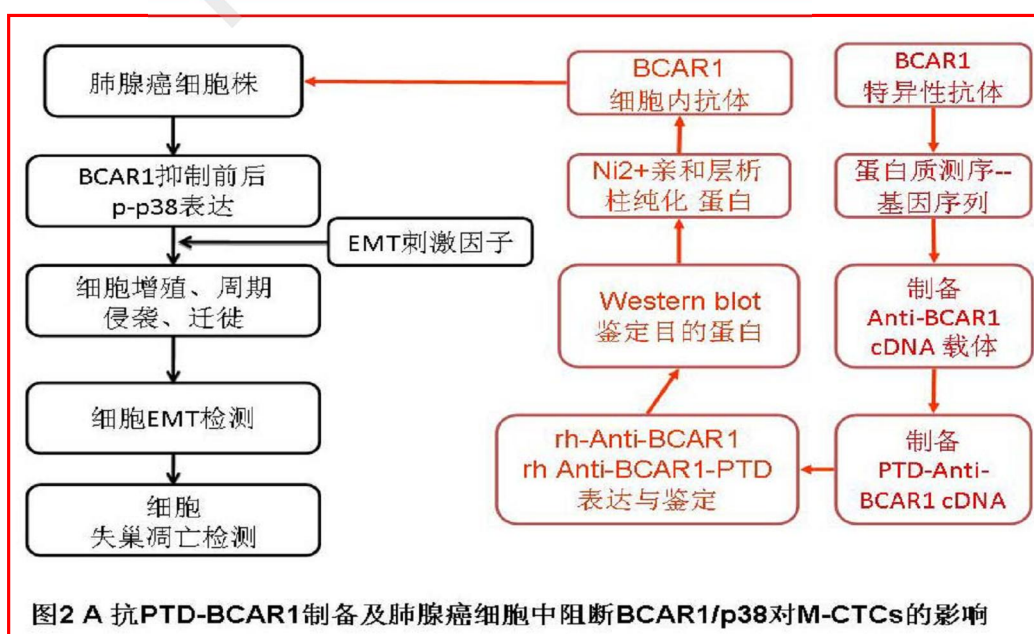
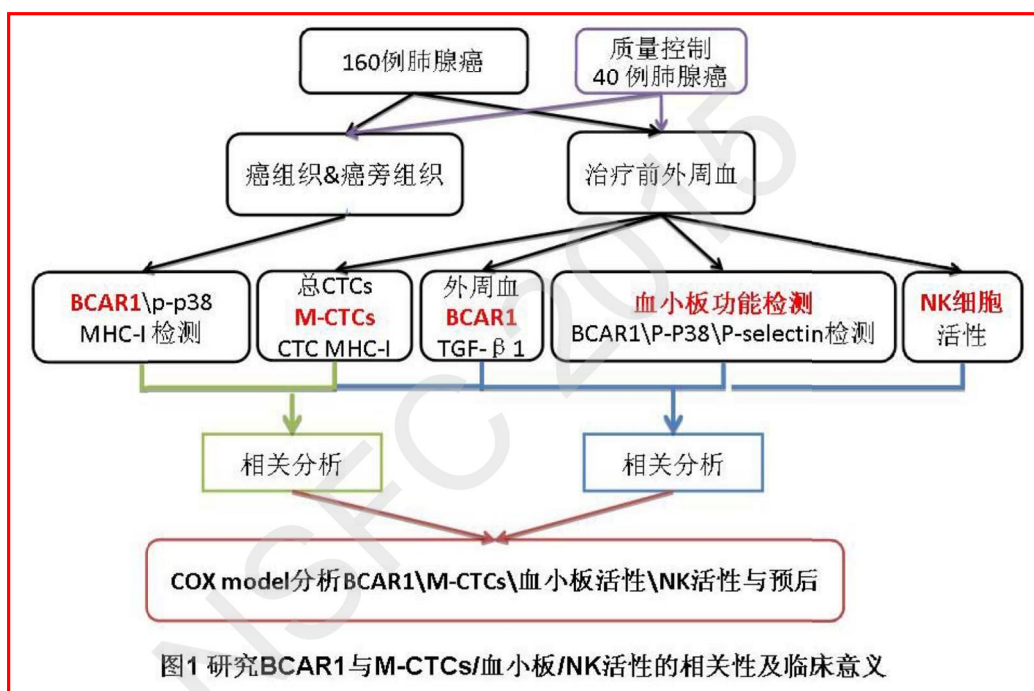


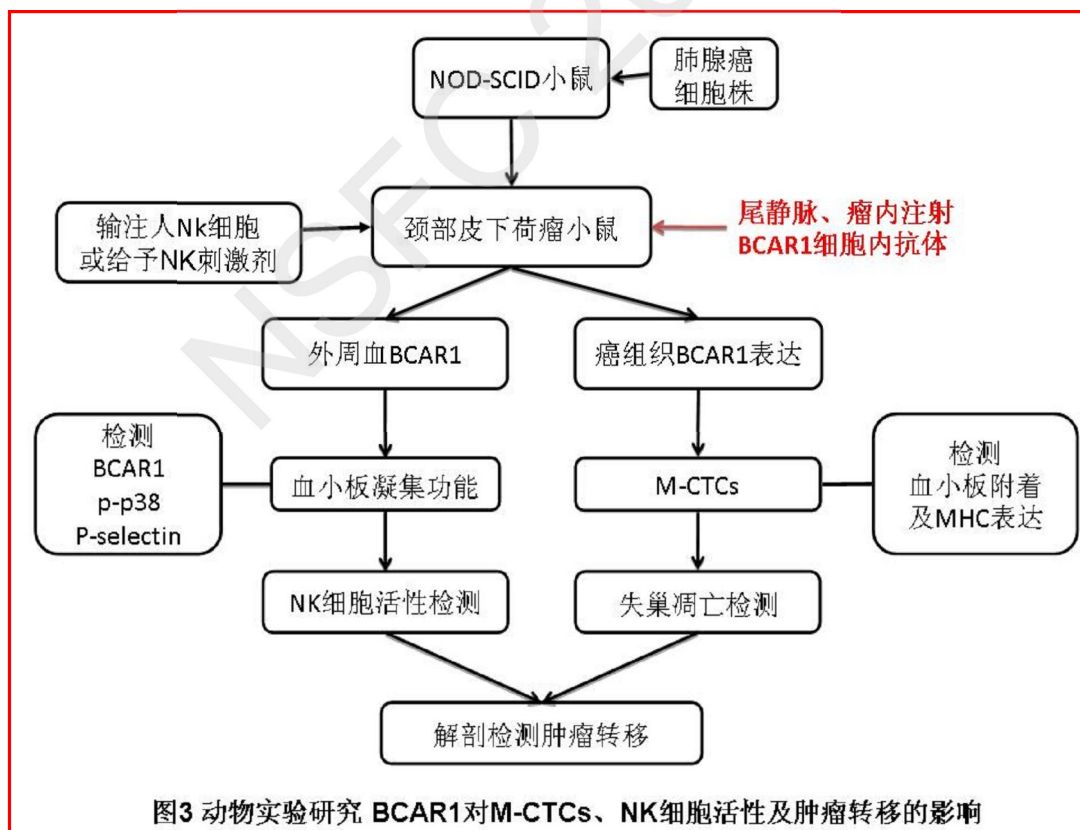
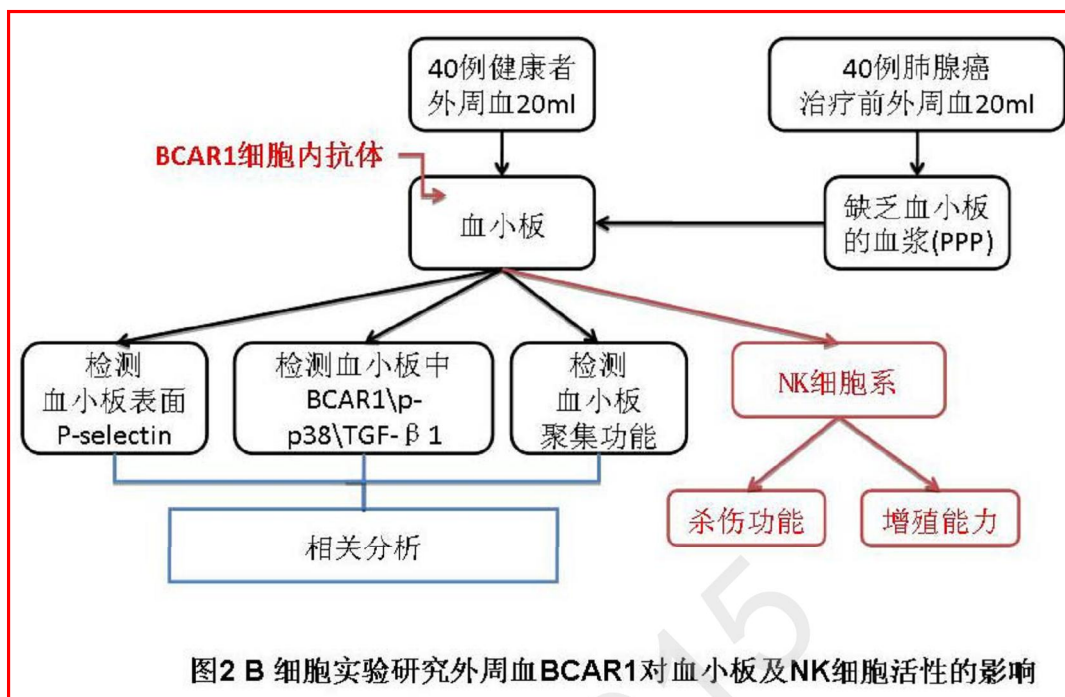
BCAR1\p38MAPK 信号通路促进 M-CTCs 产生及免疫逃避。②通过细胞实验及动物实验明确癌组织 BCAR1 表达是否通过 EMT 导致 M-CTCs 形成,抑制癌细胞的失巢凋亡;外周血 BCAR1 是否通过活化血小板导致免疫逃避。③BCAR1 细胞内抗体抑制癌细胞及血小板中 BCAR1 功能,能否阻断 M-CTCs 形成及免疫逃避。

3. 拟采取的研究方案及可行性分析(包括研究方法、技术路线、实验手段、关键技术等说明);

3.1 技术路线

具体技术路线见下:







3.2 研究方法和实验手段

组织标本收集及组织芯片制作

芯片微陈列设计：在一个载玻片上放置 100 个样本。

收集病例及相关蜡块：挑选出具有随访资料的不同发展阶段的肿瘤组织蜡块，根据 HE 切片对石蜡标本中有代表性的点进行标记，包括典型的肿瘤和相应的正常组织，以构建肿瘤组织芯片。TMA 受体蜡块制备：取 97.5 克莱卡石蜡+2.5 克蜂蜡（2.5%）混合，制成长 36mm*宽 26mm*高 17mm 的空白蜡块，在该蜡块 20mm×16mm 范围内设计 10×8 点组织陈列。组织四周预留 0.5cm-0.7cm 空间，用组织仪打孔制成 TMA 蜡块。

在组织芯片制作机上用细针对受体蜡块打孔，孔径以 1-1.5mm 比较适宜。同样在供体蜡块上标记的相应部位打孔采集组织芯。孔径为 1-1.5mm。将组织芯转移到受体模块的孔中，每个组织芯之间的间距 0.2mm。放入 55℃温箱中约 10 分钟，在蜡将要完全溶解前，取出室温下冷却，使受体模块的蜡与新插入的小圆柱状组织溶为一体，取下蜡块，于 4℃冰箱中保存备用。切片前，蜡块在 4℃中预冷 4h 左右，然后夹在切片机上进行修正，等修到全部组织完整为止。用-20℃预冷冰袋贴在蜡块上 5-10min 左右，快速连续切片 30-50 张左右，再用冰袋冷冻组织块，直至将组织切完为止。将 4 μm 连续切片分别漂在凉水中，让其自然展开，按顺序将切片转移至 45℃的温水中展片 2min 左右，将其贴在浸有 APES 切片黏合剂的载玻片上晾干，60℃中烤片 3min 左右，58℃中继续烤片 18h，-20℃保存备用。

参考我们已发表文献

1. Huang W, Deng B, Wang RW, Tan QY, He Y, et al. (2012) BCAR1 protein plays important roles in carcinogenesis and predicts poor prognosis in non-small-cell lung cancer. PLoS One 7: e36124.
2. Deng B, Huang W, Tan QY, Fan XQ, Jiang YG, et al. (2011) Breast cancer anti-estrogen resistance protein 1 (BCAR1/p130cas) in pulmonary disease tissue and serum. Mol Diagn Ther 15: 31-40.

外周血循环肿瘤细胞分型及检测

(1) 样本采集：1. 准备 EDTA 抗凝采血管、样本保存管和样本采集连接器。



2. 使用 8 号采血针和 EDTA 抗凝采血管采集 5mL 外周血。3. 血样采集后, 将 EDTA 抗凝采血管上下颠倒混匀 10 次。4. 揭开样本采集连通器上的灰色标签。5. 将 EDTA 抗凝采血管插入孔内, 使孔中针头刺穿采血管橡胶塞。6. 然后揭开样本采集连通器上的红色标签。7. 将样本保存管插入孔内, 使孔中针头刺穿样本保存管橡胶塞, EDTA 抗凝采血管内的血液将自动输入样本保存管内。8. 待样本保存管内的液面不再上升后, 拔出样本保存管, 上下颠倒混匀 10 次。9. 室温放置 30min。

(2) 人外周血循环肿瘤细胞富集: 1. 离心去除上清, 固定剂固定 8min。2. 通过真空歧管将过滤器与真空泵连接。将样本保存管中的液体转移至过滤器中。3. MR1A 样本制备: 甲醛溶液室温固定 60min。

(3) 多重 RNA 原位分析检测: 1. 透化剂孵育 5min, PBS 洗涤三次。2. 消化酶孵育 60min, PBS 洗涤三次。3. 加入探针工作液, 置于 $40 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 生化培养箱中, 孵育 3h。洗涤液洗涤三次。4. 加入预扩增工作液, 置于 $40 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 生化培养箱中, 孵育 30min。洗涤液洗涤三次。5. 加入扩增工作液, 置于 $40 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 生化培养箱中, 孵育 30min。洗涤液洗涤三次。6. 加入显色工作液, 置于 $40 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 生化培养箱中, 孵育 30min。洗涤液洗涤三次。7. 在样本上加抗淬灭剂(含 DAPI)。8. 样本放置 5min 后直接进行结果观察。

(4) 质控: 首次使用, 通过参考品对试剂盒进行质控。

(5) 数据分析: 结果的控制指标、判断:

	类型	红色荧光信号点	绿色荧光信号点	蓝色荧光信号点	DAPI
CTCs	I	+	-	-	+
	II	+	+	-	+
	III	-	+	-	+

本试剂盒采用多重 RNA 探针, 分别针对多种 CTCs 特异性基因, 通过不同颜色荧光信号, 可进一步将 CTCs

分型。其中 I 型 CTCs 显示为红色荧光信号点, 显示为绿色荧光信号点, 同时表达 I 型和 III 型特异性基因的 CTCs 为 II 型(同时显示红色荧光及绿色荧光信号点)。CTCs 分型标准如下:

参考我校发表文献

1. Li YM, Xu SC, Li J, Han KQ, Pi HF, et al. (2013) Epithelial-mesenchymal transition markers expressed in circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma patients with different stages of disease. Cell Death Dis 4: e831.



血小板功能检测

取血小板缺乏的血浆（PPP）作光学对照，取富含血小板的血浆（PRP）作为实验材料，在血小板聚集仪上，在聚集杯内加入转子，调整基线，然后分别加入终浓度为 5 μ g/ml 的胶原蛋白（collagen）、终浓度为 5 μ mol/L 的 ADP，比较两组不同人群的血小板在 ADP、collagen 等不同生理刺激剂诱导下发生的聚集，观察血小板的功能变化。

参考我校发表文献

1. Wang X, Shi RH, Li J, Liu FJ, Chen HM, et al. (2009) [Morphology and function of platelets stored in modified platelet additive solution at low temperature]. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi 17: 797-801

细胞内抗体合成

（1）杂交瘤抗体工程获得 BCAR1 单克隆抗体 Anti-BCAR1。蛋白质谱测序，从而获得 Anti-BCAR1 的基因序列。

（2）Anti-BCAR1 cDNA 的制备：根据 Anti-BCAR1 基因序列，合成携带有 Anti-BCAR1 cDNA 的载体质粒 pMAGic 4.1。经慢病毒载体转染人 Hela 细胞，取 6×10^6 用 Tripure 提取细胞总 RNA，按照 RT 试剂盒说明操作将 RNA 反转录为 cDNA。为得到实验所需 cDNA，设计 PCR 引物，上游引物和下游引物分别选用 Nco I 和 Xho I 两个酶切位点，PCR 的反应程序如下：94 $^{\circ}$ C 5 min；然后 (94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min) \times 30 个循环；最后 72 $^{\circ}$ C 10 min。反应完成后，取 5 μ l 产物于 1%琼脂糖凝胶中电泳鉴定结果。

（3）PTD-Anti-BCAR1 cDNA 的制备：以 Anti-BCAR1 为模板采用上游引物固定，下游引物逐步延伸的方法，将 PTD 的编码序列 (33 bp) 引入到 Anti-BCAR1 cDNA 的 3' 端。PCR 的简要过程如下：应用上游引物及下游引物 1 进行第 1 次 PCR，反应程序为 94 $^{\circ}$ C 5 min；然后 (94 $^{\circ}$ C 30 s; 60 $^{\circ}$ C 30 s; 72 $^{\circ}$ C 1min) \times 30 个循环；最后 72 $^{\circ}$ C 10 min。反应完成后，将纯化回收后的 PCR 产物作为模板进行第 2 次 PCR，除下游引物换为引物 2 其他条件不变。再将此次的 PCR 纯化回收产物作为模板进行第 3 次 PCR，下游引物换为引物 3。取 PCR 产物 5 μ l 于 1%琼脂糖凝胶中电泳以鉴定结果。



(4) Anti-BCAR1(rh-Anti-BCAR1)及PTD-Anti-BCAR1(rh Anti-BCAR1-PTD)的表达及鉴定:将PCR产物及载体pET28a(+)分别经Nco I +Xho I酶切后构建重组质粒(命名为pET28a-Anti-BCAR1和pET28a- Anti-BCAR1-PTD)。将测序正确的重组质粒转化至大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞,挑选阳性重组子,提取质粒,经Nco I +Xho I进行酶切鉴定证实为所构建的重组质粒。取含重组质粒的细菌扩增培养,在37℃及终浓度为1 mmol/LIPTG的条件下诱导4 h,超声碎菌,行SDS-PAGE分析目的蛋白的表达部位及表达水平。、

(5) Western blot 鉴定目的蛋白

(6) Ni²⁺亲和层析柱纯化rh-Anti-BCAR1及rh Anti-BCAR1-PTD:将含重组质粒pET28a- Anti-BCAR1和pET28a-Anti-BCAR1-PTD的表达菌在1 000 ml LB中扩大培养并按上述条件进行IPTG诱导后,离心收集细菌,按1g菌/4ml的比例加入Lysis Buffer(50 mmol/L NaH₂PO₄ 2H₂O, 300 mmol/L NaCl,10 mmol/L咪唑,pH8.0),1 mg/ml加入溶菌酶混匀并置冰上30 min后超声碎菌(碎菌前加入终浓度为0.1 mmol/L的PMSF),离心收集上清。将上清过Ni²⁺-NTA树脂层析柱;用Lysis Buffer及Wash Buffer(50mmol/L NaH₂PO₄ 2H₂O, 300 mmol/L NaCl, 20mmol/L咪唑,pH 8.0)洗柱,直至D(280)<0.01;用Elution Buffer(50 mmol/L NaH₂PO₄ 2H₂O, 300 mmol / L NaCl, 250 mmol/L咪唑,pH 8.0)洗脱目的蛋白。对收集的蛋白行SDS-PAGE分析,并采取PBS进行透析以除去多余盐分,从而得到纯化的重组人rh-Anti-BCAR1及rh Anti-BCAR1-PTD。经SDS-PAGE及灰度扫描分析纯化蛋白纯度。

参考文献

1. Shin MC, Zhang J, Min KA, Lee K, Moon C, et al. (2014) Combination of antibody targeting and PTD-mediated intracellular toxin delivery for colorectal cancer therapy. J Control Release 194: 197-210.

NK 细胞活性检测

采集实验组及对照组清晨外周静脉血 3mL,以肝素钠抗凝的新鲜备用,本实验主要采用链菌素亲生物素-过氧化物酶联法(S-P法),试剂主要由深圳市裕盛嘉实业有限公司提供,具体操作方法按照试剂盒的操作来说明进行。于高倍镜下对经过染色的视野进行观察,计数200个单核细胞,细胞的表面处如果



有红色标记物则属于阳性，计算阳性率。

参考我校发表文献

1. Wang B, Wang Q, Wang Z, Jiang J, Yu SC, et al. (2014) Metastatic consequences of immune escape from NK cell cytotoxicity by human breast cancer stem cells. *Cancer Res* 74: 5746-5757.

细胞 EMT 检测

以 TGF 等细胞因子刺激后，光镜观察细胞形态有无伪足等。WB 检测 E-Cad, N-Cad, Viminten 等表达。Transwell 小室检测细胞侵袭、转移能力。

参考我们已发表文献

1. Deng B, Tan QY, Wang RW, Jiang YG, Zhou JH, et al. (2014) P130cas is required for TGF-beta1-mediated epithelial-mesenchymal transition in lung cancer. *Oncol Lett* 8: 454-460.

细胞失巢凋亡检测

CytoSelect 24-Well Anoikis Assay 细胞失巢凋亡分析试剂盒的原理是将细胞铺在 poly-Hema (一种阴离子聚合物，可以阻止细胞贴壁) 包被的培养板上，通过 MTT 和 Calcein AM 测定细胞的活性。双嵌入剂 EthD 是一种红色荧光染料，只能进入死细胞，结合上 DNA 后荧光强度增加 40 倍，而在进入细胞前几乎没有荧光，因此用于检测发生失巢凋亡的细胞。

CytoSelect 细胞失巢凋亡分析试剂盒内同时提供了 MTT 分光光度计及 Calcein AM/EthD-1 荧光双染法检测细胞失巢凋亡方案，24 孔培养板已预包埋 poly-Hema，该试剂盒足够完成 24 孔板内的 24 次分析。

参考我校发表文献

1. Xiao YC, Yang ZB, Cheng XS, Fang XB, Shen T, et al. (2015) CXCL8, overexpressed in colorectal cancer, enhances the resistance of colorectal cancer cells to anoikis. *Cancer Lett*

细胞侵袭、转移、迁徙检测

(1) 准备细胞：①每组细胞各准备 6cm 皿，汇合度 80%以上，加药组用 20ug/ml MKK3 处理 30min ②收集细胞：8 组细胞消化离心计数后，每组样品准备 1×10^6 cells ③1,200rpm \times 5min 离心后，重悬浮与 1ml 无血清培养基，



加药组用含有 20ug/ml MKK3 的 1ml 无血清培养基重悬 ④湿润小室：将 300u1 预热的无血清培养基加入到小室中，常温放置 1-2h，将 ECM 膜湿润⑤将小室中的培养基去掉 ⑥24 孔板中，没有小室的孔中加入 500u1 含 10%血清的培养基 ⑦用镊子将小室轻轻放入预先加好培养基的孔中，尽量避免产生气泡 ⑧每个样品取 300 μ l，加入到小室中，即 3×10^5 cells 加入到小室里 ⑨37℃，5% CO2 条件下，培养

(2) 48h 后，进行染色：①用棉棒将小室内的细胞和培养基去掉 ②24 孔板中，没有小室的孔中滴入 15 滴染色液（约 500u1）③用镊子将小室轻轻放入预先加好染色液的孔中，尽量避免产生气泡 ④常温放置 20min，进行染色 ⑤用去离子水洗 3-5 次，将背景洗掉 ⑥小室内边缘残留的细胞会影响实验结果，用棉棒擦干 ⑦显微镜拍照后计数

(3) 染色后计数

参考我们已发表文献

1. Deng B, Tan QY, Wang RW, Jiang YG, Zhou JH, et al. (2014) P130cas is required for TGF-beta1-mediated epithelial-mesenchymal transition in lung cancer. *Oncol Lett* 8: 454-460.
2. Huang W, Deng B, Wang RW, Tan QY, He Y, et al. (2012) BCAR1 protein plays important roles in carcinogenesis and predicts poor prognosis in non-small-cell lung cancer. *PLoS One* 7: e36124.

血小板-血浆共孵育

血小板的洗涤：抽取健康志愿者静脉血 20ml，按静脉血与 ACD 抗凝剂（2.5 % 柠檬酸钠，2.0 %葡萄糖，1.5%柠檬酸）以 7: 1 的比例，加入准备好的 50ml 离心管中，颠倒混匀。将 20ml 静脉血平均加入 4 个离心管中，每管 5ml，离心 1300 rpm，13 min，收集上层淡黄色的富含血小板的血浆于一个新的离心管中，再次离心，1600g，离心 2min，弃上清，血小板沉淀用 CGS 缓冲液 5ml 重悬，再次离心，1200g，离心 2 min，弃上清，血小板沉淀用 MTB 缓冲液重悬，最后采用血小板计数器调整血小板悬液的浓度至 3×10^8 个/mL，补充 Ca^{2+} Mg^{2+} 离子浓度至 1 mM，室温静置 60 min，备用，血小板在洗涤过程中应将离心机内的温度调至室温，可以减少血小板在洗涤过程中发生活化。

血小板缺乏血浆的制备：以 3.8%的枸橼酸钠作为抗凝剂，静脉采集肺癌患



者血液标本 3ml, 在室温条件下低速离心机 900rpm 离心 6min, 收集血液上清, 即富含血小板的血浆 (platelet-rich plasma, PRP), 将剩余的 PRP, 去除血小板, 4000rpm, 10min, 吸取上清后再次离心, 4000rpm, 20min, 得到血小板缺乏的血浆 (Platelet-Poor Plasma, PPP), 将 PPP 保存于-80℃冷冻箱内备用。

取肺癌患者血小板缺乏的血浆 (PPP) 和健康志愿者洗涤血小板各 50 μl, 37℃孵育 3h, 进行后续实验。

参考我校发表文献

1. Gong L, Mi HJ, Zhu H, Zhou X, Yang H (2012) P-selectin-mediated platelet activation promotes adhesion of non-small cell lung carcinoma cells on vascular endothelial cells under flow. Mol Med Rep 5: 935-942.

血小板表面 p-Selectin 检测

流式细胞术检测血小板粘附分子 p-Selectin 的表达。收集外周静脉血标本 3ml, 以 3.8%的柠檬酸钠 (1:9) 抗凝, 900rpm 离心 6min 得到富含血小板的血浆 (PRP), 室温下静置 60min, 每 EP 管取 50 μl PRP, 分别加入终浓度为 5 μg/ml 的 SZ-2、SZ-21、SZ-51 或 5 μg/ml 小鼠 IgG (阴性对照) 室温孵育 30 分钟, 每 EP 管加入 MTB 350 μl, 离心 3500rpm, 2min, 弃去上清, 用 100 μl 含 FITC 标记的羊抗小鼠 IgG 二抗的 MTB (1:100 稀释) 重悬血小板, 在避光条件下室温孵育 30 分钟, 每管加 300 μl MTB, 流式检测血小板 P-选择素的表达。

参考我校已发表文献

1. Gong L, Mi HJ, Zhu H, Zhou X, Yang H (2012) P-selectin-mediated platelet activation promotes adhesion of non-small cell lung carcinoma cells on vascular endothelial cells under flow. Mol Med Rep 5: 935-942.

NK 细胞表面血小板检测

(1) 将血小板 (1×10^8 /ml) 与肿瘤细胞 (1×10^5 /ml) 各 20ul 共孵育, 血小板: 肿瘤细胞比例为 1000: 1, 在 37℃, 5%CO₂ 条件下孵育 30 分钟。然后加入 PE 标记血小板 (CD41) 抗体 40ul。在 0℃下避光孵育 30 分钟。利用荧光显微镜照相并观察。利用流式细胞仪检测膜表面黏附血小板的肿瘤细胞百分率。



NOD-SCID 小鼠 CTCs/NK 细胞 动物模型构建

品系: NOD-SCID 小鼠。来源: 由上海斯莱克实验动物责任有限公司提供, 动物合格证号: SCX2007-0005。性别: 雄性。动物饲养环境: 小鼠置于层流架中 SPF 条件下饲养, 所应用的饲料、垫料、笼具及接触的器械等均为高压消毒后使用。试验主要步骤: 取对数生长期的两种细胞, 用生理盐水制备成 $(1-2) \times 10^7$ 细胞/ml 浓度的细胞悬液, 接种于鼠右腋皮下。所应用的饲料、垫料、笼具及接触的器械等均应高压消毒后使用, 鼠置于层流架中饲养。并开始动态观察和测试肿瘤大小及荷瘤鼠体重, 用卡尺测量各鼠肿瘤的短径 (a)、长径 (b), 称量荷瘤鼠体重。按 $(a^2 \times b) / 2$ 公式计算肿瘤体积。

分别将 NOD-SCID 小鼠称重后, 根据体重腹腔注射 10%水合氯醛 (0.3ml/100g 体重), 麻醉后摘除眼球从眶静脉丛取全身血, 分别置于含有 EDTA 抗凝剂的采血管中, 轻微震荡使抗凝剂与血液充分混合, 放置于 4° C 冰箱中, 放置时间不超过 2h。将全血送 CTCs 检测。

NOD-SCID 小鼠/NK 细胞模型建立可通过两方面进行: (1) 由于 NOD/SCID 小鼠具有 NK 细胞功能缺陷, 但是仍能检测出一定量的、残存的 NK 细胞活性。因此我们可采用多聚次黄苷酸-胞苷酸 (polyinosinic-polycytidylic acid, poly I: C) 作为刺激剂, 增强其 NK 细胞活性。从而获得 NOD-SCID 小鼠/NK 细胞模型。

(2) 亦有文献报道, 分离正常人 NK 细胞亚群输入 NOD/SCID 小鼠亦可获得 NOD-SCID 小鼠/NK 细胞模型。

参考文献

1. Shiokawa M, Takahashi T, Murakami A, Kita S, Ito M, et al. (2010) In vivo assay of human NK-dependent ADCC using NOD/SCID/gammac(null) (NOG) mice. *Biochem Biophys Res Commun* 399: 733-737
2. Scatton O, Chiappini F, Riou P, Marconi A, Saffroy R, et al. (2006) Fate and characterization of circulating tumor cells in a NOD/SCID mouse model of human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 25: 4067-4075.
3. Rossi E, Rugge M, Facchinetti A, Pizzi M, Nardo G, et al. (2014) Retaining the long-survive capacity of Circulating Tumor Cells (CTCs) followed by xeno-transplantation: not only from metastatic cancer of the breast but also of prostate cancer patients. *Oncoscience* 1: 49-56.

MHC 表达检测



应用 PCR-SSP 检测人或小鼠 MHC 表达。

提取 DNA 并鉴定。PCR-SSP 法检测 HLA-ABDR 按下列配方配制混合液: 440 μ L PCR cocktail 缓冲液, 7 μ L Tag 酶, 550 μ L 双蒸水, 混匀后取 10 μ L 加入 96 孔 HLA-ABDR 检测板的阴性对照孔 A1 中。然后在混合液中加入 100 mg/1 的 DNA 110 μ L, 以每孔 10 μ L 反应体积将混合液加入 96 孔 HLA-ABDR 检测板的其它 95 孔中。PCR 扩增: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2min, 94 $^{\circ}$ C 10s、65 $^{\circ}$ C 60s 循环 10 次, 94 $^{\circ}$ C 10 s、61 $^{\circ}$ C 50 s、72 $^{\circ}$ C 30 s 循环 20 次。将 PCR 扩增产物加在 2%琼脂糖凝胶中以 90V 电压电泳 15min, 在紫外透射仪下观察并拍照。根据反应格局表(表 1)读出 HLA 结果, 每个 PCR 反应均包括 1069 bp 的内对照条带。

参考我们已发表文献

1. Deng B, Wang RW, Jiang YG, Lin YD, Tan QY, et al. (2008) Human leukocyte antigen-ABDR genes in pulmonary adenocarcinoma cell lines. Chest 134: 890.

统计分析

采用 SPSS18.0 软件对实验数据进行统计分析, 实验数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{X} \pm SD$) 表示, 两组数据采用 t-检验 (t-test), 多组数据采用单因素方差分析 (one-wayANOVA), 进行统计分析, $P < 0.05$ 表示结果有统计学差异。流式结果采用 Win-MDI 2.9 流式分析软件分析。

3.3 关键技术

(1) 细胞内抗体合成

构建一个胞内抗体需考虑到胞内抗体的形式、抗体基因来源、定位序列以及基因转染载体的选择等。目前胞内抗体的形式多是 S c F v 也有 F a b 或多价的 S c F v-F c 片段。抗体基因一般从已有的鼠杂交瘤细胞中克隆, 也可从人或鼠的抗体库中筛选。由于胞内抗体产生和作用的环境和一般抗体差别极大 很多体外功能相当不错的抗体应用成胞内抗体时却效果不佳, 为此涌现出一系列筛选胞内抗体的特殊策略。一种策略是在特异性抗原筛选之前先进行一次“预筛选”即将不稳定的或在类似于胞内还原条件下无法折叠的抗体先除去, 从而提高功能性胞内抗体的筛选机率。与这种策略相反, 有文献报道先用特异性抗原对抗体库进行富集 然后将富集后的所有噬菌体抗体基因直接克隆至真核表



达载体，表达胞内抗体进行筛选。这两种策略都是在普通的抗原筛选基础上再加上一次抗体稳定性筛选。而发现连接有 PTD 蛋白的胞内抗体具有更好的稳定性和溶解性，为胞内抗体的构建提供了一个普适的简单策略。当然，除 PTD 外，运用膜移位序列(membrane-translocating sequence, MTS)亦可能是不错的选择。本项目首先选用 PTD 序列，期望可获得良好的实验效果，若该法不成功，我们亦有备用方案，即可根据文献报道，选用 MTS 进行实验。

(2) NOD-SCID 小鼠 CTCs/NK 细胞 动物模型构建

在本项目中，我们需要建立 NOD-SCID 小鼠肿瘤细胞血行转移模型及 NK 细胞杀伤模型。近来已有文献报道成功构建 NOD-SCID 小鼠 CTCs (Oncoscience 2014,1: 49-56.)及 NK 杀伤模型 (Biochem Biophys Res Commun 2010, 399: 733-737; Oncogene 2006, 25: 4067-4075.)

接种后 1w 左右 NOD-SCID 小鼠颈部皮下即出现肿块，2w 时肿块加速增大，3w 时肿瘤直径就已达到 1.5cm 左右。3w 时取其全身血后进行解剖，肺、脑、肝组织未见肿瘤转移灶，但是通过 ISET 装置检测后证明，CTCs 细胞已经存在于循环系统内，开始发生血行转移，并且在阴性对照组中未发现目标细胞，表明成功构建 CTCs 动物模型，在肿瘤发展的早期即能够捕捉到转移的肿瘤细胞。

1983 年 Bosma 等首先报道，具有重度联合免疫缺陷(severe combined immunodeficiency, SCID)基因同源突变(scid scid)的 C.B-17 小鼠，其 T 和 B 淋巴细胞均发生缺陷。虽然这些小鼠存在细胞和体液免疫功能缺陷，但是仍具有正常的 NK 细胞功能。另一方面，NOD 品系(简称 NOD)小鼠具有 NK 细胞功能缺陷的特征，并且容易发生 T 细胞介导的自身免疫性 I 型糖尿病。Shultz 等通过繁育，使 NOD 遗传背景的小鼠获得 scid 突变，由此建立了 NOD-SCID 小鼠模型。虽然 NOD-SCID 小鼠具有 NK 细胞功能缺陷，但是在这些动物中仍能检测出一定量的、残存的 NK 细胞活性。因此我们根据文献报道，先采用第一种方法构建动物模型：即利用多聚次黄苷酸-胞苷酸(polyinosinic-polycytidylic acid, poly I:C)作为刺激剂，增强其 NK 细胞活性。从而获得 NOD-SCID 小鼠/NK 细胞模型。若该方法不能成功，我们亦有备用方案：可根据文献报道，分离正常人 NK 细胞亚群输入 NOD/SCID 小鼠，同样可获得 NOD-SCID 小鼠/NK 细胞模型。



3.4 可行性分析

理论上可行:

本项目是在前期研究基础上的继续和深入。本人在青年基金资助的基础上,并与美国 Mayo 医学中心、德国 Hannover 医学院开展合作研究。我们根据预实验结果及文献报道提出相应的假设:肺腺癌细胞通过 BCAR1\p38MAPK 信号通路,生成高侵袭性 M-CTCs 逃避失巢凋亡;外周血 BCAR1 进入血小板后激活 p38MAPK 信号通路、活化血小板帮助 M-CTCs 逃避 NK 细胞杀伤。本项目组前期已发表相关 SCI 论文 8 篇,统计源期刊论文 4 篇。我们前期的工作基础为该项目打下了坚实的理论基础。

技术上可行:

邓波副教授曾在欧美接受先进的分子生物学及动物实验培训,为项目的实施打下了扎实的技术基础。本中心有相关杂交瘤抗体工程的经验与基础并发表相关论文[HYBRIDOMA, 2010;29 (5):431-436]。在此基础上我们成功制备高纯度鼠抗人 BCAR1 特异性抗体 (Anti-BCAR1)。为本项目的实施提供了物质基础。

4. 本项目的特色与创新之处;

M-CTCs 的产生及免疫逃避是目前的研究热点。我们发现癌组织 BCAR1 高表达与 M-CTCs 数量增高相关;外周血 BCAR1 高表达与 NK 细胞活性降低相关。我们进一步发现,癌细胞 BCAR1 高表达诱发 EMT,外周血 BCAR1 高表达促进血小板活化。而目前研究证实 EMT 导致 M-CTCs 产生,血小板活化促使 CTCs 免疫逃避。我们发现在肺腺癌及血小板中 BCAR1 可激活 p38MAPK 信号通路,而 p38MAPK 被证实可诱发 EMT 及血小板活化。因此我们推测肺腺癌细胞通过 BCAR1\p38MAPK 信号通路,生成高侵袭性 M-CTCs 逃避失巢凋亡;外周血 BCAR1 进入血小板后激活 p38MAPK 信号通路、活化血小板帮助 M-CTCs 逃避 NK 细胞杀伤。

我们以此为楔入点,原创性地提出“通过 BCAR1 细胞内抗体技术抑制肺腺癌细胞及血小板中 BCAR1\p38MAPK 信号通路,从而预防 M-CTCs 形成及免疫逃避。”的理念。本项目设计了一整套从临床实验到细胞实验再到动物实验的多层次研究方案,运用生物信息学、系统生物学、分子生物学、细胞生物学、实验动物



学等多种技术手段，以探索并阐明我们的假设。本项目将丰富完善肿瘤转移理论，并有望为肺癌靶向抗转移治疗开辟新的路径。

5. 年度研究计划及预期研究结果（包括拟组织的重要学术交流活动、国际合作与交流计划等）。

2016.01---2016.04 查阅文献，订购试剂，设计合成 PCR 引物。

2016.05---2016.06 更新随访病例库及相关载体构建。

2017.7---2018.07 细胞内抗体合成。收集血液样本，组织芯片制作及组织、血液标本检测。血小板孵育、NK 细胞活性等细胞学实验。

2018.08---2019.1 BCAR1 诱导肺腺癌细胞株抵抗失巢凋亡等细胞学实验。

2019.2---2019.4 动物实验预实验确定荷瘤条件等。

2019.5---2019.10 动物实验（细胞生物学及各项指标检测；荷瘤转移及相关指标检测分析）。

2019.11---2019.12 总结实验数据及撰写论文。

本项目组拟邀请美国 Mayo 医学中心 Dr. Yang Ping 等来华就 BCAR1 分子在肺癌研究领域的应用进展做进一步交流。



(二) 研究基础与工作条件

1. 工作基础 (与本项目相关的研究工作积累和已取得的研究工作成绩);

项目主持人邓波, 副教授, 硕士研究生导师。曾在德国汉诺威医学院肿瘤所 Prof.Klein Christoph 实验室学习(肺癌分子生物学研究); 曾在美国梅奥医学中心 Prof.Ping Yang 实验室进行博士后研究工作(肺癌临床流行病学研究)。2008 年-2015 年以第一作者或通讯作者身份在 Chest、Carcinogenesis、Clinical lung cancer 等 SCI 杂志发表论文 20 余篇。作为主持人承担了包括国家自然科学基金、重庆市自然科学基金及第三军医大学创新基金等多个科研项目。

American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine/AJRCCM	
Genetic Contribution to Lung Cancer and Chronic Obstructive Pulmonary Disease	
Journal:	American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine
Manuscript ID:	Blue-201411-2009OC.R1
Manuscript Type:	OC - Original Contribution
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	She, Jun; Mayo Clinic, Department of Health Sciences Research Ding, Bo; Mayo Clinic, Department of Health Sciences Research Lee, Saundarik; Mayo Clinic, Division of Oncology Research de Andrade, Maria; Mayo Clinic, Department of Health Sciences Research Ra, Jie; Mayo Clinic, Department of Health Sciences Research Cunningham, Julie H; Mayo Clinic, Genomics Shared Resource Sun, Zhufu; Mayo Clinic, Department of Health Sciences Research Vamvakos, Jason A; Mayo Clinic, Department of Health Sciences Research Kim, Jungin; Mayo Clinic, Division of Oncology Research Linger, Andrew H; Mayo Clinic, Division of Pulmonary and Critical Care Medicine Wang, Yi; Mayo Clinic, Department of Health Sciences Research Santoni, Paul D; Mayo Clinic, Division of Pulmonary and Critical Care Medicine Bitterman, Peter; University of Minnesota Larsson, Ola; Karolinska Institute Aubry, Marie-Chantal; Mayo Clinic, Division of Anatomic Pathology Hanks, Randolph S; Mayo Clinic, Department of Medical Oncology Allen, Mark S; Mayo Clinic, Division of General Thoracic Surgery Zhang, Shuo; Mayo Clinic, Department of Health Sciences Research Vandit, Christine; University of Minnesota Liu, Zhenkun; Mayo Clinic, Division of Oncology Research Yang, Ping; Mayo Clinic, Health Sciences Research
Subject Category:	9.28 Lung Cancer: Epidemiology < LUNG DISEASES, 9.06 COPD: Epidemiology < LUNG DISEASES, 3.06 Functional Genomics/Proteomics < CELL AND MOLECULAR BIOLOGY
Keywords:	lung cancer, COPD, genetics, Knockout mice, cell-lines

项目主持人长期从事肺癌的基础与临床研究并有系列重要发现。例如, 在梅奥医学中心参与肺癌大型临床流行病学调查, 发现了美国人肺癌发病年轻化、女性化的趋势, 结果发表于 JAMA (IF=30.3, 见研究成果)。发现肺癌与 COPD 的共同发病基因谱 (共同第一作者, AJRCCM, IF=11.986, in revision, 左图)。

项目主持人在国内外最早对 BCAR1/P130cas 在肺腺癌中的生物学行为开展系列深入研究, 并得到国家自然科学基金资助, 以第一或通讯作者发表相关论文 10 余篇 (本项目前期研究结果), 被 Oncogene, AJRCCM 等杂志发表的研究引用, 被欧洲 Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology (<http://atlasgeneticsoncology.org/Genes>) 数据库列为重要研究进展。目前项目组已获得 BCAR1-RNAi 载体及 BCAR1 单克隆抗体, 可阻断 BCAR1 信号通路, 为该项目的实施奠定了物质基础。

本项目相关的前期研究结果如下:



(1) BCAR1 在肺腺癌组织中高表达，在肺腺癌患者血清中丰度高。患者分期越晚，在癌组织及血清中含量越高（图 1-2，表 1）。

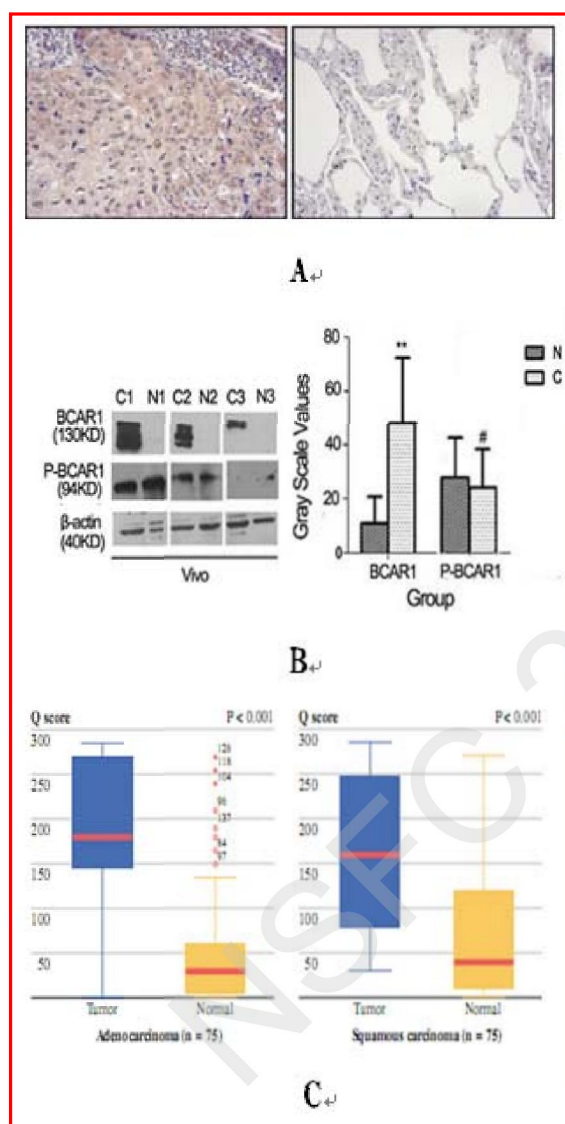


图 1. BCAR1 在肺癌组织中高表达

A: 免疫组化显示 BCAR1 在肺癌组织中高表达（左），癌旁组织低表达（右）。

B Western-Blotting 显示 BCAR1 在肺癌组织中高表达（C1-C3），癌旁组织低表达（N1-N3）。

C: 免疫组化及 Q score 显示 BCAR1 在肺腺癌及鳞癌中高表达。

(A.Deng B#, Huang W#, Tan QY, et al. *Molecular diagnosis & therapy* 2011, 15(1):31-40.

B. Huang W, Deng B*, Wang RW*, et al. *PloS one* 2012, 7(4):e36124.

C. Deng B, Sun Z*, Jason W, et al. *Annals of surgical oncology* 2013, 20 Suppl 3:S701-708.)

图 2: 左: 肺癌 组患者中血浆 BCAR1 蛋白 (ng/L) 显著高于正常对照组。而良性肿瘤组与正常对照相比无显著差异。右: 在肺癌患者中血浆 BCAR1 (ng/L) 随肿瘤分期而逐渐上升。(Deng B#, Huang W#,

Tan QY, et al. *Molecular diagnosis & therapy* 2011, 15(1):31-40.)

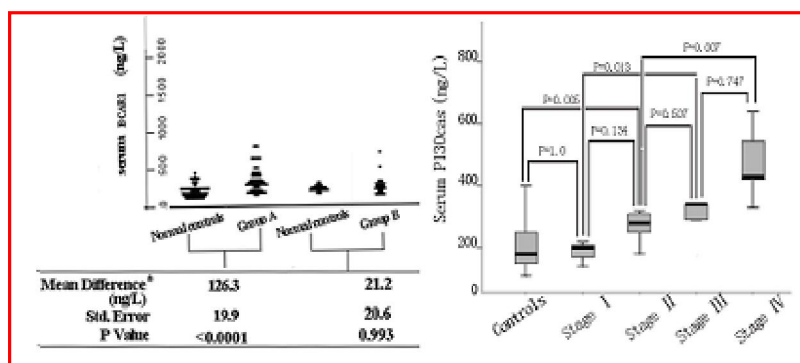




表 1 肺腺癌分期越晚，癌组织 BCAR1 表达越高

Variables	Analysis	Adenocarcinoma-mRNA Mayo Clinic dataset DASL (N = 77)		Adenocarcinoma-mRNA TCGA dataset RNA-seq v2 (N = 288)		Squamous Carcinoma- mRNA TCGA dataset RNA- seq V2 (N = 220)		Adenocarcinoma-protein Daping Hospital IHC (N = 75)		Squamous carcinoma- protein IHC (N = 75)	
		Valid Case (n)	BCAR1	Valid Case (n)	BCAR1	Valid Case (n)	BCAR1	Valid Case (n)	BCAR1 (Q score)	Valid Case (n)	BCAR1 (Q score)
Age	Pearson correlation	77	0.047	268	-0.028	211	0.041	74	0.061	75	0.021
	P value		0.686		0.648		0.551		0.606		0.855
Gender#	Male	14	6.8 ± 0.44	133	10.332 ± 0.803	161	10.434 ± 0.609	41	1.778 ± 0.846	71	1.649 ± 0.866
	Female	63	7.002 ± 0.612	154	10.448 ± 0.717	58	10.282 ± 0.883	34	1.927 ± 0.875	4	1.1 ± 0.702
	P value				0.197		0.151		0.459		0.161
Smoking status	Never-smoker	N.A.		36	10.331 ± 1.054	10	10.54 ± 0.653	N.A.			
	Current or former smoker			239	10.395 ± 0.707	203	10.392 ± 0.694				
	P value				0.989		0.509				
Stage	Spearman's rho	77	0.4**	282	0.13*	216	0.011	75	0.17	75	0.121
	P value		<0.001		0.029		0.877		0.145		0.3
Lymphatic metastasis	No	52	6.825 ± 0.521	171	10.327 ± 0.794	141	10.363 ± 0.713	34	1.603 ± 0.846	44	1.594 ± 0.898
	Yes	25	7.271 ± 0.578	110	10.502 ± 0.694	78	10.449 ± 0.074	40	2.068 ± 0.822	31	1.657 ± 0.824
	P value		0.001**		0.052*		0.755		0.02*		0.761

(Deng B, Sun Z*, Jason W, Yang P. *Annals of surgical oncology* 2013, 20 Suppl 3:S701-708.)

(2) 我们联合美国梅奥医学中心，开展多中心回顾性研究发现 BCAR1 在肺癌中高表达，预后差（表 2, 3）。

表 2 BCAR1 高表达患者预后差（第三军医大学大坪医院数据, n=182）

Variable	Hazard ratio	95% Confidence interval	P-value
BCAR1 expressed levels	1.777	1.064-2.968	0.028
Phospho-BCAR1 levels	1.001	0.413-2.423	0.999
Age	0.960	0.643-1.433	0.843
Gender	0.778	0.493-1.225	0.278
Nodal status	1.277	1.018-1.668	0.040
Tumor size	1.113	0.748-1.655	0.597
Differentiation	1.449	0.753-2.794	0.267
TNM stage	1.298	1.068-1.588	0.007
Histology	1.103	0.689-1.543	0.882

(Huang W, Deng B*, Wang RW*, et al. *PloS one* 2012, 7(4):e36124.)

表 3 BCAR1 高表达患者预后差（梅奥医学中心，n=77；TCGA 数据, n=357）

TABLE 3 HR analysis of BCAR1-mRNA in NSCLC by using COX model						
Dataset (histology)	Cases (N)	COX model analysis of OS and BCAR1-mRNA				
		Variables	P value	HR	95 % CI for HR	
					Lower	Upper
Mayo Clinic (adenocarcinoma)	77	BCAR1	0.325	1.439	0.697	2.968
TCGA (adenocarcinoma)	188	BCAR1	0.008	1.776	1.159	2.722
		Stage #	0.001	2.545	1.504	4.308
TCGA (squamous carcinoma)	169	BCAR1	0.017	1.566	1.082	2.266

(Deng B, Sun Z*, Jason W, Yang P. *Annals of surgical oncology* 2013, 20 Suppl 3:S701-708.)



(3) A549 细胞系中 BCAR1 高表达与细胞克隆形成, 迁徙、侵袭密切相关(图 3)。

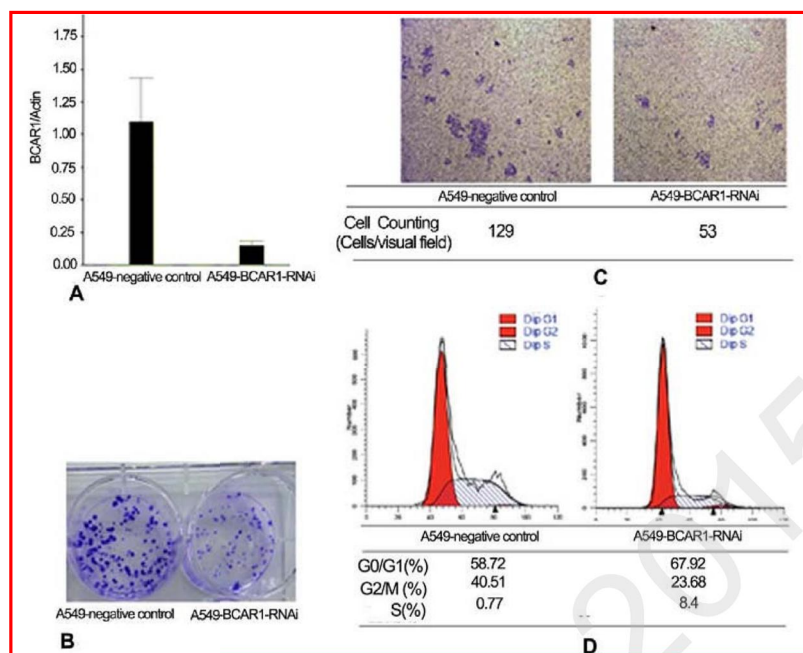


图 3 在 A549 细胞中, BCAR1 高表达 (A)。RNAi 可使 A549 细胞中 BCAR1 表达降低 80% 以上 (A)。将 A549 细胞的 BCAR1-RNAi 后, A549 克隆形成的能力显著降低 (B); 细胞侵袭、迁移的能力显著降低 (C); 细胞周期发生阻滞 (D)。

(Huang W, Deng B*, Wang RW*, et al. *PloS one* 2012, 7(4):e36124.)

(4) A549 细胞系中 BCAR1 高表达诱导细胞发生 EMT (图 4)。

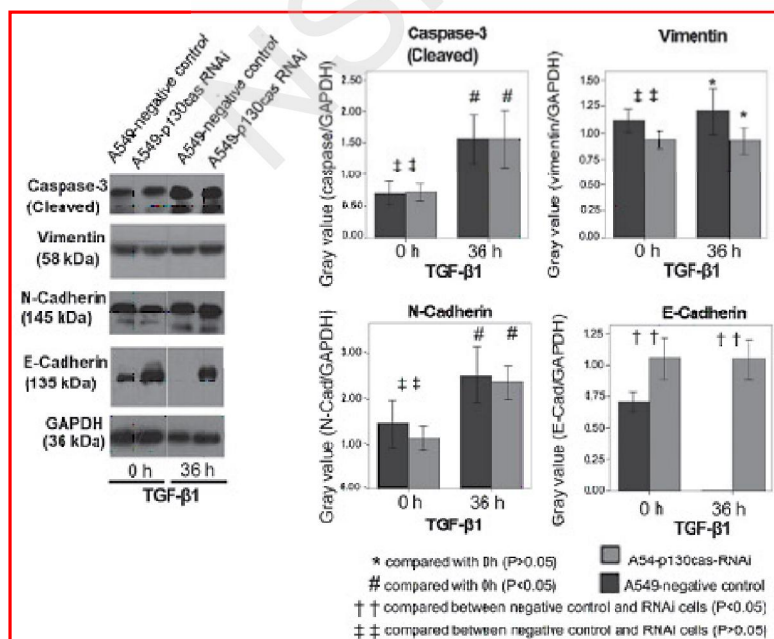


图 4 RNAi 可使 A549 细胞发生上皮间质转化能力显著降低, 并可抑制 TGF 诱导细胞发生上皮间质转化。

(Deng B*, Tan QY, Wang RW, et al. *Oncology letters* 2014, 8(1):454-460.)

(5) 肺癌细胞中 BCAR1 高表达激活 p38MAPK 信号通路 (图 5)。

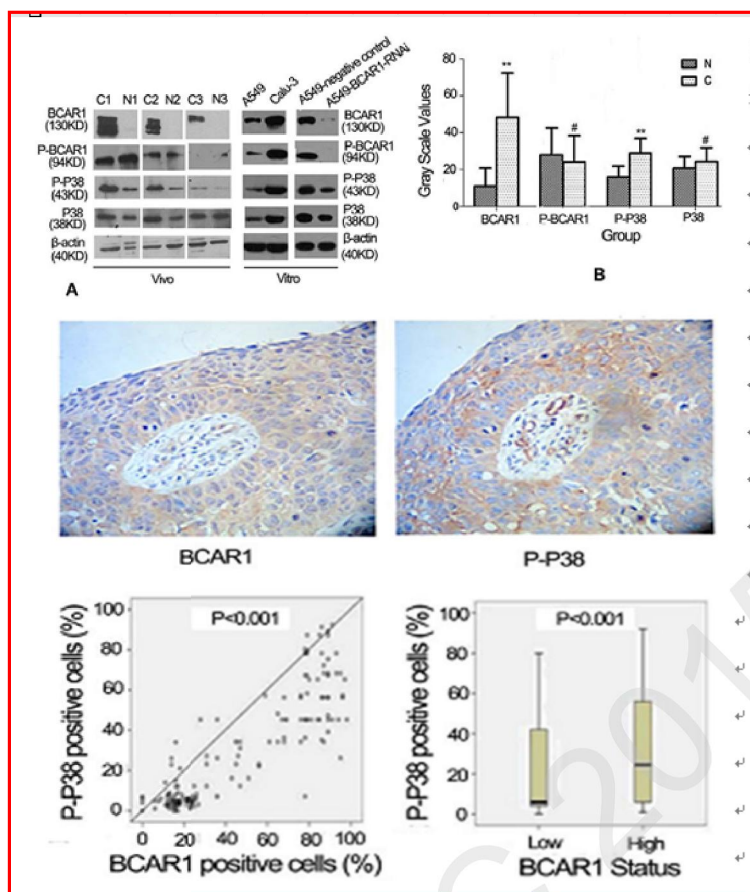


图 5 A、B: 肺癌组织及肺腺癌细胞株中 BCAR1 表达与 p-p38MAPK 表达成正比。将 A549 细胞 BCAR1-RNAi 后，p-p38MAPK 表达显著降低。C: 组织微阵列提示 BCAR1 表达与 p-p38MAPK 表达成正比

(Huang W, Deng B*, Wang RW*, et al. *PloS one* 2012, 7(4):e36124.)

(6) M-CTCs 与肿瘤分期密切相关：分期越晚，M-CTCs 数量越多（图 6）；M-CTCs 数量及比例与肿瘤进展密切相关（图 7）；M-CTCs 数量与癌组织 BCAR1 表达显著相关（图 8）

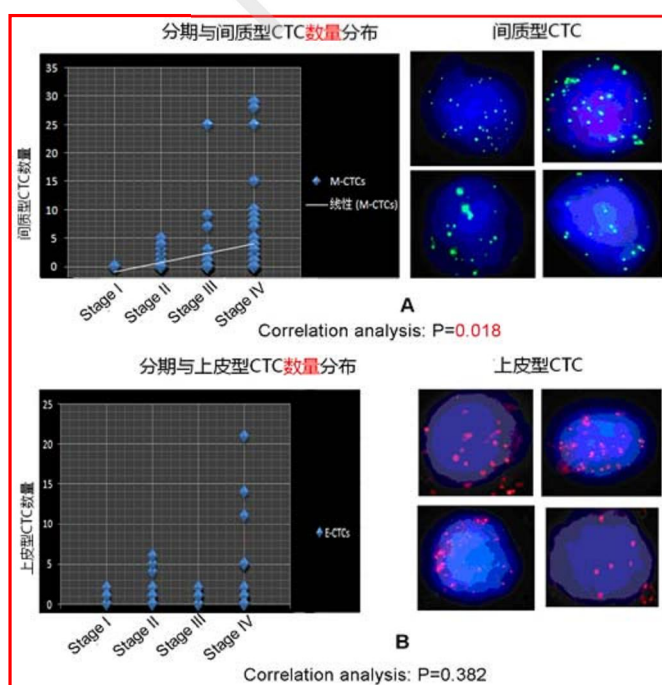


图 6 检测 111 例肺腺癌患者 2ml 外周血中 M-CTCs, E-CTCs 并与肿瘤分期行相关分析。A: 外周血中 M-CTCs 数量与分期显著相关，肿瘤分期越晚，M-CTCs 数量越多；B: E-CTCs 与分期无相关性。(Cancer research, in revision)

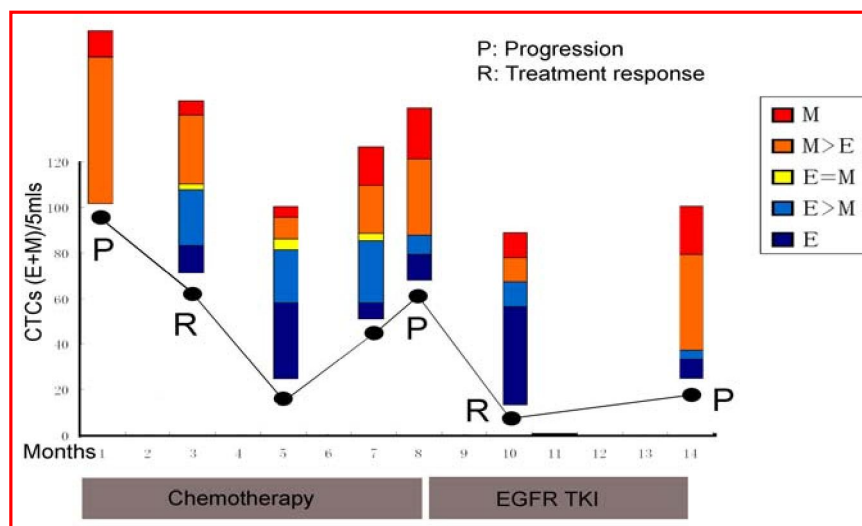


图 7 M-CTCs 数量及比例与肿瘤进展密切相关：患者，女性，52 岁，侵袭性腺癌 IV 期。在化疗前外周血 CTCs 以 M-CTCs 为主，化疗后 3-4 月，M-CTCs 数量及比例

逐渐降低，肿瘤逐渐缩小。但从第 6 个月开始肿瘤逐渐增大，出现骨转移；M-CTCs 数量及比例亦逐渐增多。第 8 个月开始服易瑞沙后，肿瘤逐渐缩小再次临床缓解；M-CTCs 数量及比例逐渐降低。第 14 个月开始出现易瑞沙耐药，肿瘤增大；M-CTCs 数量及比例亦逐渐增多(Cancer research, in revision)。

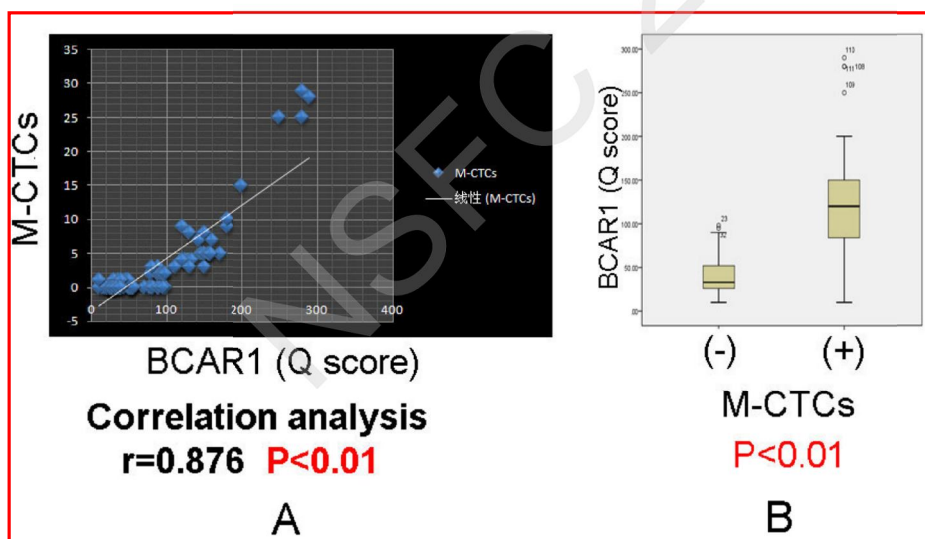


图 8 分析 106 例肺腺癌患者中 2ml 外周血中 M-CTCs 与癌组织中 BCAR1 表达的关系 A: M-CTCs 数量与癌组织中 BCAR1 表达显

著正相关；B: 在 M-CTCs 阴性患者癌组织 BCAR1 表达显著低于 M-CTCs 阳性患者 (Cancer research, in revision)。

(7) 外周血 BCAR1 孵育后 BCAR1 进入血小板 (图 9、10)，导致 p-P38 高表达 (图 10A)，血小板表面 P-selectin 表达显著增高 (图 10B)，血小板活化 (图 10C)。

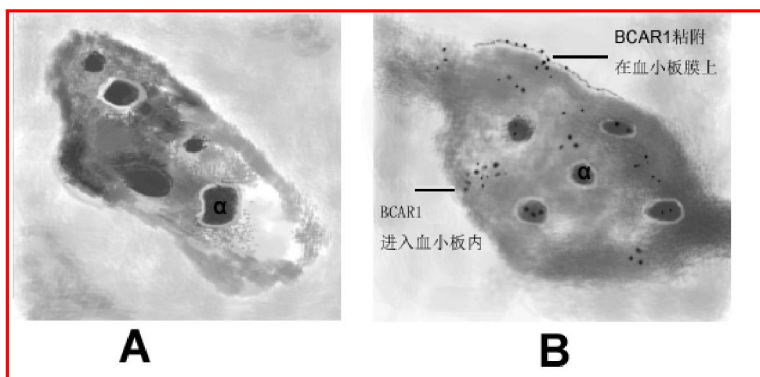


图 9 肺腺癌患者富含 BACR1 血浆+健康人洗涤血小板孵育 3 小时，透射电子显微镜显示血小板中 BCAR1（以抗生物素抗体和免疫金标记）可通过内吞作用进入血

小板中：A：孵育前血小板；B：孵育后 BCAR1 进入血小板内。 α ：血小板内 α 颗粒。

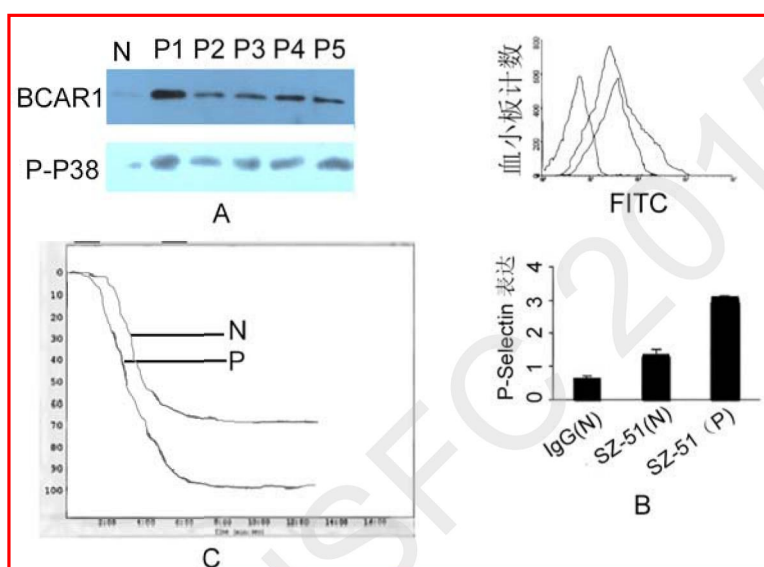


图 10 肺腺癌患者富含 BACR1 血浆+健康人洗涤血小板孵育 3 小时。A：WB 提示血小板中 BCAR1 及 P-P38 增高；B：流式细胞术显示血小板表面 P-Selectin 表达明显增高；C：血小板聚集仪提示血小板凝集功能增强。(N：健康人血小板；

P：肺腺癌患者富含 BACR1 血浆孵育 3 小时) (Clinical cancer research, under review)

(8) 外周血 BCAR1 越高，TGF- β 1 表达越高，NK 细胞活性越低（图 11）

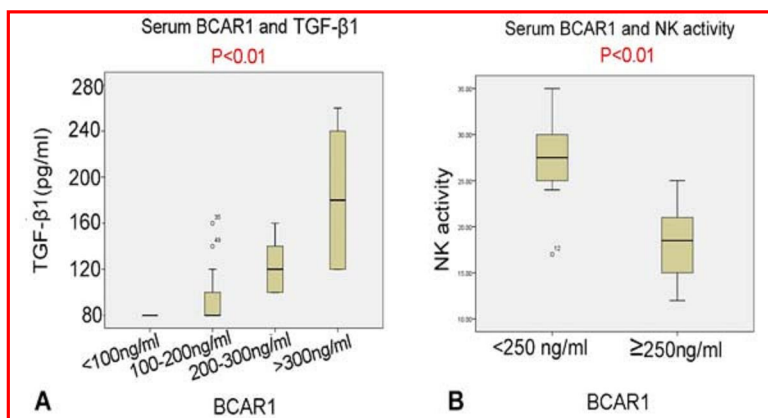


图 11 A：86 例肺腺癌患者外周血行 ELISA 检测示 BCAR1 越高，TGF- β 1 表达越高；B：21 例肺腺癌外周血行 MTT 检测 NK 细胞活性及 ELISA 检测 BCAR1 丰度，示 BCAR1 高丰度组 NK 细胞活性

显著低于 BCAR1 低组。



(9) 通过杂交瘤抗体工程获得 Anti-BCAR1 (图 12), 通过 GST pull-down 验证可有效阻止 A549 细胞中 BCAR1/crk 复合体的形成 (图 13)

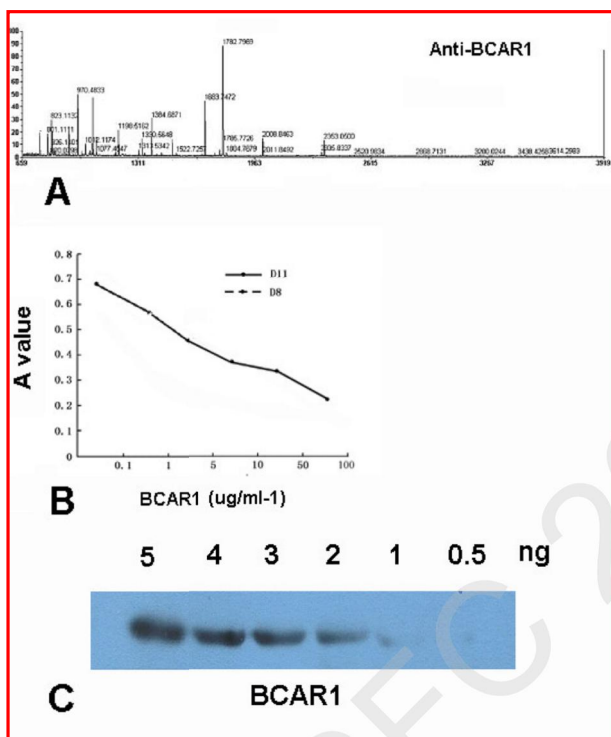


图 12 A: 我们以 p130cas 蛋白为抗原免疫 BALB/c 小鼠, 建立杂交瘤细胞系, 成功纯化鼠抗人 BCAR1 特异性单克隆抗体 (Anti-BCAR1)。B: 以 BCAR1\p130cas 与 BSA 的偶联物为包被抗原, 将杂交瘤细胞培养上清液分别与不同浓度的相应抗原混合进行竞争 ELISA。随着多肽浓度的增加, A 值逐渐减小, 说明 Anti-BCAR1 与 BCAR1 能特异性结合, 进一步证实了其特异性。C: 进一步检测 Anti-BCAR1 对 BCAR1 抗原的敏感性。由图可见,

BCAR1\p130cas 上样量为 1ng 时, 条带减弱勉强可辨。上述结果说明, Anti-BCAR1 有 BCAR1 特异性, 且抗体纯化后将具有极高的抗原识别敏感性。

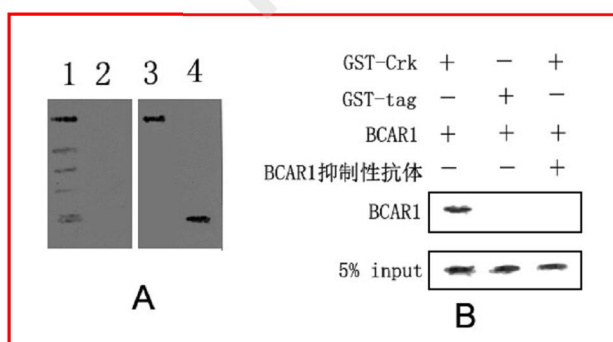


图 13 A: WB 分析表达纯化后的 GST-tag, GST-Crk 蛋白。

1, (anti-Crk)+(GST-Crk) 2, (anti-Crk)+(GST-tag)

3, (anti-GST)+(GST-Crk)

4, (anti-GST)+(GST-tag)。B: GST

pull-down 将 GST-Crk 蛋白亲和固化在谷胱甘肽亲和树脂上, 作为与目的蛋白亲和的支撑物, 充当“诱饵蛋白”。裂解 A549 细胞, 将细胞裂解液过柱, 从中捕获与之相互作用的“捕获蛋白”, 洗脱结合物后通过 SDS-PAGE 电泳分析。结果显示 Anti-BCAR1 可有效阻止 A549 细胞中 BCAR1/crk 复合体的形成。



2. 工作条件（包括已具备的实验条件，尚缺少的实验条件和拟解决的途径，包括利用国家实验室、国家重点实验室和部门重点实验室等研究基地的计划与落实情况）；

申请者所在单位为第三军医大学大坪医院野战外科研究所是集临床、科研、教学为一体的现代化大型医疗机构，其中野战外科研究所包括了国家及全军重点实验室并正在承担“973”、“863”、国家自然科学基金重点项目等多项科研课题，可为本项目提供有力的技术支持。申请者所在的胸心外科系全军唯一的胸外科研究所，国家重点学科，拥有一支学术思想活跃的科研队伍。近年来获得包括军队医疗进步一等奖、省部级科技进步一等奖等多项研究成果。本中心长期进行肺癌的分子生物学、细胞生物学、基因组学等相关研究，获得国家自然基金资助10余项，已在 Chest, J Cardiovasc Surg, Ann thoracic Surg, Lung Cancer 等 SCI 杂志上发表论文 40 余篇，这为本项目的开展创造了有利条件。胸心外科中心实验室设备齐全，平时担负全院临床免疫检测诊断以及研究生培养工作。在这里可开展本研究的常规实验工作。另外，项目组已制备高纯度、高效价、高亲和力BCAR1单克隆抗体，可有效阻断BCAR1/Src复合物形成。因此，本项目组已具备开展该项目的成熟的工作条件。

3. 承担科研项目情况（申请人和项目组主要参与者正在承担的科研项目情况，包括国家自然科学基金的项目，要注明项目的名称和编号、经费来源、起止年月、与本项目的关系及负责的内容等）；

4. 完成国家自然科学基金项目情况（对申请人负责的前一个已结题科学基金项目（项目名称及批准号）完成情况、后续研究进展及与本申请项目的关系加以详细说明。另附该已结题项目研究工作总结摘要（限 500 字）和相关成果的详细目录）。

青年科学基金项目，编号：81101782，名称：BCAR1 在非小细胞肺癌中作为肿瘤血管生成“失稳分子”的相关研究，执行年限：2012.01-2014.12。目前顺利结题。已发表系列重要文章，其中 SCI 论文 4 篇，国内统计源论文 2 篇；培养



博士后 1 名，博士研究生 1 名，硕士研究生 1 名。

在该项目的资助下，我们发现了促瘤因子 BCAR1 高表达提示肺癌患者预后差。我们通过细胞及动物实验发现 BCAR1 在胸部肿瘤的侵袭、转移、血管生成中发挥关键的生物学作用。我们进一步发现 BCAR1 在肺腺癌细胞中高表达导致上皮间质转化；外周血 BCAR1 可进入并活化血小板。上皮间质转化是间质型循环肿瘤细胞形成的重要原因；血小板活化导致循环肿瘤细胞聚集成微栓子。根据预实验结果及文献报道，我们提出了相关假说及设计了本项目。因此，本次申请项目是在原项目基础上的进一步深入和延续。

附：NSFC 81101782 研究工作总结摘要

细胞外基质与胞内信号传导之间存在一个重要的桥梁分子，即 Breast cancer antiestrogen resistance-1, BCAR1。在国家自然科学基金青年项目资助下(81101782)，我们在非小细胞肺癌中开展了 BCAR1 相关生物学功能的系列研究。按照计划，我们完成了如下研究要点：

- 1、联合美国梅奥医学中心，开展了国际多中心回顾性研究，证实 BCAR1 在肺癌中高表达，预后差。
- 2、成功诱导培养肿瘤源性血管内皮细胞；发现肿瘤 BCAR1 促进血管内皮细胞迁徙、增殖；将 A549-BCAR1-RNAi 及 A549-阴性对照细胞与血管内皮细胞共培养后，划痕实验证实 A549-BCAR1-RNAi 组的血管内皮细胞迁移能力较 A549-阴性对照组明显降低。MTT 实验提示 A549-BCAR1-RNAi 组的血管内皮细胞增殖能力较 A549-阴性对照组明显降低。
- 3、细胞实验证实肺癌细胞中 BCAR1 高表达与肿瘤细胞迁徙、侵袭、肿瘤上皮间质转化、肿瘤血管生成密切相关；将 BCAR1 RNAi 后，细胞侵袭能力显著降低；BCAR1 RNAi 细胞克隆形成的能力显著降低；BCAR1 RNAi 细胞周期发生阻滞；BCAR1 RNAi 肿瘤上皮间质转化能力显著降低，并可抑制 TGF 诱导细胞发生上皮间质转化。
- 4、BCAR1 高表达可上调 Angiopoietin-2 及 VEGF 表达。在 A549 细胞中，将 BCAR1-RNAi 后，免疫印迹试验显示 Angiopoietin-2/VEGF 表达显著降低，而 Angiopoietin-1 表达无显著降低。
- 5、在荷瘤裸鼠中给予血管生成抑制剂 Avastin 后，A549-BCAR1-RNAi 组肺结节数量明显少于 A549-阴性对照组结节数量。



相关成果

Huang W,*Deng b,*Wang W	BCAR1 Protein Plays Important Roles in Carcinogenesis and Predicts Poor Prognosis in Non-Small-Cell Lung Cancer	PLoS One. 2012;7(4):e36124.
Deng B, Sun Z, Jason W, et al.	Increased BCAR1 Predicts Poor Outcomes of Non-small Cell Lung Cancer in Multiple-Center Patients	Ann Surg Oncol (2013) 20:S701–S708
Deng B, Tan QY, Wang RW, et al.	P130cas is required for TGF- β 1-mediated epithelial-mesenchymal transition in lung cancer	ONCOLOGY LETTERS 8: 454-460, 2014
Deng B, Molina J, Aubry MC, et al.	Clinical biomarkers of pulmonary carcinoid tumors in never smokers via profiling miRNA and target mRNA	Cell & Bioscience 2014, 4:35
黄伟, 邓波, 王如文等	乳腺癌抗雌激素药物耐药蛋白1在食管鳞癌血清和组织中的表达及临床意义	中华实验外科 2012; 29(8): 1506-1508
黄伟, 邓波, 王如文等	人乳腺癌抗雌激素药物耐药蛋白1基因 siRNA 慢病毒载体的构建与鉴定	中国生物制品学杂志 2013; 26(1): 17-21

(三) 资金预算说明

购置单项经费5万元以上固定资产及设备,须逐项说明与项目研究的直接相关性及其必要性。

本项目经费合计90万元,其中直接费用:75万元,间接费用15万元。具体预算说明如下:

直接费用

1. 设备费

无

2. 材料费:37.5万元。

(1) 抗体:5万元。

利用IHC及WB检测组织中蛋白表达,利用WB检测血小板中蛋白表达,购买检测抗体。

序号	货品名称	单价/万元	数量/年	年数	小计/万元
1	BCAR1 一抗	0.15	2	3	0.9
2	p-BCAR1 抗体	0.15	2	3	0.9
3	p-P38、P-Selectin 抗体	0.15	2	3	0.9



4	P38 抗体	0.15	2	3	0.9
5	E-Cad、N-Cad、Snail 等抗体	0.2	7	1	1.4
	合计				5

(2) 内切酶和连接酶： 1 万元。

分子克隆常用内切酶、连接酶等，用于构建重组表达质粒进行双酶切，Cell signal 公司产品，500U/支，约需 6000U。

(3) 检测试剂盒： 5 万元。

进行检测 WB、IHC、ELISA、失巢凋亡检测等

序号	货品名称	单价/万元	数量/年	年数	小计/万元
1	WB 检测试剂盒	0.5	1	2	1
2	IHC 检测试剂盒	0.3	2	2	1.2
3	失巢凋亡检测试剂盒	0.5	1	2	1
4	BCAR1-ELISA 检测试剂盒	0.3	2	3	1.8
	合计				5

(4) 实验动物费：合计 3.5 万元

清洁级 NOD-SCID 小鼠：共 3.5 万元。

清洁级 NOD-SCID 小鼠 600 只(20 大组，每组 10 只，重复 3 次)，用于构建荷瘤模型实验，观察 BCAR1 抗体及 BCAR1-RNAi 慢病毒载体对 M-CTCs 及 CTM 的影响，小鼠单价 25 元/只，饲养费 1.2 元/天，需要饲养 30 天，共 25 元/只×600 只+1.2 元/天×30 天×600 只~35000。

(5) 细胞实验相关费用：合计 11 万元。

用于肺腺癌细胞功能研究及血小板功能研究，观察 BCAR1 抗体及 BCAR1-RNAi 慢病毒载体对 M-CTCs 及 CTM 的影响

序号	货品名称	单价/元	数量	小计/万元
1	洗涤血小板购买及制备	3500	10	3.5
2	肺癌患者外周血去除血小板	500	40	2
3	肺腺癌细胞培养相关费用	0.05	10	0.5



4	血小板培养细胞因子	0.01	100	1
5	慢病毒转染试剂盒	1	2	2
6	PCR-引物合成	0.1	20	2
	合计			11

(6) 常用生化试剂：合计 6 万元.

主要用于配置培养基、琼脂糖凝胶电泳缓冲液、SDS-PAGE 蛋白电泳液以及其他常规生化试剂等。

序号	货品名称	单价/元	数量/年	年数	小计/元
1	胰蛋白胨	350	10	3	10500
2	酵母提取物	150	10	3	4500
3	蛋白Marker	300	10	3	9000
4	琼脂糖	350	10	3	10500
5	Tris	150	10	3	4500
6	无水乙醇	15	50	3	2250
7	PBS	100	10	3	3000
8	工业酒精	6	50	3	900
9	DNA marker	250	10	3	7500
10	蛋白marker	400	10	3	12000
	合计				60000

(7) 常规耗材：合计 6 万元.

主要用于常规分子克隆、表达纯化以及动物实验中使用的耗材。

序号	货品名称	单价/元	数量/年	年数	小计/元
1	0.2ml进口PCR反应管/箱	2600	1	3	3900
2	国产吸头10ul/箱	3000	1	3	9000
3	国产吸头200ul/箱	4000	1	3	12000
4	国产吸头1000ul/箱	3000	1	3	9000
5	国产50ml/15ml/10ml/1.5ml/1ml离心	1200	1*5	1.5	9000



	管/箱				
6	一次性 PE 手套/箱	600	1	3	1800
7	乳胶手套/箱	800	1	3	2400
8	口罩/箱	600	1	3	1800
9	帽子/箱	600	1	3	1800
10	75cm 细胞培养瓶/箱	800	1	3	2400
11	25cm 细胞培养瓶/箱	400	1	3	1200
12	10ml 移液管/箱	100	1	3	300
13	巴氏吸管/箱	400	1	3	1200
14	酶标板	450	1	3	1350
14	其它	2000	1	3	6000
	合计				60000

3、测试化验加工费：22 万元

(1) CanPatroltm 检测费用：20 万元

用于 M-CTCs 及 CTM 检测，1000 元/例，大约 200 例，合计 20 万元。

(2) 免疫病理切片及 TMA 制作：1.0 万元。

主要用于观察并测定 BCAR1 在肺癌组织中的表达丰度。拟制作 10 张组织芯片，每张 1000 元。

(3) 电镜超微结构处理和观察费：0.8 万元

此部分内容计划计划观察 10 例样本。计算依据为：超薄切片¥80/例，染色¥30/例，电镜观察¥350/小时，每例样本设计观察 2 小时，350 元/小时×2 小时+30 元/例+80 元/例=810 元/例，10 例样本共计 0.8 万元。执行部门为第三军医大学电镜室。

(4) 实验相关其他测试费用：0.2 万元。主要用于与课题相关的紫外可见分光光度计检测，基因测序，ELISA 检测，蛋白纯度检测等，在第三军医大学大坪医院野战外科研究所公共实验平台完成。

4. 燃料动力费：无



5. 差旅费：合计 1 万元

项目组成员 2 人参加 2017 年 CSCO 会议交通差旅费（来回机票 $1600 \times 2 = 3200$ 元），食宿费用（ $300/\text{天} \times 3 \times 2 = 1800$ 元）等，合计 5000 元。在会议上争取以壁报形式报告实验进展。

项目组成员 2 人参加 2018 年 CSCO 会议交通差旅费（来回机票 $1600 \times 2 = 3200$ 元），食宿费用（ $300/\text{天} \times 3 \times 2 = 1800$ 元）等，合计 5000 元。在会议上争取以壁报形式报告实验进展。

6. 会议费：1.0 万元。

本项目进行期间，用于承办项目成果专家指导会议和项目成果鉴定会，包括会议场地费、会务费，资料费等。

- 1) 项目成果鉴定会会议场地，资料费：用于本项目完成前对本项目中 BCAR1 抗体作为生物制品进行申报的专家指导会议和最后项目成果鉴定会。共举行 1 次，会期 2 天，每次预计参加人员 10 名（包括项目组成员 5 人，学生 3 人，以及 2 名专家）。会议室租用费用：7000 元/天，会议资料费 3000 元/次， 合计 1 万元。

承办会议时布置会场费用等。

7. 国际合作与交流费：2.0 万元。

用于在项目研究开发过程中，项目组研究人员前往美国 Mayo 医学中心 Dr.Yang Ping 实验室交流（机票住宿等，拟派 2 人，费用包括飞机票、签证费、住宿费和注册费等。

费用包括：[机票食宿（8000 元）+签证保险费（2000 元）] $\times 2$ 人=2.0 万元。

8. 出版/文献/信息传播/知识产权事务费 3.5 万元

用于 SCI 论文发表，书籍购买、文献检索、资料费，新药申请、专利申请与维持费以及知识产权顾问费等。

- (1) 学术论文发表费用：合计 2.6 万元。

国际期刊平均 5000 元/篇，四年共计 4 篇，计 2 万元；国内期刊平均 2000 元/篇，三年共计 3 篇，计 0.6 万元。

- (2) 论文、文献印刷费、上网费、文献资料费：合计 0.9 万元。

① 文献、资料印刷费：文献打印、印刷 $0.2 \text{ 万元} \times 3 \text{ 年} = 0.6 \text{ 万元}$ 。

② 上网费：2 台 $\times 50 \text{ 元/月/台} \times 12 \text{ 月/年} \times 3 \text{ 年} = 0.3 \text{ 万元}$ 。

**9. 劳务费：合计 8 万元**

没有工资性收入的在校研究生、博士后和临时聘用人员的劳务费用。

序号	研究生名字	单月 劳务费 (元)	月数	合计	在本课题中承担的 工作任务
1	于杰	850	48	4	临床标本检测
2	曾小飞	850	48	4	分子克隆相关实验
合 计				8	

间接经费：15 万元

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，主要包括依托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。

绩效：3.0 万元

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。

（四）其他需要说明的问题

无



邓波 简历

中国人民解放军第三军医大学，第三附属医院（所）胸外科，副教授，副主任医师，硕士研究生导师，留美博士后。

教育经历（按时间倒排序）：

2003/9 - 2006/7，第三军医大学，外科学(胸外科)，博士，导师：王如文

2001/9 - 2003/7，第三军医大学，外科学(胸外科)，硕士，导师：王如文

1996/9 - 2001/7，第三军医大学，临床医学，学士

工作经历（科研与学术工作经历，按时间倒序排序）：

2011/7 - 至今，中国人民解放军第三军医大学，第三附属医院（所）胸外科，副教授

2012/7-2014/1，梅奥医学中心（Mayo Clinic, Rochester, U.S.A）Postdoctoral research fellow, 导师：Professor. Ping Yang

2009/3-2010/3，汉诺威医学院（Hannover Medical School, Hannover, Germany）Visiting Scientist, 导师：Professor. Christoph Klein

2006/7 - 2011/6，中国人民解放军第三军医大学，第三附属医院（所）胸外科，讲师

2001/7 - 2006/6，中国人民解放军第三军医大学，第三附属医院（所）胸外科，助教

曾使用证件信息（限3个）

军人证件，后文字第1991154

主持或参加科研项目及人才计划项目情况（按时间倒序排序）：

- 1、国家自然科学基金青年项目，81101782、BCAR1在非小细胞肺癌中作为肿瘤血管生成"失稳分子"的相关研究、2012/01-2014/12、22万元、已结题、主持。
- 2、重庆市自然科学基金，CSTC2011BB5020、P130Cas作为肺癌发生发展过程中TGF- β 1信号通路开关分子的研究、2011/06-2014/06、5万元、已结题、主持。



钱凯简历(参加者)

中国人民解放军第三军医大学，第三附属医院（所）胸外科，主治医师

教育经历（从大学本科开始，按时间倒排序）：

2008/09-2011/06，昆明医学院，临床医学院，硕士研究生 导师 蒋立虹

2003/09-2008/06，泸州医学院，临床医学，本科

工作经历（科研与学术工作经历，按时间倒排序）：

2014/07-至今，中国人民解放军第三军医大学，第三附属医院（所），胸外科，
主治医师

2011/07-2014/07，中国人民解放军第三军医大学，第三附属医院（所），住院医
师

曾使用证件信息（限 3 个）

主持或参加科研项目及人才计划项目情况（按时间倒排序）：



冯涌耕简历(参加者)

中国人民解放军第三军医大学, 第三附属医院(所), 助教

教育经历(从大学本科开始, 按时间倒排序):

2010/9 – 2013/7, 大连医科大学, 外科学(胸外科), 硕士, 导师: 顾春东

2005/9 – 2010/7, 泸州医学院, 临床医学, 学士

工作经历(科研与学术工作经历, 按时间倒排序):

2013/8 – 至今, 中国人民解放军第三军医大学, 第三附属医院(所), 助教

曾使用证件信息(限3个)

主持或参加科研项目及人才计划项目情况(按时间倒排序):

NSFC 2015



王颖建简历(参加者)

中国人民解放军第三军医大学，第三附属医院（所）胸外科，助教

教育经历（从大学本科开始，按时间倒排序）：

2008/9 – 2011/7，重庆医科大学，外科学（普通外科学），硕士，导师：厉红元

2003/9 – 2008/7，重庆医科大学，临床医学，学士

工作经历（科研与学术工作经历，按时间倒排序）：

2012/7 – 至今，中国人民解放军第三军医大学，第三附属医院（所）胸外科，助教

2010/7-2012/5 美国路易斯安那州立大学 医学中心 Research fellow，导师：

Professor Benjamin Lee

曾使用证件信息（限 3 个）

主持或参加科研项目及人才计划项目情况（按时间倒排序）：



范小青简历(参加者)

中国人民解放军第三军医大学，第三附属医院（所）胸外科，技术员。

教育经历（从大学本科开始，按时间倒排序）：

2004/9 – 2007/7，中国北方理工学院药学专业，大专。

1995/9 – 1998/7，重庆医药高等专科学校，医学检验，检验士。

工作经历（科研与学术工作经历，按时间倒排序）：

2000/2 – 至今，中国人民解放军第三军医大学，第三附属医院（所），技术员。

1998/08–1999/12，重庆医科大学儿童医院检验科，技术员。

曾使用证件信息（限3个）

主持或参加科研项目及人才计划项目情况（按时间倒排序）：

- 1、国家自然科学基金青年项目，81101782、BCAR1在非小细胞肺癌中作为肿瘤血管生成"失稳分子"的相关研究、2012/01–2014/12、22万元、已结题、参与。



张景阁简历(参加者)

中国人民解放军第三军医大学，第三附属医院（所）胸外科，实验员。

教育经历（从大学本科开始，按时间倒排序）：

2008/09 – 2011/07，西北大学，生命科学学院，生物化学与分子生物学专业，
硕士研究生，导师：崔亚丽。

2004/09 – 2008/07，西北大学，生命科学学院，生命科学与技术专业，本科学
士学位。

工作经历（科研与学术工作经历，按时间倒排序）：

2014/05-至今，中国人民解放军第三军医大学，第三附属医院（所）胸外科，实
验员。

2013/08-2014/04，重庆威力保生物技术有限公司，质检部，技术员。

2013/03-2013/07，第四军医大学，DNA 分型中心，技术员。

2011/04-2012/10，西安金磁纳米生物技术有限公司，研发部，项目负责人。

曾使用证件信息（限 3 个）

主持或参加科研项目及人才计划项目情况（按时间倒排序）：



近5年（2010年1月1日以后）代表性研究成果列表

- 1、 Deng B^(#)^(*), Tan QunYou, Wang RuWen, Jiang YaoGuang, Zhou JingHai, Huang Wei, P130cas is required for TGF β mediated epithelialmesenchymal transition in lung cancer, *Oncol Lett*, 2014, 8 (1) : 454-460。SCI 期刊论文
- 2、 Deng Bo^(#), Molina Julian, Aubry C.Marie, Sun Zhifu, Wang Liang, Eckloff W.Bruce, Vasmatazis George, You Ming, Wieben D. Eric, Jen Jin, Wigle A. Dennis, Yang Ping^(*), Clinical biomarkers of pulmonary carcinoid tumors in never smokers via profiling miRNA and target mRNA, *Cell Biosci*, 2014, 4 (1) : 35-50。SCI 期刊论文
- 3、 Deng Bo^(#), Cassivi D.Stephen, Andrade de Mariza, Nichols C. Francis, Trastek F. Victor, Wang Yi, Wamper A. Jason, Stoddard M. Shawn, Wigle A. Dennis, Shen K. Robert, Allen S. Mark, Deschamps Claude, Yang Ping^(*), Clinical outcomes and changes in lung function after segmentectomy versus lobectomy for lung cancer cases, *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 2014, 148 (4) : 1186-1192。SCI 期刊论文
- 4、 Deng Bo^(#), Sun Zhifu^(*), Jason Wampfler, Yang Ping, Increased BCAR1 Predicts Poor Outcomes of Non-small Cell Lung Cancer in Multiple-Center Patients, *Ann Surg Oncol*, 2013, Suppl 3 (1) : s701-s708。SCI 期刊论文
- 5、 Huang Wei^(#), Deng Bo^(*), Wang RuWen^(*), Tan QunYou, He Yong, Jiang YaoGuang, Zhou JingHai, BCAR1 protein plays important roles in carcinogenesis and predicts poor prognosis in non-small-cell lung cancer., *Plos One*, 2012, 7 (4) : 24-32。SCI 期刊论文
- 6、 Deng Bo^(#), Tan QunYou^(*), Fan XiaoQing, Jiang YaoGuang, Zhao YunPing, Zhou JingHai, Liang YongGang, Wang RuWen^(*), Clinical value of assaying tumor supplied group of factor/tumor specific growth factor in patients with solitary pulmonary nodule, *Clinical lung cancer*, 2011, 12 (3) : 192-196。SCI 期刊论文
- 7、 Deng Bo^(#), Huang Wei^(#), Tan QunYou, Fan XiaoQing, Jiang YaoGuang, Liu Lin, Zhong YaYi, Liang YongGang, Wang RuWen^(*), Breast cancer anti-estrogenresistance protein 1 (BCAR1/p130cas) in pulmonary disease tissue and serum, *Molecular diagnosis & therapy*, 2011, 15 (1) : 31-40。SCI 期刊论文
- 8、 Wang Yi^(#), Midthun David E, Wfler Jason A, Deng Bo, Stoddard Shawn M, Zhang Shuo, Yang Ping^(*), Trends in the proportion of patients with lung cancer meeting screening criteria, *JAMA*, 2015, 313 (8) : 853-855。SCI 期刊论文



- 9、黄伟^(#), 范小青, 王如文^(*), 邓波^(*), 蒋耀光, 赵云平, 郭伟, 人乳腺癌抗雌激素药物耐药蛋白1基因siRNA慢病毒载体的构建与鉴定, 中国生物制品学杂志, 2013, 26 (1): 17-21。 期刊论文
- 10、黄伟^(#), 邓波, 王如文^(*), 蒋耀光, 谭群友, 范小青, 乳腺癌抗雌激素药物耐药蛋白1在食管鳞癌血清和组织中的表达及临床意义, 中华实验外科, 2012, 29 (8): 1506-1510。 期刊论文
- 11、黄伟^(#), 邓波, 王如文, 蒋耀光, BCAR1/P130CAS与肿瘤相关机制研究进展, 重庆医学, 2012, 41 (10): 2480-2482。 期刊论文
- 12、黄伟^(#), 范小青^(#), 邓波^(*), 王如文^(*), 蒋耀光, 谭群友, 乳腺癌抗雌激素药物耐药蛋白在非小细胞肺癌中的表达及临床意义, 第三军医大学学报, 2011, 33 (20): 1-4。 期刊论文



附件信息

序号	附件名称	备注	附件类型
1	Oncol Lett	P130cas is required for TGF β 1 mediated epithelial mesenchymal transition in lung cancer	代表性论著
2	Ann Surg Oncol	Increased BCAR1 Predicts Poor Outcomes of Non-small Cell Lung Cancer in Multiple-Center Patients	代表性论著
3	PLos One	BCAR1 protein plays important roles in carcinogenesis and predicts poor prognosis in non-small-cell lung cancer.	代表性论著
4	Molecular diagnosis & therapy	Breast cancer anti-estrogenresistance protein 1 (BCAR1/p130cas) in pulmonary disease tissue and serum	代表性论著
5	Cell Biosci	Clinical biomarkers of pulmonary carcinoid tumors in never smokers via profiling miRNA and target mRNA	代表性论著
6	伦理委员会证明	伦理委员会证明	其他

**签字和盖章页(此页自动生成, 打印后签字盖章)**

申请人: 邓波

依托单位: 中国人民解放军第三军医大学

项目名称: 肺腺癌通过BCAR1生成高侵袭性循环肿瘤细胞及免疫逃避的研究

资助类别: 面上项目

亚类说明:

附注说明: 常规面上项目

申请人承诺:

我保证申请书内容的真实性。如果获得资助, 我将履行项目负责人职责, 严格遵守国家自然科学基金委员会的有关规定, 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:

项目组主要成员承诺:

我保证有关申报内容的真实性。如果获得资助, 我将严格遵守国家自然科学基金委员会的有关规定, 切实保证研究工作时间, 加强合作、信息资源共享, 认真开展工作, 及时向项目负责人报送有关材料。若个人信息失实、执行项目中违反规定, 本人将承担相关责任。

编号	姓名	工作单位名称	证件号码	每年工作时间(月)	签字
1	钱凯	中国人民解放军第三军医大学		8	
2	冯涌耕	中国人民解放军第三军医大学		8	
3	王颖建	中国人民解放军第三军医大学		8	
4	范小青	中国人民解放军第三军医大学		8	
5	张景阁	中国人民解放军第三军医大学		8	
6	于杰	中国人民解放军第三军医大学		9	
7	曾小飞	中国人民解放军第三军医大学		8	
8	张全	中国人民解放军第三军医大学		8	
9					

依托单位及合作研究单位承诺:

已按填报说明对申请人的资格和申请书内容进行了审核。申请项目如获资助, 我单位保证对研究计划实施所需要的人力、物力和工作时间等条件给予保障, 严格遵守国家自然科学基金委员会有关规定, 督促项目负责人和项目组成员以及本单位项目管理部门按照国家自然科学基金委员会的规定及时报送有关材料。

依托单位公章

日期:

合作研究单位公章1

日期:

合作研究单位公章2

日期: