国家自然科学基金委员会
项 目 批 准 通 知

国科金计项〔2015〕17号

关于批准资助2015年度第二批项目的通知

汕头大学（单号：2015-17-0756）：

根据《国家自然科学基金条例》有关规定和专家评审意见，国家自然科学基金委员会（以下简称自然科学基金委）决定批准资助你单位2015年度（第2批）国家自然科学基金项目 29 项，直接费用 1259.5 万元。其中，面上项目 19 项，青年科学基金项目 10 项，上述资助项目清单详见附件。

自评审结果通告发布之日起25日内，项目负责人须按要求填写与提交《国家自然科学基金资助项目计划书》（以下简称计划书）电子版。2015年9月11日16点前，依托单位将审核后的计划书电子版通过科学基金网络信息系统（https://isisn.nsfc.gov.cn）提交至自然科学基金委。**《国家自然科学基金资助项目资金管理办法》已于2015年4月15日起施行，依托单位须严格按照该办法审核计划书的资金预算。**自然科学基金委同期对计划书电子版进行审核。审核通过的，项目负责人可打印计划书纸质版（建议双面打印）；审核未通过的，退回至项目负责人修改，依托单位须在2015年9月18日16点前，将修改后的计划书电子版及时审核并再次提交至自然科学基金委。20

15年9月25日16点前，依托单位须将自然科学基金委审核通过后的计划书纸质版（一式两份，应保证与电子版一致）加盖单位公章，报送至自然科学基金委项目材料接收工作组。采用邮寄方式的，请在截止日前（以发信邮戳日期为准）以快递方式邮寄，并在信封左下角注明“计划书”。请勿使用包裹，以免延误报送。报送计划书材料时，还应包括本单位报送计划书的公函和计划书清单。材料不完整不予接收。

如在规定期限内未提交和报送电子与纸质计划书的，视为自动放弃接受资助。

邮寄地址：北京市海淀区双清路83号项目材料接收工作组
邮编：100085
联系电话：010-62328591

附件：2015年度国家自然科学基金资助项目清单

国家自然科学基金委员会
2015年8月19日

2015年度国家自然科学基金资助项目清单（汕头大学）

单号：2015-17-0756　　　　直接费用单位：万元

序号	项目批准号	负责人	申请代码	项目名称	直接费用	起止日期	资助类别/亚类说明/附注说明
12	81500764	陈理佳	H1208	息肉状脉络膜血管病变新基因的定位：全基因组关联分析的后续研究	18	2016.01.01-2018.12.31	青年科学基金项目
13	81500960	何昕华	H0903	CDK5 及其激活因子在糖尿病神经病理性疼痛发生中的作用及其机制研究	17.5	2016.01.01-2018.12.31	青年科学基金项目
14	81501539	刘静	H1808	基于光学成像技术在体监测miR-200c在乳腺癌上皮间质转化过程中作用的研究	18	2016.01.01-2018.12.31	青年科学基金项目
15	81501685	祝宁侠	H1509	lncRNA H19调控DP细胞毛囊诱导功能的机制研究	18	2016.01.01-2018.12.31	青年科学基金项目
16	81503639	卫哲	H2718	电针对L1CAM表达调控参与脊髓损伤神经再生分子机制研究	18	2016.01.01-2018.12.31	青年科学基金项目
17	81570567	周小玲	H0318	hESC-derived hepatocytes 中抗HBV干扰素反应模式及关键ISGs 的功能分析	57	2016.01.01-2019.12.31	面上项目/常规面上项目
18	81570772	程继东	H0717	AMPD 3基因调节脂肪细胞胰岛素抵抗的分子机制研究	58	2016.01.01-2019.12.31	面上项目/常规面上项目
19	81570849	岑令平	H1204	趋化因子CXCL5在炎症促视神经修复中的作用	51	2016.01.01-2019.12.31	面上项目/常规面上项目
20	81571627	郑文斌	H1801	先天性聋哑儿童人工耳蜗植入术后听觉及言语功能康复功能磁共振成像预测研究	58	2016.01.01-2019.12.31	面上项目/常规面上项目
21	81571920	唐世杰	H1508	腭裂形成中miR-106a-5p靶向TGF-βR2和SATB2基因调控自噬的机制研究	60	2016.01.01-2019.12.31	面上项目/常规面上项目
22	81571994	孙平楠	H1904	JAKi介导的HBV在人胚胎干细胞来源的肝脏细胞（hESC-Heps）中感染增强的分子机制	55	2016.01.01-2019.12.31	面上项目/常规面上项目

广东省科学技术厅文件

粤科规财字〔2016〕49号

广东省科学技术厅关于下达2016年省科技发展专项资金（基础与应用基础研究方向）项目计划的通知

各地级以上市科技局（委），顺德区经济和科技促进局，各有关单位：

2016年度省科技发展专项资金（基础与应用基础研究方向）项目已经公示无异议，现按规定下达给你们，并就有关事项通知如下：

一、本次下达的科技计划项目共1571项，经费24530万元。

二、各级主管部门和项目承担单位收到本通知后，须尽快按照《广东省科学技术厅关于省科技计划项目合同书管理的实施细

则（试行）》（粤科函规划字〔2013〕1097号）有关规定与省科技厅签订项目合同书，并协助下达财政资金（资金计划由省财政厅另文下达）。

三、各级主管部门应履行项目的日常监管职责，督促项目承担单位做好项目的组织实施，并配合省有关部门组织开展的监督检查、绩效评价、验收结题、项目审计等相关工作。

四、各项目承担单位要抓紧项目的组织实施，严格按照科技经费的使用范围和有关规定管好用好财政资金，确保按期完成科研任务，提升创新能力。项目在研过程中每自然年度第1个月内须在省科技业务管理阳光政务平台（网址 http://pro.gdstc.gov.cn）填报上年度执行情况报告。项目完成后，要按照《广东省科学技术厅关于省科技计划项目结题管理的实施细则（试行）》（粤科监审字〔2014〕121号）有关规定进行结题。

附件：2016年科技发展专项资金（基础与应用基础研究方向）项目计划安排表

省科技厅

2016年4月22日

公开方式：依申请公开

广东省科学技术厅办公室　　2016年4月22日印发

附件：

2016年科技发展专项资金（基础与应用基础方向）项目计划安排表

（单位：万元）

序号	承担单位	项目编号	项目名称	负责人	项目立项总金额	2016年度拟下达资金
9	汕头大学				670	350
	汕头大学	2016A030313066	海水酸度与紫外辐射对龙须菜品质的耦合影响研究	陈善文	10	10
	汕头大学	2016A030310076	相依脆性、弹性和尺度模型样本的次序统计量的随机比较	方睿	10	10
	汕头大学	2016A030313067	多巴胺信号传递异常对少突胶质细胞分化和成熟的影响及其分子机制	许海云	10	10
	汕头大学	2016A030313062	镉暴露与鼻咽癌发生发展及放射抗拒相关机制	彭琳	10	10
	汕头大学	2016A030313065	海洋酸化对粤东近岸海洋浮游植物群落的影响及其机制研究	李平	10	10
	汕头大学	2016A030313068	不完全信道信息下MIMO无线信息与能量联合传输研究	周雯	10	10
	汕头大学	2016A030310075	HIV gp120 与精子活力及凋亡关系的研究	徐晓园	10	10
	汕头大学	2016A030313073	创业成长意愿的制度约束及缓解机制研究	宋丽红	10	10
	汕头大学	2016A030313064	金属二硫代氨基甲酸配合物的抗癌特性和其潜在的医学应用与发展	辛伟贤	10	10
	汕头大学	2016A030313061	miR-106a-5p靶向TGF-βR2基因调控自噬在腭裂形成中的机制研究	石伦刚	10	10
	汕头大学	2016A030313063	Notch1信号通路在人脂肪来源干细胞向视网膜光感受器细胞定向诱导分化中的作用	黄育强	10	10
	汕头大学	2016A030310078	长链非编码RNA H19调控毛乳头细胞诱导功能的机制研究	祝宁侠	10	10
	汕头大学	2016A030313070	食管癌胚系突变基因M在癌变中的作用机制研究	黄博	10	10
	汕头大学	2016A030310077	基于自适应稀疏编码和低成本Karhunen-Love变换的高光谱图像混合低秩重建	刘蕾	10	10
	汕头大学	2016A030313072	继任者自主权、能力禀赋与家族企业多元化战略研究	梁强	10	10
	汕头大学	2016A030313071	甲基化DNA去氨基在高龄生育男性子代疾病发生中的作用研究	徐国刚	10	10
	汕头大学	2016A030313069	CDK5/p35在脊髓背角介导NR2B磷酸化参与糖尿病神经病理性疼痛的形成	何昕华	10	10
	汕头大学	2016A030312008	基于多模态分子影像技术的乳腺癌精准医疗	张国君	300	150
	汕头大学医学院	S2012030006289	基因表达的表观遗传调控与疾病	黄东阳	200	30

汕头市科学技术局文件

汕府科〔2020〕66号

关于下达2020年汕头市医疗卫生科技计划（财政资金支持类）项目的通知

各有关单位：

2020年汕头市医疗卫生科技计划（财政资金支持类）项目经组织评审、公示，并经市政府批准同意(汕府办综转〔2020〕1-259号)，现予下达。有关事项一并通知如下：

一、本次下达项目33项，具体安排金额见附件。请项目主管部门履行监管职责，督促项目的组织实施、必要时配合检查、绩效评估等相关工作。

二、请各项目承担单位抓紧组织项目实施，干在实处，用好管好资金，履行项目实施的主体责任，项目完成后及时向市科技局提交验收申请。

附件：2020年汕头市医疗卫生科技计划（财政资金支持类）项目表

汕头市科学技术局

2020年8月20日

汕头市科学技术局办公室	2020年8月20日印发

（共印发13份）

附件：

2020年汕头市医疗卫生科技计划(财政资金支持类)项目表

序号	项目名称	申报单位	申报人	安排经费（万元）
1	SGLT2i对2型糖尿病患者肠道菌群结构改变及血管细胞内皮功能的干预研究	汕头市中心医院	杨曙晖	4
2	基于人工神经网络数据挖掘技术的上尿路结石并发尿源性脓毒血症风险预测研究	汕头市中心医院	洪旭伟	4
3	基于利多卡因胶浆吲哚菁绿荧光探针实时评估乳腺癌保乳切缘的研究	汕头市中心医院	邱斯奇	4
4	症状性重度颅内动脉狭窄患者支架成形术1年临床结局	汕头市中心医院	蔡楚伟	4
5	胸腔镜下二尖瓣置换同期行三尖瓣成形不同成形术式的比较研究	汕头市中心医院	陈天博	4
6	基于临床科研需求的多平台乳腺癌电子化数据筛选与整合方案	汕头市中心医院	张艺敏	4
7	基于微信小程序的医院办公管理系统	汕头市第二人民医院	周绍军	4
8	滋肾活血法对复发性流产早孕期血栓前状态干预的临床研究	汕头市中医医院	陶　杨	4
9	下肢静脉曲张腔内微波治疗的临床研究	汕头市中医医院	林俊平	4
10	蜂毒肽对卡巴胆碱致痫模型的影响及其分子机制的探究	汕头大学医学院	纪晓宇	6
11	LC3通过调节线粒体自噬实现自噬与凋亡互作及机制	汕头大学医学院	李冠武	6
12	MAPK15与NFAT3相互作用在肺癌发生发展中的功能研究	汕头大学医学院	许彦鸣	6
13	团体ACT（接纳与承诺疗法）干预对1型青少年糖尿病患者心理健康及糖尿病自我管理能力的作用与影响	汕头大学医学院	苏　静	6
14	转录因子Notch3抑制细胞骨架蛋白FSCN1及乳腺癌转移的分子机制研究	汕头大学医学院	刘　静	6
15	青年医师职业精神行为测评相关研究—以汕头市三级甲等医院为例	汕头大学医学院	方燕君	6
16	TXA2/TP调控Hippo通路介导AngII诱导的主动脉夹层动脉瘤形成的机制研究	汕头大学医学院第一附属医院	胡创加	4

17	CircCSPP1 靶向 miR-197-3p/CHEK1 通路促进结直肠癌生长及转移的机制研究	汕头大学医学院第一附属医院	李欣欣	4
18	UPF1 通过靶向 lncRNA linc00662 抑制结直肠癌的 EMT 进程	汕头大学医学院第一附属医院	王怀明	4
19	基于体质辨识的耳穴贴压联合八段锦促进肠癌术后胃肠功能恢复的临床研究	汕头大学医学院第一附属医院	陈惜遂	4
20	基于知识转化模式预防 ICU 气管插管非计划拔管循证护理实践方案的构建	汕头大学医学院第一附属医院	黄海星	4
21	高通量测序分析光动力治疗对重度寻常痤疮患者皮肤菌群影响的研究	汕头大学医学院第一附属医院	路　涛	4
22	白介素-37 拮抗 ox-LDL 诱导冠脉内皮细胞诱导内质网应激通路分泌钙化因子的研究	汕头大学医学院第二附属医院	李吉林	4
23	过表达 hi-FGF2 与 B23 相互作用影响 Akt 活化导致心肌细胞凋亡机制的研究	汕头大学医学院第二附属医院	洪晓冰	4
24	HP1γ在黑色素瘤发生发展中的作用及其分子机制	汕头大学医学院第二附属医院	钟晓平	4
25	CBX3 调控肾透明细胞癌发生的分子机制研究	汕头大学医学院第二附属医院	陈嘉胜	4
26	下调的 N6AMT1 介导低 6mA 甲基化在乳腺癌他莫昔芬耐药的机制研究	汕头大学医学院附属肿瘤医院	陈炯玉	4
27	大样本多中心验证研究评价血清 BLC、MIP-1β和 MMP-1 联合检测在食管鳞癌中的早期诊断价值	汕头大学医学院附属肿瘤医院	许镒洧	4
28	影像组学预测鼻咽癌高复发风险区域	汕头大学医学院附属肿瘤医院	翟田田	4
29	Notch3 转录上调 STAT5A 抑制乳腺癌上皮间质转化的机制研究	汕头大学医学院附属肿瘤医院	陈敏娜	4
30	开发连续监测头位的可穿戴设备提高玻璃体填充手术的效果	汕头大学·香港中文大学联合汕头国际眼科中心	陈浩宇	4
31	基于深度生成对抗网络对房角关闭患者激光治疗前后房角结构变化的 2 年临床前瞻性研究	汕头大学·香港中文大学联合汕头国际眼科中心	谢晓玲	4
32	原发性闭角型青光眼患者白内障手术中人工晶状体计算预测的准确性研究	汕头大学·香港中文大学联合汕头国际眼科中心	马　迪	4
33	甲状腺相关性眼病的病理机制	汕头大学·香港中文大学联合汕头国际眼科中心	李泽宜	4
合　计				**144**

受理编号：20191112195849560

项目编号：A2020627

文件编号：粤卫科教函〔2020〕15 号

广东省医学科学技术研究基金项目

合 同 书

项目名称：	黏蛋白 MUC2 对人结肠癌的影响及其基因调控机制的研究
资助类别：	立项资助
项目起止时间	2020 年 07 月 01 日 至 2022 年 06 月 30 日
管理单位（甲方）：	广东省卫生健康委员会
承担单位（乙方）：	汕头大学医学院第一附属医院
通讯地址：	广东省汕头市长平路 57 号

邮政编码：	515041	单位电话：	0754-88905376
项目负责人：	郑逸锋	联系电话：	13750481851
电子邮箱：	59448569@qq.com	手机：	13750481851
项目联系人：	郑付春	联系电话：	0754-88905376

乙方主管部门（丙方）：汕头大学医学院

A2020627

广东省卫生健康委员会

二〇一九年制

一、项目实施内容（包括研究方案和技术路线，须与项目申报书“可行性报告”相一致，限 600 字）

研究内容一：MUC2 在结肠癌细胞细胞增殖、凋亡、侵袭和转移过程中的作用。技术路线：A. 用 qRT-PCR 分别检测两组 MUC2 基因 mRNA 水平的表达情况；B. 用 Western Blot 分别检测两组 MUC2 蛋白水平的表达情况；C. 通过 CCK-8 试验检测细胞株的增殖能力；D. Transwell 试验检测细胞株的侵袭能力；E. 划痕实验检测细胞株的迁移能力；

研究内容二：结肠癌组织中 MUC2 表达情况、血浆 DAO、D-乳酸水平及临床意义。技术路线：A. 筛选符合条件的患者（所有患者术前病理活检提示腺癌；均未行化学、放射治疗和或分子靶向治疗；均可进行根治性手术；无手术禁忌症），收集手术切除的 126 例结肠癌组织及距肿瘤边缘 5cm 以上近标本切缘处正常结肠组织。所有患者临床资料完整。B. 采用免疫组织化学技术检测结肠癌组织和癌旁正常组织中 MUC2 的表达情况。紫外线分光光度计检测结肠癌患者及正常人血浆 DAO、D-乳酸水平并与 Muc2 进行。分析患者临床病历资料。C. 术后随访：术后第 6、12、18、24、36、48、60 个月需要对患者进行胸腹部的 CT 和 CEA 检测，了解有无肠癌复发或转移，对所有患者进行随访检查直到术后 5 年，记录患者无病生存期（DFS）、疾病特异性生存期（DSS）、肠癌特异性死亡率、肠癌特异性复发率。

研究内容三：结肠癌动物实验验证。技术路线：A. 选择第二部分得到的高表达 MUC2 细胞株及转染 MUC2 干扰质粒的细胞株，接种裸鼠，皮下成瘤观察移植瘤增殖、转移情况。统计肿瘤成瘤率、测量肿瘤大小、计算淋巴结转移、肝脏及网膜转移、及死亡率的差异；验证 MUC2 对结肠癌发生发展的作用。B. 应用分光光度法分别检测各组小鼠血浆 DAO、D-乳酸水平，评估其肠道黏膜屏障功能。

A2020627

二、项目考核指标

（一）项目完成后提供的研究开发成果及形式（须明确产品、专利、版权、标准等成果的类型及数量）

成果形式		成果数量	成果形式		成果数量
发明专利	申请	0	引进人才（人）		0
	授权	0	培养人才（人）	访问学者	0
实用新型专利	申请	0		博士生	0
	授权	0		研究生	1
外观设计专利	申请	0		进修生	0
	授权	0	科技人才奖励（人）		0
国外专利	PCT 受理	0	技术标准制定	牵头（个）	0
	授权	0		参与（个）	0
项目组成员晋升情况	初级升中级	0	软件著作权（项）		0
	中级升副高	1	论文论著（篇）		1
	副高升正高	0	其中：被收录论文数（篇）	SCI	0
获得国家级科技奖项（项）		0		IE	0
获得省级科技奖项（项）		0		CA	0
获得市级科技奖项（项）		0		中文核心期刊	1
新产品（或新材料、新设备）		0		其他	0
新技术（或新方法、新项目）		0	临床应用例数		0

其他成果及形式说明：

无

（二）主要技术经济指标及社会效益

累计新增业务收入（万元）	0
累计新增门诊和住院病人数（人）	0

其他主要技术经济指标及社会效益说明：

0

项目负责人（签章）： **年 月 日**

A2020627

三、项目进度和阶段目标

（一）项目起止时间：　2020 年 07 月 01 日　——　2022 年 06 月 30 日	
（二）项目进度、主要工作内容及阶段目标	
2020/07/01 至 2020/12/31	完成研究内容一，研究 MUC2 在结肠癌细胞中对细胞增殖、凋亡、侵袭和转移过程中的作用。
2020/12/31 至 2021/06/30	完成研究内容二，结肠癌组织中 MUC2 表达情况及临床意义
2021/07/01 至 2021/12/31	完成研究内容三，结肠癌动物实验验证
2021/12/31 至 2022/06/30	补充实验，完成结题报告。
至	
至	
至	

四、承担、参与单位工作分工及经费分配情况

承担/参与单位名称（盖章）	工作分工	总经费分摊(万元)	基金经费分配(万元)
汕头大学医学院第一附属医院	整体负责；实验；方案设计；实验；数据分析	1	0.5
		0	0
	合计	1	0.5

A2020627

五、项目总经费及基金经费预算

（一）基金经费下达总额：（大写） 伍仟元整 ；（小写）： 0.5 万元

（二）总经费及基金经费开支预算计划：

经费筹集情况： （单位：万元）

总投入经费：1

	基金经费	自筹资金				合计
		主管部门配套	单位配套	项目组自筹	其它	
已投入经费	0	0	0	0	0	0
新增经费	0.5	0	0	0.5	0	1

政府部门、境外资金及其他资金投入情况说明	0

新增经费预算： （单位：万元）

	新增经费总额		基金经费	
支出经费	经费额	用途说明	经费额	用途说明
1、直接费用	0.975	/	0.475	/
（1）设备费	0	/	0	/
（2）材料费	0.75	购买试验试剂和材料	0.25	购买试验试剂和材料
（3）测试化验加工外协费	0	/	0	/
（4）燃料动力费	0	/	0	/
（5）差旅费	0	/	0	/
（6）会议费	0	/	0	/
（7）出版/文献/信息传播/知识产权事务费	0.225	投稿版面费用	0.225	投稿版面费用
（8）租赁费	0	/	0	/
（9）国际合作与交流费	0	/	0	/
（10）专家咨询费	0	/	0	/
（11）人员劳务费	0	/	0	/
（12） 其他支出	0	/	0	/
2、间接费用	0.025	/	0.025	/
项目管理费	0.025	课题、人员管理费用	0.025	课题、人员管理费用
合计	1.000		0.500	

注：间接费不得超过基金经费的 5%。

A2020627

六、人员信息

项目负责人							
姓名	性别	身份证号码	学历	职称	所在单位	项目分工	签名
郑逸锋	男	[redacted]	硕士	主治医师	汕头大学医学院第一附属医院	整体负责	
项目组主要成员（[redacted]							
陈焕杰	男	[redacted]	本科生	其他	汕头大学医学院第一附属医院	实验	
王怀明	男	[redacted]	研究生	主治医师	汕头大学医学院第一附属医院	方案设计	
甘国莲	女	[redacted]	本科	其他	汕头大学医学院第一附属医院	实验	
林勇冰	男	[redacted]	硕士	医士	汕头大学医学院第一附属医院	数据分析	

A2020627

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 2020 年广东省医学科学技术研究基金 黏蛋白 MUC2 对人结肠癌的影响及其基因调控机制的研究 项目（项目编号： A2020627 ）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。

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，须按照有关规定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.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 在履行本合同过程中，需要对项目起止时间、项目经费使用（包括自筹经费、经费分配及经费支出预算等）、项目内容（包括研发内容、技术指标、经济指标及成果指标等）、项目名称、项目承担单位（包括承担单位更名、承担单位替换）、参与单位、项目负责人和成员等进行变更的，甲乙双方按照有关规定执行。

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 属技术保密的项目，甲乙双方应另行订立技术保密条款，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 项目申报书所附“项目可行性报告”，作为本合同正式内容的一部分，与本合同具有同等效力。

第十条 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。

第十一条 本合同的争议应由双方本着协商一致的原则解决，如双方协商不成的，则应向甲方所在地法院提起诉讼。

A2020627

第十二条　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省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。

第十三条　甲方可根据具体情况决定乙方是否需要单位担保，若需要保证单位，应订立担保条款，作为本合同正式内容一部分。当乙方不履行或不完全履行本合同，以及没有或没有完全承担违约责任时，乙方的保证单位承担连带保证责任。

第十四条　本合同一式四份，各份具有同等效力。甲方存一份，乙方存二份，丙方存一份，本合同自签字之日起生效，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。

说明：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（/）。

A2020627

八、本合同签约各方

管理单位（甲方）：广东省卫生健康委员会
单位地址：广州市先烈南路 17 号 法定代表人（或授权代表）：　　　　　　　　　　（签章） 联系人（经办人）姓名：　　　　　　　　　　（签章） E-mail： 电话：020-83848500 2020 年 05 月 19 日
承担单位（乙方）：　　汕头大学医学院第一附属医院　　（盖章）
单位地址： 广东省汕头市长平路 57 号 法定代表人（或法人代理）：　谭学瑞　（签章） 科管部门负责人：　郑付春　（签章） E-mail： sdfykjk@163.com 电话： 13902734162 2020 年 04 月 20 日
乙方主管部门（丙方）：　　汕头大学医学院　　（签章）
单位地址： 广东省汕头市金平区新陵路 22 号 法定代表人（或法人代理）：　谭学瑞　（签章） 联系人（项目主管）姓名：　姚芬　（签章） E-mail： fyao@stu.edu.cn 电话： 15916618543 2020 年 04 月 20 日

A2020627

申请书

项目名称：	黏蛋白 MUC2 对人结肠癌的影响及其基因调控机制的研究
申请人姓名：	郑逸锋、王怀明、林勇冰、陈焕杰、甘国莲
依托单位：	汕头大学医学院第一附属医院
邮政编码：	515041
通讯地址：	广东省汕头市金平区长平路 57 号汕头大学医学院第一附属医院
申请人电话：	13750481851
单位联系人：	
单位电话：	
申请日期：	2019-11-1

A2020627

报告正文

一、立论依据

1、研究意义

在全球范围内，结肠癌的发生率居常见恶性肿瘤的第三位，死亡率居第二位[1]，并且随着人们生活方式及饮食习惯的改变，其发生率、死亡率正逐年上升，而发病的平均年龄则一直在下降。在我国，每年新发结肠癌病例达 30 万例，并以年均 4.2%增幅不断升高，其发生率及死亡率存在明显的性别及地域差异，总体趋势是男性高于女性，城市高于农村。结肠癌正成为严重威胁人类生命健康的主要疾病之一。造成这种严峻情形的主要原因有如下两个方面。一是结肠癌早期难以发现，而中晚期结肠癌治疗效果差，手术后易发生复发转移。二是结肠癌的发生病因机制复杂，由于结肠恶性肿瘤的演变机制缺乏深刻认识，导致对应的治疗药物研究一直十分匮乏。因此，深入到基因分子水平，探索研究结肠癌演变的机制显得犹为重要。

2、国内外研究现状

结肠癌的发生是遗传和环境多种因素综合作用的结果，病因机制复杂，其中得到普遍认同的有炎症因子致瘤学说、基因突变学说、肠道微生态失衡学说、免疫调节失常学说等。而肠道屏障结构和功能受损导致肠粘膜发生一系列病理生理变化，最终演变成恶性肿瘤，这种说法参与上诉多种学说病理生理过程，是多种发生机制中最基础的一环。肠道黏膜屏障包括机械屏障、化学屏障、生物屏障及免疫屏障。其中机械屏障是肠道抵御外界有害因素的一线屏障，也是维持机体内环境稳态的重要屏障。机械屏障主要由黏膜表面的黏液层、肠上皮细胞及紧密连接、黏膜下基底层构成。

黏液层是参与构成肠道黏膜机械屏障的第一道防线，也是最基础、最重要的一道防线，其主要成分有黏蛋白、磷脂、水、免疫分子等，不仅起到润滑、保护肠黏膜的作用，还可参与细胞间黏附、细胞间信号传导和免疫调节等过程。正常情况下，肠黏膜机械屏障紧密而完整主要有赖于覆盖在肠黏膜表面的黏液层的保护。黏蛋白（mucin，MUC）是一类广泛存在于各种组织器官中的高相对分子质量且高度糖基化修饰的蛋白家族，迄今为止发现 27 种 MUC 蛋白，大致可分为分泌

A2020627

型和膜结合型两类。其中 MUC2 是一种分泌型黏蛋白，主要分布于肠腔，参与构成肠黏液的主要成分。当肠腔内黏蛋白(主要是 MUC2)表达减少时，肠腔内的各种病原微生物及有毒物质入侵，使得肠黏膜机械屏障发生一定的破坏，如肠上皮细胞凋亡、紧密连接蛋白分布和表达异常，从而导致肠黏膜通透性增加，肠道屏障功能受损。MUC2 发挥作用的主要结构域是由大量的苏氨酸、丝氨酸和脯氨酸反复连接共同形成的重复串联多肽。在抗炎作用方面，MUC2 有助于合成抗菌肽链杀菌素，阻断炎症的诱导过程，进而能保护肠黏膜免受溶组织结构和葡萄糖酸钠的破坏[2]。荷兰学者在研究稀有变体对溃疡性结肠炎（Ulcerative colitis，UC)）遗传易感性的影响中发现 MUC2 基因与溃疡性结肠炎的稀有变体有关联[3]。在维持肠道内环境稳态方面，MUC2 可保护易感细菌免受其抗菌作用，若缺乏 MUC2 将导致肠腔内微生态失衡，肠道内细菌及内毒素移位，增加自发性肠道炎症的发生[4]。在激发免疫功能发面，MUC2 所含有的大量 O 型寡聚糖链骨架结构不仅可为分泌型免疫球蛋白 A 及抗菌肽等免疫分子提供相应的结合位点，其本身也可以包裹黏膜表面的有害物质[5]，协同树突状细胞，诱导白介素-10 和其他免疫因子的表达，进而发挥后续的免疫作用[6]。**但目前并没有研究在分子水平上对 MUC2 与肠道屏障功能的关系进行深入探讨。**

MUC2 在结肠癌组织中的表达相关研究显示,MUC2 在结肠癌组织中的表达较正常黏膜组织降低，提示 MUC2 的下调可能参与结肠癌的发生。但 MUC2 的表达具有组织和细胞特异性，有研究报道，结肠非黏液腺癌与黏液性腺癌中 MUC2 的表达呈现明显分离趋势[7]，**提示两种类型的癌组织中 MUC2 表达调控机制不同**，但具体机制差异并未阐明。通过分析 MUC2 表达与结肠癌患者临床病理资料的相关性发现，MUC2 表达与肠癌部位、大小、TNM 分期、淋巴转移等成负相关，与生存期成正相关,而与患者性别、组织学分级、侵袭深度和远处转移之间无关联[8,9]。Adam F 等[10]认为 MUC2 的表达与肠癌分期、分级、淋巴转移无明显相关性，而与肿瘤部位、复发及患者预后相关，且 MUC2 阴性表达在左半结肠癌组织中更常见，且与阳性表达者相比，阴性表达者无病生存期更短（DFS）、疾病特异性生存期（DSS）更短，预后更差。这提示 **MUC2 有望成为鉴别左/右半结肠癌、评价患者预后的生物标记物之一**。

既往有研究表明，大肠癌组织中 MUC2 表达减少涉及的可能机制有：肠癌细

A2020627

胞转录因子 CDX2 表达减少，而 CDX2 与 MUC2 启动子相互作用可促进 MUC2 的表达[11]。肠癌细胞 MUC2 基因启动子甲基化修饰抑制其表达[12]。癌细胞 MUC2 糖基化缺陷而不能表达正常的黏液类型[13]。如前所诉，MUC2 蛋白在肠癌中表达下降可能与肿瘤的发生发展有关，并且常常预示着患者预后不良。**因此，我们猜想，上调 MUC2 表达可抑制肠癌进展，改善患者预后。**由此可见，参与 MUC2 基因表达调控的靶 microRNA（miRNA）及转录因子在结肠癌的进程中发挥了关键作用。**但目前关于 MUC2 基因受哪些 miRNA 及转录因子的调控在肠癌中实施分子功能，尚不清楚。**因此上调 MUC2 表达首当其冲需要揭露 MUC2 的靶 miRNA 或者转录因子。

通过生物信息学手段，在多个靶基因预测网站上查询 MUC2 的靶 miRNA，最终筛选出 miR-138、miR-34c、miR-9 进行研究。检索相关文献可知，三者在多种疾病的发生发展过程中均扮演着重要的调控作用。首先，miR-138 可促进肺动脉高压的发生[14]、调控哺乳动物神经轴突的再生能力[15]、抑制间充质干细胞成骨分化[16]等；在肿瘤性疾病中，miR-138 在鼻咽癌[17]、头颈部鳞状细胞癌[18]**错误！未找到引用源。**、乳腺癌[19]中**表达沉默，证明其是重要的肿瘤抑制因子**；此外，在结肠疾病中，miR-138 也起着重要的作用。Swati Valmiki 研究团队通过微阵列分析溃疡性结肠炎患者的发炎和非发炎区结肠黏膜差异 miRNA 表达谱发现，与非发炎区相比，发炎区肠黏膜中 miR-138、miR-125b 显着上调[20]。Yang Qingqiang 等人证明了长链非编码 RNA H19 通过靶向抑制 miR-138 的表达，使得 HMGA1 表达上调，进而促进结肠癌的迁移和侵袭[21]。而为了明确结肠炎恶性转化的机制。Bao, Yonghua 研究团队发现 MUC2 基因的表达缺失可导致结肠炎小鼠发生结肠炎-结肠癌恶性转化，并进一步通过通过微阵列分析，证明了 miR-138 在 MUC2 缺失小鼠肠黏膜组织中表达异常，并且在人结肠炎和结肠直肠癌组织中显着下调[22]，**但并没有进一步证明 miR-138 与 MUC2 是否存在靶向调控关系**。miR-34c 可参与精子发生、干细胞分化、神经元发育、心肌细胞损伤修复、衰老等过程，涉及脑部疾病、骨质疏松症和心血管并发症等多种疾病。此外，在肿瘤性疾病中，miR-34c 也发挥着重要的作用。miR-34c 并在乳腺癌、肺癌[23]、胰腺癌[24]、胃癌[25]中表达沉默，证明其是重要的肿瘤抑制因子。Zhou，xiaoying 等人证明了幽门螺杆菌感染相关的长非编码 RNA（lncRNA）AF147447 可通过上调 miR-34c 来抑制 MUC2 的表达，抑制胃癌的增殖和侵袭[26]。miR-34c 在结肠癌中

A2020627

的表达缺失，原因可能是由于 miR-34c 的启动子高甲基化，使用去甲基化制剂，恢复其表达，可能成为治疗结肠癌的新型治疗剂[27]。**但目前关于结肠癌中 miR-34c 与 MUC2 之间的关系并没有报道。** miR-9 似乎通过影响不同基因在不同组织或不同癌症发生过程中实施相反的效应。一方面，它可参与神经发育，另一方面，它也可参与急性白血病[28]、淋巴瘤[29]的发生，并且乳腺癌[30]、宫颈癌[31]、卵巢癌[32]、骨肉瘤[33]、肝癌[33]、胃癌[34]中 miR-9 表达上调与肿瘤进展及不良预后有关，提示其发挥着促癌作用，并且，miR-9 可能通过 3'-UTR 中的结合位点抑制 CDX2 及其下游基因 p21，MUC2 和 TFF3 的表达，促进胃癌细胞增殖。然而有研究表明，在结肠癌[35]及鼻咽癌[36]中，miR-9 表达下调，发挥着抑癌作用**错误！未找到引用源。**。所以，针对前人这些研究，我们可以提出以下问题：结肠癌中 miR-9 与 MUC2 的关系是什么？miR-9 是否可以作为结肠癌的预后评价标志物？总之，针对我们筛选出来的 miR-138、miR-34c、miR-9 相关的研究比较广泛，并已证实均在结肠癌中表达异常。在其他肿瘤性疾病中，三个 miRNA 的表达异常均涉及 MUC2 的表达变化，因此，我们推测 miR-138、miR-34c、miR-9 在结肠癌中也起关键作用，其表达与 MUC2 表达具有相关性，不过**是否具有靶向调控关系**还有待进一步研究确定。

MUC2 在肠道粘膜中的保护作用已经得到充分的证实，其与结肠的预后也密切相关，可作为肿瘤早期诊断的标志物。研究表明，通过检测结肠癌患者血浆二胺氧化酶 DAO、D-乳酸（评价肠道屏障功能的指标）水平，对评价肠道黏膜屏障功能状态特异性高、灵敏度好，可直接反映肠上皮细胞及肠黏膜屏障结构的损伤程度，是监测肠道屏障功能的重要指标。但是，**MUC2 与肠道屏障功能的关系究竟如何？黏液性癌与非黏液性癌中 MUC2 表达相反的调控机制为何？左/右半结肠癌组织中 MUC2 表达不一致的原因为何？MUC2 是否参与结肠癌细胞增殖、侵袭、转移和凋亡等侵袭性生物学行为？MUC2 基因在转录后水平的调控机制如何？**目前这些问题仍未完全阐明。很显然，通过科学方法解释这些问题的必要性及创新性非常突出，对深刻揭示 MUC2 表达异常促进结肠癌恶性表型的分子作用机制具有重要科学意义。

本项目拟通过检测结肠癌组织中 MUC2 的表达情况和结肠癌患者血浆二胺氧化酶 DAO、D-乳酸水平，对相应患者进行生存分析，探讨其与肠道屏障功能的

A2020627

关系，以及在鉴别黏液性与非粘液性癌、左/右半结肠癌以及评价预后方面的贡献。同时，通过一系列体外分子生物学实验，揭示 MUC2 对结肠癌细胞增殖、侵袭、转移等恶性生物学行为的影响，以及 miR-138、miR-34c、miR-9 与 MUC2 的关系，为进一步探索结肠癌发病机制及寻找新的治疗靶点提供新的证据。

3、本项目的创新之处

虽然很早就发现 MUC2 在结肠癌组织中表达异常，但其对结肠癌细胞增殖、侵袭、转移的影响，以及它受哪些靶 miRNA 调控及机制如何，并没有专门的研究，因此，我们首次提出在结肠癌细胞中研究 MUC2 基因转录后水平调控机制，来揭示 MUC2 的功能谱。具体创新点包括以下三个方面：

（1）在研究内容上，本项目率先提出以 MUC2 为中心，研究其与肠道屏障功能（血浆二胺氧化酶 DAO、D-乳酸水平）的相关性，以及 MUC2 在鉴别左/右半结肠癌、黏液/非黏液性癌、评价预后等方面的潜力，并通过一系列细胞功能学实验证明 MUC2 参与结肠癌恶性表型的作用，揭示 MUC2 在结肠癌进程中的功能。最后，我们还将确认 MUC2 转录过程中分别与 miR-138、miR-34c、miR-9 的调控关系，并研究这些 microRNA 在结肠癌细胞增殖、侵袭和转移过程中的作用。

（2）在研究方法上，本项目采取传统生物检测技术，IHC、qRT-PCR 和 Western blot 等相结合研究鉴定 MUC2 在结肠癌中的表达情况；紫外线分光光度计检测结肠癌患者血浆 DAO、D-乳酸水平，双荧光素酶报告基因检测 miR-138、miR-34c、miR-9 与 MUC2 之间是否存在靶向调控关系；通过构建结肠癌小鼠模型，确认 MUC2 对于小鼠成瘤、转移等的影响；并且本项目还特别注重生物实验和生物信息学相结合，通过 RNAi 技术揭示 MUC2 参与结肠癌发病机制的作用机理。

（3）在研究意义上，广东潮汕地区是中国沿海结肠癌高发区，该地区结肠癌的死亡率高，医疗成本投入高，本项目选定地方常发性疾病（结肠癌）为研究对象，解决地方突出的健康问题，使得本项目更具有地方特色。

4、 主要参考文献及出处：

见文末。

二、 研究方案

1、研究目标、研究内容,以及拟解决的关键科学问题

本项目的研究目标

本项目的研究目标是：检测结肠癌患者肠黏膜组织中 MUC2 的表达情况、血

浆二胺氧化酶 DAO、D-乳酸水平，对相应患者进行生存分析，探讨其与肠道屏障功能的关系，以及在鉴别黏液性/非粘液性癌、左/右半结肠癌以及评价预后方面的贡献。同时，通过一系列体外分子生物学实验，揭示 MUC2 对结肠癌细胞增殖、侵袭、转移等恶性生物学行为的影响，探究通过生信手段筛选出来的 miR-138、miR-34c、miR-9 与 MUC2 的关系，为明确结肠癌发病机制及寻找新的治疗靶点提供新的证据。

本项目的研究内容包括以下三部分

研究内容一：MUC2 在结肠癌细胞细胞增殖、凋亡、侵袭和转移过程中的作用。

购买 4 株不同的结肠癌细胞株，分别设置实验组和对照组，qRT-PCR 检测各组细胞 MUC2 基因 mRNA 表达水平。构建并转染 MUC2 干扰质粒，筛选建立稳定细胞株，通过 CCK8 实验、Transwell 实验、划痕实验研究 MUC2 对肠癌细胞增殖、侵袭、迁移的影响。分别瞬时转染 miR-138 类似物/miR-138 抑制物/无关序列质粒、miR-34c-类似物/miR-34c 抑制物/无关序列质粒、miR-9-类似物/miR-9 抑制物/无关序列质粒，Western blot、qRT-PCR 分别检测各细胞株中 MUC2 蛋白及 mRNA 水平表达变化，双荧光素酶报告基因检测上述 microRNA 与 MUC2 之间是否存在靶向调控关系；分析三种 microRNA 对肠癌细胞增殖、凋亡、侵袭和转移的影响。

研究内容二：结肠癌组织中 MUC2 表达情况、血浆 DAO、D-乳酸水平及临床意义。

在本项目前期，收集 126 例结肠癌患者癌组织、癌旁正常组织标本，石蜡包埋处理；收集 30 例对应患者外周血标本，10 例正常患者外周血标本，离心后取上清液冻存。通过免疫组化检测肠黏膜组织中 MUC2 的表达；紫外线分光光度计检测肠癌患者及正常人外周血 DAO、D-乳酸水平，并分析 MUC2 分别与结肠癌患者年龄、性别、肿瘤部位、分型分期、组织学分级、淋巴结转移及预后等临床病理资料的相关性。随访患者术后 DFS、DSS，进行生存分析，评估 MUC2 对于结肠癌患者预后评价的贡献。

研究内容三：结肠癌动物实验验证。

建立结肠癌细胞裸鼠皮下移植瘤模型，观察稳定转染细胞株裸鼠体内成瘤情况，移植瘤组织 HE 染色，观察肿瘤组织形态，免疫组织化学技术检测移植瘤组织中 MUC2 蛋白表达水平的变化。分光光度计检测小鼠血浆 DAO 及 D-乳酸水平。

A2020627

本项目拟解决的关键科学问题

1）明确结肠癌组织中 MUC2 的表达情况以及血浆 DAO、D-乳酸水平，对相应患者进行生存分析，探讨其与肠道屏障功能的关系以及在鉴别黏液性/非粘液性癌、左/右半结肠癌以及评价预后方面的作用。

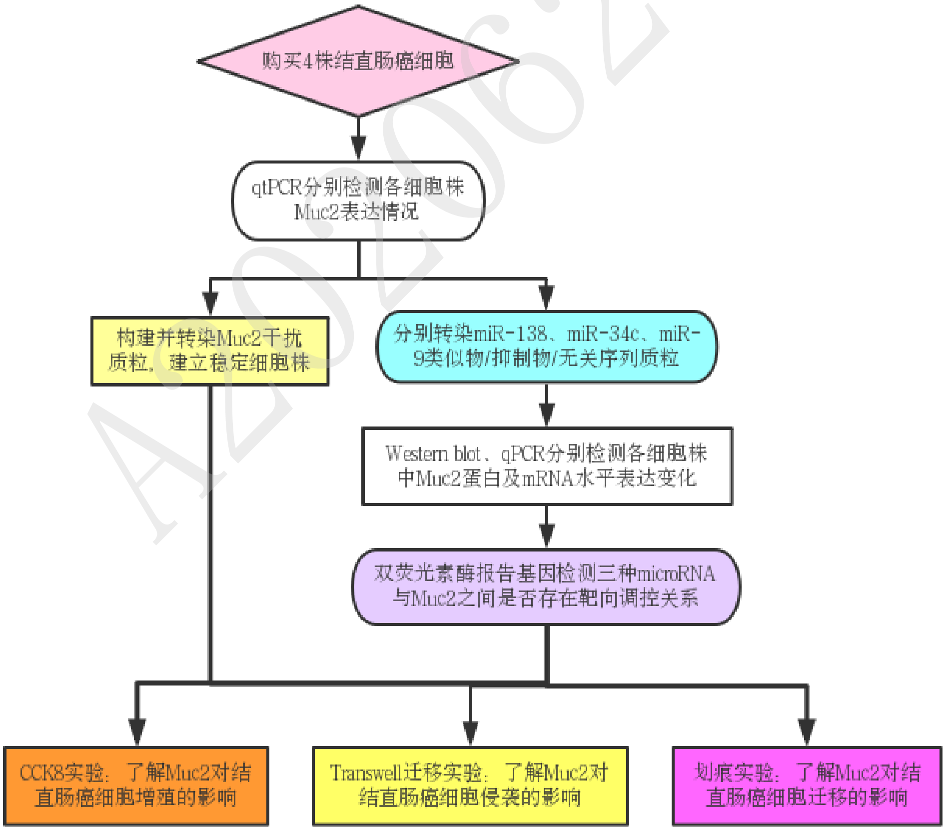
2）研究 MUC2 在结肠癌细胞增殖、侵袭、转移等恶性生物学行为中的作用。

3）揭示 miR-138、miR-34c、miR-9 与 MUC2 的关系及在结肠癌增殖、侵袭、转移等恶性生物学行为中的作用。

2、 拟采取的研究方法、技术路线、实验方案及可行性分析

对应于前述三部分研究内容，本项目的研究方案技术路线，同样包括三部分，概述如下：

研究方案技术路线第一部分：<u>MUC2 及 miR-138、miR-34c、miR-9 在结肠癌细胞细胞增殖、凋亡、侵袭和转移过程中的作用</u>（对应于研究内容二）



A. 用 qRT-PCR 分别检测两组 MUC2 基因 mRNA 水平的表达情况；

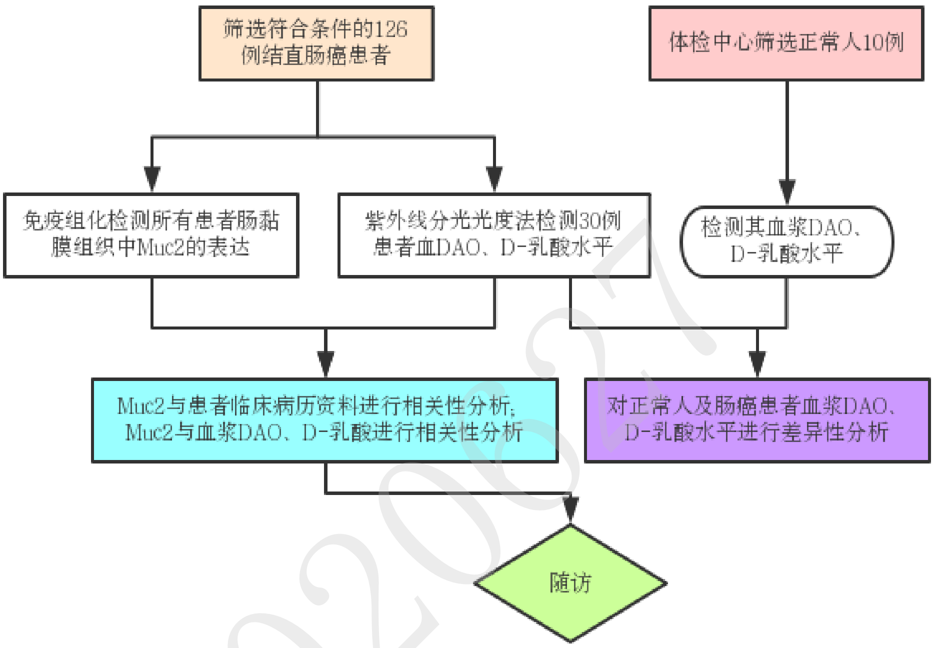
B. 用 Western Blot 分别检测两组 MUC2 蛋白水平的表达情况；

C. 通过 CCK-8 试验检测细胞株的增殖能力；

D. Transwell 试验检测细胞株的侵袭能力；

E. 划痕实验检测细胞株的迁移能力；

研究方案技术路线第二部分：结肠癌组织中 MUC2、血浆 DAO、D-乳酸水平及临床意义（对应于研究内容一）



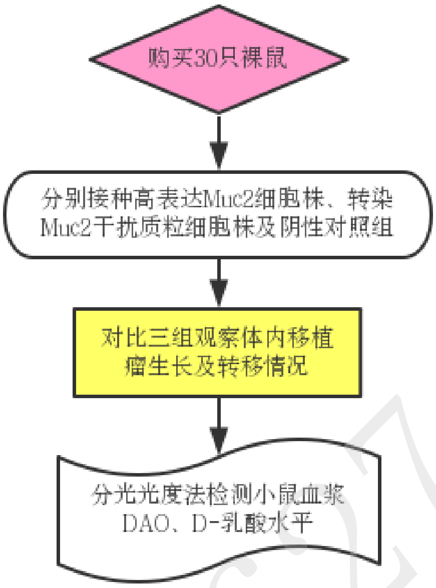
A. 筛选符合条件的患者（所有患者术前病理活检提示腺癌；均未行化学、放射治疗和或分子靶向治疗；均可进行根治性手术；无手术禁忌症），收集手术切除的 126 例结肠癌组织及距肿瘤边缘 5cm 以上近标本切缘处正常结肠组织。所有患者临床资料完整。

B. 采用免疫组织化学技术检测结肠癌组织和癌旁正常组织中 MUC2 的表达情况。紫外线分光光度计检测结肠癌患者及正常人血浆 DAO、D-乳酸水平并与 Muc2 进行。分析患者临床病历资料。

C. 术后随访：术后第 6、12、18、24、36、48、60 个月需要对患者进行胸腹部的 CT 和 CEA 检测，了解有无肠癌复发或转移，对所有患者进行随访检查直到术后 5 年，记录患者无病生存期（DFS）、疾病特异性生存期（DSS）、

肠癌特异性死亡率、肠癌特异性复发率。

研究方案技术路线第三部分：<u>结肠癌动物实验验证。</u>构建动物模型，研究 MUC2 对结肠癌成瘤及转移的影响；并评估肠癌大鼠肠道屏障功能。（对应研究内容三）



A. 选择第二部分得到的高表达 MUC2 细胞株及转染 MUC2 干扰质粒的细胞株，接种裸鼠，皮下成瘤观察移植瘤增殖、转移情况。统计肿瘤成瘤率、测量肿瘤大小、计算淋巴结转移、肝脏及网膜转移、及死亡率的差异；验证 MUC2 对结肠癌发生发展的作用。

B. 应用分光光度法分别检测各组小鼠血浆 DAO、D-乳酸水平，评估其肠道黏膜屏障功能。

本项目的可行性分析及其有关情况说明

<u>可行性分析 1：</u>本项目的研究目的是明确结肠癌中 MUC2 的表达情况，探讨其与肠道屏障功能的关系；同时研究 MUC2 对结肠癌细胞增殖、凋亡、侵袭和转移等生物学行为的影响。该项目在分子、细胞和整体实验动物三个水平上进行实验，设计合理，研究目标明确，研究方法、技术路线、实验方案合理可行。本方案完全可以确保为接下来的各项研究内容的实施提供确切可靠的保障。有关的实验步骤，我们课题组主要参照下列文献进行：

A2020627

[1] Hsu, H.P., et al., Mucin 2 silencing promotes colon cancer metastasis through interleukin-6 signaling. Sci Rep, 2017. 7(1): p. 5823.
[2] Shan, Y.S., et al., *Suppression of mucin 2 promotes interleukin-6 secretion and tumor growth in an orthotopic immune-competent colon cancer animal model.* Oncol Rep, 2014. 32(6): p. 2335-42.
[3] Bu, X., et al., *Suppression of mucin 2 enhances the proliferation and invasion of LS174T human colorectal cancer cells.* Cell Biol Int, 2011. 35(11): p. 1121-9.

<u>可行性分析 2</u>：本研究组一直围绕“结肠癌与肠道屏障”展开研究，先前研究发现，在结肠癌中，构成肠道机械屏障的重要组成成分紧密连接蛋白（Claudin1）参与结肠癌细胞增殖、凋亡、侵袭和转移过程，其表达与肿瘤分化程度、病理分期、淋巴结转移相关，并受 miR-98 的靶向调控，高表达的 miR-98 可通过下调 Claudin1 的表达,从而抑制人结肠癌细胞增殖、迁移、侵袭，诱导人结肠癌细胞凋亡，具体研究论文发表在 Journal of Cellular Biochemistry 上(Zheng,Yi-Feng; Luo,Jie; Gan,Guo-Lian.Overexpression of microRNA - 98 inhibits cell proliferation and promotes cell apoptosis via claudin - 1 in human colorectal carcinoma[J].*J Cell Biochem.*,2019;120（4）:6090-6105.）。本研究组近期完成的另一项研究发现，白介素-17（IL-17）在结肠癌组织中的表达远远高于癌旁组织及正常肠黏膜组织，而通过研究细胞微环境中 IL-17 对细胞株是否有形态及增殖影响，及其对上皮细胞的间质转化（EMT）相关性蛋白表达，我们得出在单纯的 IL-17 微环境下，IL-17 可以作用于肠黏膜上皮细胞实现 EMT，进而促瘤。目前这项研究的相关数据正有序进行分析及形成论文，近期拟投 SCI 期刊。而作为参与肠道黏膜机械屏障另一组成成分的 MUC2 对于结肠癌生物学行为的影响尚不清楚，因此探讨 MUC2 在肠癌发生发展过程中的作用及与肠道黏膜屏障功能损伤的关系成为本研究的重点。该项目在具体的实验研究方案实施中，涉及免疫组织化学技术、紫外线分光光度法、细胞培养、细胞转染、荧光素酶报告基因、CCK8、划痕、侵袭实验、免疫印迹、qRT-PCR、RNAi、建立动物模型等多种实验技术，在本项目组以往的研究中均有应用，技术操作成熟。同时，汕头大学医学院具有多个重点实验室，实验条件及仪器设备

A2020627

已具备，研究梯队搭配合理，技术全面。因此，实验技术和平台可确保实验顺利完成。

可行性分析 3： 大量文献表明，该项目研究中心 MUC2 在结肠癌患者及动物实验中均呈现异常表达，并且更多是体现在组织学层面，然而在分子层面、涉及肠癌发生机制方面鲜有报道。因此本项目提出以 MUC2 为中心，深入到分子、基因水平对肠癌发生机制展开较为深入的研究，是在前人扎实研究基础上进行的新的拓展，是站在巨人肩膀上的新的眺望。本项目的预期结果为：MUC2 在结肠中表达具有组织特异性，具体表现为：黏液性腺癌中表达升高，非黏液性腺癌中表达降低；此外，抑制 MUC2 表达后的细胞株增殖、侵袭、迁移能力均增强，提示 MUC2 在结肠癌发展中发挥抑制肿瘤进展的保护作用。最后 miR-138、miR-34c、miR-9 与 MUC2 之间具有某种调控关系，具体还需实验进一步加以明确。

有关结肠癌组织情况说明：本项目负责人所在工作单位为汕头大学医学院第一附属医院胃肠外科，多年来，科室一直注重胃肠癌患者手术组织标本和血液标本地收集与保存，目前已经建立起庞大的胃癌及结肠癌标本库和详细的临床资料数据库，因此，本项目有充足的结肠癌组织和血液等实验材料保证。

3、年度研究计划及预期研究结果

年度研究计划

本研究拟用 3 年时间完成

2020 年 7 月 至 2021 年 12 月**：完成研究内容一，研究 MUC2 在结肠癌细胞中对细胞增殖、凋亡、侵袭和转移过程中的作用。**体外细胞培养，分别检测其 miRNA 表达水平，构建并转染 MUC2 干扰质粒，通过体外试验明确 MUC2 表达对结肠癌细胞增殖、凋亡、侵袭和转移等生物学行为的影响；再通过转染 miR-138、miR-34c、miR-9 类似物/抑制物/无关序列质粒，明确 MUC2 与三种 miRNA 的关系，及分别对结肠癌细胞增殖、凋亡、侵袭和转移的影响。

2021 年 12 月至 2021 年 06 月 **： 完成研究内容二，结肠癌组织中 MUC2 表达情况及临床意义。**在本项目前期工作基础上，筛选结肠癌（包括 I、II、III、IV 期）组织样本（包括最新的手术切除样本和冷冻保存的样本），初步完善临床样本库。免疫组化检测肠癌组织中 MUC2 的表达水平，同时收集肠癌患者血浆样本，检测其 DAO、D-乳酸水平，评估其肠道黏膜屏障功能变化情况。开始进行术后随访

A2020627

工作。

2021 年 06 月至 2022 年 01 月<u>：完成研究内容三，结肠癌动物实验验证。</u>建立动物模型，研究 MUC2 对结肠癌成瘤及转移的影响；并评估肠癌大鼠肠道屏障功能变化情况。

2022 年 01 月至 2022 年 6 月<u>： 补充实验，完成结题报告。</u>完善结肠癌临床样本库和基础研究数据库，补充相关实验，整理实验数据，分析实验结果，撰写论文。

预期研究成果

在完成以上所述三个年度研究计划基础上，本项目将取得如下主要成果：1）在基因和蛋白水平明确 MUC2 在结肠癌组织中的表达情况；2）进一步探索明确 MUC2 的靶 miRNA，为结肠癌的治疗提供新的支持；3）通过体外细胞培养及建立动物模型，明确 MUC2 在结肠癌成瘤及转移中的作用，以及 MUC2 与肠道黏膜屏障功能损伤的关系，为进一步明确结肠癌的发病机制、寻找新型诊断及治疗靶点及评估预后等方面提供依据。

在上述研究成果基础上，1）发表高水平专业研究论文 2-3 篇，刊登在国内外相关领域核心专业杂志，并提供被 SCI 收录情况的报告；2）培养硕士研究生 2-3 名，并提供他们的毕业论文。

三、 研究条件与基础

1、 已取得的研究工作成绩及与本项目有关的研究工作积累

自 2010 年以来，本项目负责人一直围绕“肠道屏障与结肠癌的关系”开展研究。在此期间，研究发现明确了结肠癌组织中肠道粘膜屏障的组成成分—Claudin1 在蛋白及基因水平的表达情况，并对 Claudin1 参与结肠的成瘤和转移过程进行了初步研究，最后得出：Claudin1 在结肠癌组织中的蛋白及 mRNA 水平表达升高，其原因是由于 miR-98 表达水平下降，对 Claudin1 的靶向抑制作用减弱而导致的，并因此其促癌细胞凋亡、抑制癌细胞增殖的能力减弱，进而参与肠癌致瘤及发展过程。同时还发现 Claudin1 的表达与肿瘤分化程度、病理分期、淋巴结转移相关。该研究已发表于 Journal of Cellular Biochemistry 杂志(Zheng,Yi-Feng; Luo,Jie; Gan,Guo-Lian.Overexpression of microRNA - 98

A2020627

inhibits cell proliferation and promotes cell apoptosis via claudin‐1 in human colorectal carcinoma[J]. *J Cell Biochem.*,2019;120（4）:6090-6105）。

从 2017 年至今，围绕“肠道屏障与结肠癌的关系”，我们亦开展了另外一项研究，主要是研究白介素-17（IL-17）是否参与肠黏膜上皮细胞间质化（EMT），从而参与肿瘤的发生。研究结果表明，IL-17 在结肠癌组织、癌旁组织及正常肠黏膜组织三者中，以结肠癌组织为高表达，癌旁组织次之，正常肠黏膜组织表达最低。再者，通过进一步研究细胞微环境中 IL-17 对细胞株是否有形态及增殖影响，及其对上皮细胞的 EMT 相关性蛋白表达，我们发现在 100ng/ml 最高浓度的时候细胞变化形态最高，100ng/ml 浓度 IL-17 与对照组相比 E-钙黏蛋白明显下调（$P<0.05$），得出在单纯的 IL-17 微环境下，IL-17 可以作用于肠黏膜上皮细胞实现 EMT，进而促瘤。目前这项研究的相关数据正有序进行分析及形成论文，近期拟投 SCI 期刊。

本项目是前期研究的拓展，继续探索**肠道屏障与结肠癌**的关系，前期相关研究工作为本课题的顺利进行奠定了良好的基础。

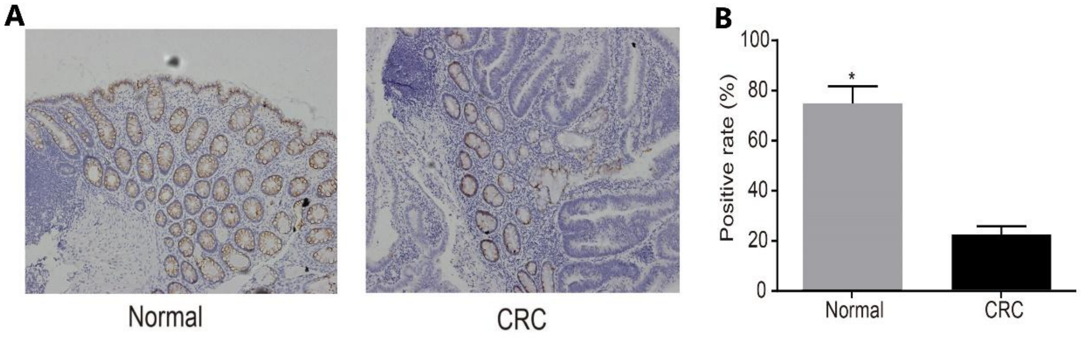
本项目组所在单位为汕头大学医学院第一附属医院胃肠外科，主要病源来自潮汕沿海地区，是结肠癌的高发区，每年行结肠癌手术约 400 台，并配有专门人员负责手术标本及血液标本的收集与保存，同时，建立胃肠癌患者的临床病历资料数据库，以及后期随访数据库。本项目组自 2010 年以来，专门围绕“肠道屏障与结肠癌”进行研究，目前已取得初步成果。在以往长达 8 年的不断研究中，本课题组成功培养了包括本项目负责人在内的多名青年科技人才和专项实验技术人才，同时建立了稳定的系列实验技术平台群，主要包括：免疫组织化学技术、qRT-PCR、WB、流式细胞术、RNAi、动物建模等技术。很显然，以上这些实验技术平台的大部分同样也是本项目研究所需要的，是本项目实施强有力的技术保障。

此外，目前汕头大学医学院第一附属医院依托汕头大学多个重点实验室和研究平台，实验中所需的仪器和技术均可获得支持，这为该研究的顺利开展提供了良好的实验平台。本申请人具有结肠肿瘤方面的基础和临床研究，具有良好的条件和技术力量。

A2020627

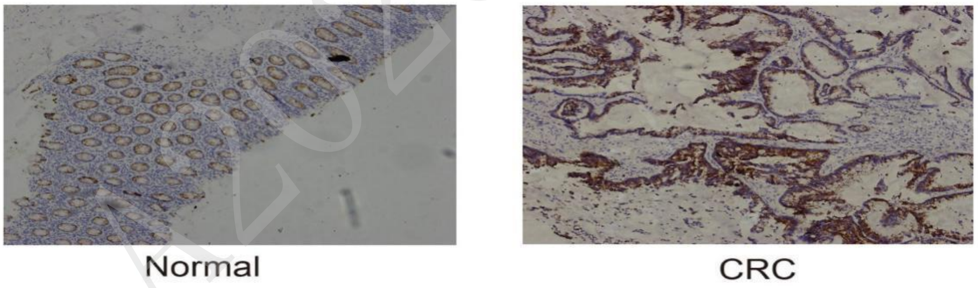
已取得的研究工作成绩，即本项目直接相关的前期实验结果，共包括两个部分：

<u>**与本项目直接相关的前期实验结果第一部分**</u>**：**本项目组利用免疫组织化学技术，发现结肠非黏液腺癌组织中 MUC2 蛋白表达阳性率较正常肠黏膜组织中明显下降，部分结果见下：



A：正常肠黏膜（100 倍）和 CRC（100 倍）组织免疫组织化学检测；B：免疫组化检测正常肠粘膜和 CRC 组织 MUC2 表达阳性率比较（n=124）。

<u>**与本项目直接相关的前期实验结果第二部分**</u>**：**结肠黏液腺癌在结肠癌的发病率非常低下，入组研究的 126 例病例中，仅有 2 例为黏液腺癌，本项目组利用免疫组织化学技术，发现结肠黏液腺癌组织中 MUC2 蛋白表达较正常肠黏膜组织升高，这与非黏液腺癌得出的结果是相反的，结果也印证是既往的实验研究，结果见下：



2、　已具备的实验条件，尚缺少的实验条件和拟解决的途径

汕头大学医学院拥有多个重点实验室。首先，项目依托的汕头大学医学院“长江学者实验室”、“中心实验室”已经具备进行本项目研究所需的全部仪器设备。其中主要包括：Thermo 全自动核酸提取仪、Nanodrop 超微量核酸蛋白测定仪、荧光定量 PCR 仪、普通 PCR 仪、水平电泳槽、聚丙烯酰胺凝胶电泳槽、凝胶成像系统及分析装置、细胞培养室、二氧化碳培养箱、电热式压力灭菌消毒器、荧光发光检测仪、流式细胞仪、凝胶系统、电泳、转模设备、多功能酶标仪、正置荧光显微镜、倒置相差荧光显微镜、各种离心机、摇床、制冰机、分光光度计、

A220627

各种低温冰箱、超纯水系统、超声波细胞破碎仪、超声波清洗器等一些进行分子生物学、细胞生物学和生物医学研究的仪器设备。由此可见，这些实验仪器设备为本项目顺利实施提供了物质保障。

其次，本项目团队在以往的研究中已经成功建立了多种检测技术平台及分析方法，如：HE 染色、免疫组织化学技术、qRT-PCR 检测、Western blot 检测、细胞培养、细胞转染、细胞迁移实验、Transwell 实验、流式细胞术检测、载体构建、双荧光素酶报告基因检测系统、免疫荧光、miRNA 靶基因预测等。可见，这些实验技术检测平台及生物信息学分析方法为本项目研究顺利进行提供了坚实的技术检测和数据分析保障。

此外，本项目组所在科室拥有庞大的临床样本库及完整的临床病历资料数据库，均有专人负责收集、保存及完善，因此，较好地保证了实验样本的质量，同时，尽可能地避免了患者临床资料遗漏，为实验高效、严谨地实施奠定了良好的基础。

然后，本项目申报人近两年已经完成肠粘膜屏障方向的类似实验研究并发表了 1 篇 SCI 论文，为： Zheng,Yi-Feng; Luo,Jie; Gan,Guo-Lian.Overexpression of microRNA‑98 inhibits cell proliferation and promotes cell apoptosis via claudin‑1 in human colorectal carcinoma[J].*J Cell Biochem*.,2019;120（4）:6090-6105（5 年 IF:3.152）。

这些研究不仅与本项目的实施密切相关，而且李威教授还能继续为本项目的研究提供支持和指导，从而提高了本项目顺利实施的可行性

综上所诉，本项目的研究条件充足，可充分保障本项目各项研究内容地顺利开展，汕头大学医学院所拥有的基础实验设施和仪器设备等条件完全能够满足本项目研究的需要。

参考文献：

1. Schreuders, E.H., et al., *Colorectal cancer screening: a global overview of existing programmes*. Gut, 2015. 64(10): gutjnl-2014-309086.

2. Cobo, E.R., et al., MUC2 Mucin and Butyrate Contribute to the Synthesis of the Antimicrobial Peptide Cathelicidin in Response to Entamoeba histolytica- and Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis. Infection & Immunity, 2017. 85(3): IAI.00905-16.

3. Visschedijk, M.C., et al., Pooled Resequencing of 122 Ulcerative Colitis Genes in a Large Dutch Cohort Suggests Population-Specific Associations of Rare Variants inMUC2. Plos One, 2016. 11(8): S570-S571.

A2020627

4. Cobo, E.R., et al., Colonic MUC2 mucin regulates the expression and antimicrobial activity of β-defensin 2. Mucosal Immunology, 2015. 8(6): 1360-1372.
5. Johansson, M.E.V., S.V. Henrik, and G.C. Hansson, *The gastrointestinal mucus system in health and disease.* Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2013. 10(6): 352.
6. Shan, M., et al., Mucus Enhances Gut Homeostasis and Oral Tolerance by Delivering Immunoregulatory Signals. Science, 2013. 342(6157): 447-453.
7. Kasprzak, A., et al., Differential expression of mucin 1 and mucin 2 in colorectal cancer. World Journal of Gastroenterology, 2018.
8. Chao, L., et al., Prognostic Value of MUC2 Expression in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. Gastroenterology Research & Practice, 2018. 2018:1-12.
9. 鲁明良, 何瑾, and 叶卫东, *MUC1 联合 MUC2 在结肠腺瘤及结肠癌中联合表达与临床病理的相关性研究.* 结肠肛门外科, 2014. 20(3): 158-163.
10. Adam, E., et al., Loss of MUC2 expression predicts disease recurrence and poor outcome in colorectal carcinoma. Tumor Biology, 2013. 34(2): 621-628.
11. Yamamoto, H., Y.Q. Bai, and Y. Yuasa, *Homeodomain protein CDX2 regulates goblet-specific MUC2 ja:math gene expression.* Biochemical & Biophysical Research Communications, 2003. 300(4): 813-818.
12. Hanski, C., ., et al., MUC2 gene suppression in human colorectal carcinomas and their metastases: in vitro evidence of the modulatory role of DNA methylation. Laboratory Investigation, 1997. 77(6): 685-95.
13. Yonezawa, S. and E. Sato, Expression of mucin antigens in human cancers and its relationship with malignancy potential. Pathology International, 2010. 47(12): 813-830.
14. Hong, Z., et al., MicroRNA-138 and MicroRNA-25 Down-regulate Mitochondrial CalciumUniporter, Causing the Pulmonary Arterial Hypertension CancerPhenotype. American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine, 2017. 195(4): 515.
15. Chang-Mei, L., et al., MicroRNA-138 and SIRT1 form a mutual negative feedback loop to regulate mammalian axon regeneration. Genes Dev, 2013. 27(13): 1473-1483.
16. Tsukamoto, S., et al., Inhibition of microRNA-138 enhances bone formation in multiple myeloma bone marrow niche. Leukemia, 2018: 1.
17. Xia, L., et al., MiR-138 suppressed nasopharyngeal carcinoma growth and tumorigenesis by targeting the CCND1 oncogene. Cell Cycle, 2012. 11(13): 2495-2506.
18. Xiqiang, L., et al., MicroRNA-138 suppresses invasion and promotes apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. Cancer Letters, 2009. 286(2): 217-222.
19. Liang, Z., et al., *CREPT regulated by miR-138 promotes breast cancer progression.* Biochem Biophys Res Commun, 2017. 493(1): 263.
20. Valmiki, S., V. Ahuja, and J. Paul, *MicroRNA exhibit altered expression in the inflamed colonic mucosa of ulcerative colitis patients.* World Journal of Gastroenterology, 2017. 23(29): 5324-5332.
21. Yang, Q., et al., H19 promotes the migration and invasion of colon cancer by sponging miR-138 to upregulate the expression of HMGA1. International Journal of Oncology, 2017. 50(5): 1801.
A2020627

22. Yonghua, B., et al., MicroRNA profiling in Muc2 knockout mice of colitis-associated cancer model reveals epigenetic alterations during chronic colitis malignant transformation. Plos One, 2014. 9(6): e99132.
23. Lan, V.T.T., et al., Methylation profiles of MIR34 gene family in Vietnamese patients suffering from breast and lung cancers. Molecular Medicine Reports, 2018. 18(2).
24. Qing, J., et al., MicroRNA miR-34 inhibits human pancreatic cancer tumor-initiating cells. Plos One, 2009. 4(8): e6816.
25. Ji, Q., et al., Restoration of tumor suppressor miR-34 inhibits human p53-mutant gastric cancer tumorspheres. Bmc Cancer, 2008. 8(1): 266-266.
26. Zhou, X., et al., Helicobacter pylori infection related long noncoding RNA (lncRNA) AF147447 inhibits gastric cancer proliferation and invasion by targeting MUC2 and up-regulating miR-34c. Oncotarget, 2016. 7(50): 82770.
27. Roy, S., et al., Expression of miR-34 is lost in colon cancer which can be re-expressed by a novel agent CDF. Journal of Hematology & Oncology, 2012. 5(1): 58-58.
28. Paula, R.O., et al., Deregulation of FGFR1 and CDK6 oncogenic pathways in acute lymphoblastic leukaemia harbouring epigenetic modifications of the MIR9 family. British Journal of Haematology, 2011. 155(1): 73-83.
29. Dhiab, M.B., et al., Investigation of miR9-1, miR9-2 and miR9-3 Methylation in Hodgkin Lymphoma. Pathobiology, 2015. 82(5): 195-202.
30. Barbano, R., et al., Stepwise analysis of MIR9 loci identifies miR-9-5p to be involved in Oestrogen regulated pathways in breast cancer patients. Scientific Reports, 2017. 7: 45283.
31. Park, S., et al., MiR-9, miR-21, and miR-155 as potential biomarkers for HPV positive and negative cervical cancer. Bmc Cancer, 2017. 17(1): 658.
32. Sun, C., et al., miR-9 Regulation of BRCA1 and Ovarian Cancer Sensitivity to Cisplatin and PARP Inhibition. J Natl Cancer Inst, 2013. 105(22): 1750-1758.
33. Farazi, T.A., et al., *miRNAs in human cancer.* Journal of Pathology, 2015. 223(2): 102-115.
34. Pichayanoot, R., et al., *MiR-9 downregulates CDX2 expression in gastric cancer cells.* International Journal of Cancer, 2011. 129(11): 2611-2620.
35. Lina, C., et al., MiR-9, -31, and -182 deregulation promote proliferation and tumor cell survival in colon cancer. Neoplasia, 2012. 14(9): 868,IN20-879,IN21.
36. Lu, J., et al., Exosomal miR-9 inhibits angiogenesis by targeting MDK and regulating PDK/AKT pathway in nasopharyngeal carcinoma. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research Cr, 2018. 37(1): 147-152.
A2020627

项目收支明细表

(1995/1/1 至 2020/3/19)

项目编号 财编登峰202003-10　　项目名称 光学/光声成像下在体监测谷胱甘肽过氧化物酶GPX3对三阴性乳腺癌治疗作用的分子机制研究

任务来源　　负责人 吴华涛

序号	日期	摘要	收入	付出	结余金额	经手人
1		期初余额			0	
2	2020/3/19 9	根据汕医一附【2019】70号文件，从登峰计划资金中发放第一年支撑项目科研专项计划立项经费	50000		50000	
合计			50000		50000	