



# 上海市第四人民医院

## 学科助推计划

### 项目申请书

项目类别	一般项目
项目名称	脂质代谢组学在胰腺恶性肿瘤标志物 筛选中的应用研究
建设周期	2019.8.1-2021.7.31
申请人	周凌
科室	普外科
申请时间	2019.06.25

上海市第四人民医院

二〇一九年制

## 填报说明

一、申请书各项内容，要实事求是、逐条认真填写。表达要明确、严谨，字迹要清晰易辨。外来语要同时用原文和中文表达。第一次出现的缩写词，须注出全称。

二、申请书打印时用 A4 复印纸，建议双面打印，于左侧装订成册。从“立项依据”起按照内容要求逐条填写，自行加页。一式 2 份，经所在科室审查并签署意见后，送到科教科参加评审，同时上报电子版。

三、简表栏目填写要求：

1、凡选择性栏目，在相应提示符 A、B、C 前打勾。

2、项目名称——应确切反映研究内容和范围，建议不超过 20 个汉字（包括标点符号）。

3、申请金额——以万元为单位，用阿拉伯数字表示，注意小数点。

4、项目组主要成员——本人应在申请书上亲自签名。

四、合作单位要求：项目成员中所有非上海市第四人民医院所属人员即视为外单位人员，需要加盖合作公章。

五、项目管理遵照《上海市第四人民医院学科助推计划实施办法》执行。

## 一、简表

研究项目	类别	<input checked="" type="checkbox"/> A.科研助推计划项目 <input type="checkbox"/> C.人才助推计划项目 <input type="checkbox"/> B.临床新技术、新方法应用计划项目				
	名称	脂质代谢组学在胰腺恶性肿瘤标志物筛选中的应用研究				
	起止年月	2019年 8月 1日至 2021年 7月 31日				
	申请总金额	5万元		其中 医院资助	5万元	
			其他资助	0万元		
申请人	姓名	周凌	年龄	43	政治面貌	党员
	职称/职务		副主任医师			
	学历	本科	学位	<input type="checkbox"/> A.博士 <input checked="" type="checkbox"/> B. 硕士 <input type="checkbox"/> C.学士	手机	
	所在科室	普外科		电子邮箱		
项目组成员	姓名	单位	科室	职称	项目分工	签字
	周凌	上海市第四人民医院	普外科	副主任	课题整体设计及指导	
	俞华	上海市第四人民医院	普外科	主治	病例收集	
	朱惠胤	上海市第四人民医院	普外科	主治	样本采集及制备	
	程明	上海市第四人民医院	普外科	住院	数据分析	
	周德华	上海市第四人民医院	普外科	住院	质谱检测	
	穆迪	上海市第四人民医院	检验科	住院	基因芯片 PCR	
	总人数	高级	中级	初级	博士生	硕士生
6	1	2	3	0	6	

## 二、项目摘要

胰腺癌是一种高度恶性肿瘤，临床上尚缺乏早期诊断胰腺癌的特异性指标。脂质代谢组学近年来成为肿瘤标志物的研究及应用的热点，可用于筛选新的肿瘤生物标志物。本课题组前期研究发现，胰腺癌患者具有特定的血脂组血浆特征，其磷脂酰乙醇胺（PE-O 与 PE-P）及甘油磷脂酸（phosphatidic acid,PA）循环水平显著下降，上述研究表明胰腺的脂类代谢与胰腺癌的发病有着密切关系。本研究将在此基础上，进一步扩大样本量；同时检测胰腺癌脂质代谢基因，初步探讨脂质代谢通路的相关机制，为胰腺癌的早期诊断和治疗提供候选标记物；为今后进一步研究胰腺癌脂肪代谢机制做好前期工作。

## 三、立项依据与研究内容

(一) 项目的立项依据 (研究意义、国内外科学技术状况, 需结合学科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)

### 【研究意义】

胰腺癌是一种高度恶性肿瘤, 起病隐匿, 进展迅速, 预后较差, 多数患者发现时已处于晚期, 失去手术的机会, 只有 20% 的患者能得到手术机会, 其 5 年生存率不到 5%<sup>[1]</sup>。目前, 临床上尚缺乏早期诊断胰腺癌的特异性指标。传统的辅助检查, 如 CA199, CA125, CEA, 增强 CT 以及 K-ras 突变并不能在胰腺癌的早期诊断中起重要作用。虽然已有大量的研究集中在寻找新的 DNA、RNA 和基于代谢组学的生物标志物, 用于胰腺癌的早期诊断、监测和预后评估<sup>[2, 3]</sup>。但目前仍未发现一种简单而可靠地用于胰腺癌诊断并能够实现无创筛查的血清标志物。

“代谢组学”近年来在肿瘤发病机制以及肿瘤标志物的研究及应用中成为热点。脂质组学作为代谢组学的一个重要分支, 适用于临床疾病的早期诊断或预警。Jiapei Lv 等<sup>[4]</sup>在肺癌的研究中发现, 肺癌亚型中脂质组学特征的异质性具有早期诊断的独特价值。Lu 等<sup>[5]</sup>研究发现特定早期妊娠中期脂质生物标志物可以独立于母亲年龄和 BMI 预测母亲妊娠期糖尿病状态, 可能增强基于风险因素的筛查。Stegemann C 等<sup>[6]</sup>研究发现具有低碳数和双键含量的 TAG 和 CE, 包括 TAG (54:2) 和 CE (16:1), 以及 PE (36:5) 是心血管疾病研究具有最强预测价值的脂质物种; 在传统危险因素之上考虑这 3 种脂质物种可以改善风险歧视和心血管疾病的分类。但是, 目前尚缺乏诊断早期胰腺癌的的脂质组学研究。

课题组临床工作中发现, 胰腺癌的起病隐匿, 早期症状不典型, 临床就诊时大部分患者已处于中晚期。此时诊断治疗, 多通过影像学检查如超声、CT、MRI 等。但影像学检查不具有成本效益, 并且不能将胰腺癌与形成慢性胰腺炎的良性胰腺疾病区分开。此外, 在不必要的重复计算机断层扫描 (CT) 扫描期间暴露于辐射也可能增加恶性肿瘤的风险。内窥镜检查不适合筛查,

因为它们的吞吐量低，并发症风险高。因此，迫切需要一种新的准确、安全、方便，并且具有高通量的，能用于一般人群的胰腺癌筛查和诊断方法。

脂质代谢组学通过血清学检测，能适用于早期普查人群，若能筛选出特异性胰腺癌脂质代谢指标将极大提高患者的手术切除率及预后，具有极高的经济效益和社会效益。因此如何使用脂质代谢组学的技术方法寻找胰腺癌的早期特异性肿瘤标志物，以及阐明该生物指标与胰腺癌脂肪代谢通路的关系，成为本课题组迫切需要解决的问题。

### 【国内外研究现状及发展动态趋势】

胰腺癌是一种高度恶性的消化系统肿瘤，近年来其发病率和病死率均有升高趋势。美国癌症协会最新统计数据表明，2018 年全美新发胰腺癌病例数预计为 55440 例，死亡病例数预计为 44330 例，已超越乳腺癌，居恶性肿瘤相关病死率第 3 位<sup>[7]</sup>。2015 年国内统计数据表明胰腺癌病死率居第 6 位<sup>[8]</sup>。虽然近年来胰腺癌的诊疗技术取得了较大进步，但其预后并未显著改善，5 年生存率仍在 8% 左右<sup>[7]</sup>，主要原因是大多数患者确诊时已属晚期，失去了手术切除机会。因此，如何提高胰腺癌的早期诊断率，通过早期诊断、早期治疗改善预后，是本课题组研究的目标。

“代谢组学”的概念是 Nicholson 等在 1999 年率先提出的。相对于基因组学、转录组学以及蛋白质组学，代谢组学更关注生物体的表型，因此也是肿瘤潜在生物标志物筛选中最有前景的发展方向。脂质组学是其中一个重要分支。通过研究脂质提取物能获得脂质组的信息，了解其在特定生理病理状态下脂质的整体变化。在 20 多年前，脂质组学的重要性，尤其是在研究疾病方面的重要性已经引起了人们的关注。通过测定细胞内脂质成分的变化、脂质分子的动态代谢以及脂质与蛋白质的相互作用，使人们对许多疾病有了新的认识。

Giskeodegard, G.F 等<sup>[9]</sup>研究发现通过不同的代谢组学测量技术对血清和血浆样品进行联合分析，成功区分了前列腺癌和良性前列腺增生。研究结果表明，与良性前列腺增生相比，酰基肉碱，甘油磷脂的变化是前列腺癌的标志物。Nagahashi, M 等<sup>[10]</sup>研究乳腺癌和正常乳腺组织中神经酰胺及其代谢物

的水平，证明乳腺癌组织中的鞘脂水平通常高于正常乳腺组织，表明鞘脂在人类患者的乳腺癌进展中起重要作用。Okegawa, T等<sup>[11]</sup>使用代谢组学分析和组织切片示踪研究来证明人类原发性肾肿瘤的不同部分具有不同的代谢特征和药物敏感性，结果发现在肾癌切片中丙酮酸水平升高；进一步研究发现丙酮酸刺激了原发性肾癌细胞的生长，丙酮酸转运蛋白的药理学抑制减缓了肾肿瘤的生长；提示丙酮酸代谢可能促进肾癌的发展。Shen, S等<sup>[12]</sup>在结直肠癌患者与健康患者对照的脂质代谢组学研究中，鉴定出64种差异性脂质代谢产物，其中磷脂酰甘油（34:0），鞘磷脂（42:2），神经酰胺（44:5），溶血磷脂酰胆碱（18:3），溶血磷脂酰胆碱（18:2），磷脂酰乙醇胺（O-36:3），磷脂酰乙醇胺（O-38:3）最终被提出作为潜在的生物标志物。Marien<sup>[13]</sup>等在小细胞肺癌患者的磷脂种类研究中发现，磷脂酰丝氨酸（PS）在非小细胞肺癌患者的癌组织中显著增加。国内中山医院王向东团队<sup>[14]</sup>研究首次发现，肺癌患者的磷脂酰丝氨酸（PS）和溶血性磷脂酰丝氨酸（lysoPS）循环水平显著增加，而溶血乙醇胺甘油磷脂（lysoPE）和乙醇胺甘油磷脂（PE）则下降。表明循环中的肺癌特异性和亚型特异性脂质体对于理解全身代谢的机制和鉴定诊断性生物标志物和治疗靶标是重要的。Kobayashi, T<sup>[15]</sup>等开发了基于血清代谢组学的胰腺癌诊断模型,相比传统肿瘤标志物有更高的准确性。由此可见，脂质代谢组学能作为一种可行的方法来监测癌症的预后，能成为诊断和治疗的新的癌症生物标志物。

胰腺是体内重要的脂类代谢器官，胰脂肪酶是将膳食脂肪水解成单甘油酯和游离脂肪酸的主要脂肪酶,对脂质组学的研究可协助了解胰腺功能的变化。有研究发现，用脂类组学的分析方法发现花生四烯酸、溶血磷脂酰胆碱、PC(34:2)、PE (26:0)在胰腺癌早期患者血浆中的浓度升高<sup>[16]</sup>，由于胰腺癌细胞增殖需要脂类的代谢参与，因此检测血浆中该类脂类含量对胰腺癌早期诊断可能有所帮助。在鞘脂类研究中通过定量分析胰腺癌细胞和血液标本，亚组分析显示：与无淋巴结转移的胰腺癌患者或胰腺炎患者相比，淋巴结转移阳性患者的神经酰胺类（C16:0 和 C24:1）有较高水平。同时还发现，神经酰胺代谢产物，包括磷酸化（鞘氨醇，鞘氨醇-1-磷酸）在血浆中升高，表明鞘脂类代谢改变与晚期胰腺癌相关，评估血浆或组织的鞘脂类可能在临床上用于



### 【拟解决关键问题】

本课题组前期研究发现胰腺癌患者具有特定的血脂组血浆特征，其磷脂酰乙醇胺（PE-O 与 PE-P）及甘油磷脂酸循环水平显著下降，拟以前期研究为基础，利用基于超高效液相色谱-质谱联用技术(Ultra-performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry,UPLC-MS)脂质代谢分析，研究健康个体和胰腺癌患者相互之间的脂质代谢差异，以期发现潜在的用于胰腺癌早期诊断的生物标志物；同时通过脂质代谢基因的检测，初步探讨胰腺癌脂质代谢通路的机制，以利于今后进一步研究。

### 【参考文献】

- [1] Kindler, H.L., A Glimmer of Hope for Pancreatic Cancer. *N Engl J Med*, 2018. 379(25): p. 2463-2464.
- [2] Ryan, D.P., T.S. Hong and N. Bardeesy, Pancreatic adenocarcinoma. *N Engl J Med*, 2014. 371(22): p. 2140-1.
- [3] Wolfgang, C.L., et al., Recent progress in pancreatic cancer. *CA Cancer J Clin*, 2013. 63(5): p. 318-48.
- [4] Lv, J., et al., Heterogeneity of lipidomic profiles among lung cancer subtypes of patients. *J Cell Mol Med*, 2018. 22(10): p. 5155-5159.
- [5] Lu, L., et al., An Unbiased Lipidomics Approach Identifies Early Second Trimester Lipids Predictive of Maternal Glycemic Traits and Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 2016. 39(12): p. 2232-2239.
- [6] Stegemann, C., et al., Lipidomics profiling and risk of cardiovascular disease in the prospective population-based Bruneck study. *Circulation*, 2014. 129(18): p. 1821-31.
- [7] Siegel R L, Miller K D, Jemal; A Cancer Statistics, 2019[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68: 7-30.
- [8] 胰腺癌的早期诊断, 吕翼, 魏若征, 吴河水; 《临床急诊杂志》, 2018, 19(3), 149-151
- [9] Giskeodegard, G.F., et al., Metabolic markers in blood can separate prostate cancer from benign prostatic hyperplasia. *Br J Cancer*, 2015. 113(12): p. 1712-9.
- [10] Nagahashi, M., et al., High levels of sphingolipids in human breast cancer. *J Surg Res*, 2016. 204(2): p. 435-444.
- [11] Okegawa, T., et al., Intratumor Heterogeneity in Primary Kidney Cancer Revealed by Metabolic Profiling of Multiple Spatially Separated Samples within Tumors. *EBioMedicine*, 2017. 19: p. 31-38.
- [12] Shen, S., et al., A plasma lipidomics strategy reveals perturbed lipid metabolic pathways and potential lipid biomarkers of human colorectal cancer. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2017. 1068-1069: p. 41-48.
- [13] Marien, E., et al., Non-small cell lung cancer is characterized by dramatic changes in

phospholipid profiles. Int J Cancer, 2015. 137(7): p. 1539-48.

[14].Lv, J., et al., Heterogeneity of lipidomic profiles among lung cancer subtypes of patients. J Cell Mol Med, 2018. 22(10): p. 5155-5159.

[15] Kobayashi, T., et al., A novel serum metabolomics-based diagnostic approach to pancreatic cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2013. 22(4): p. 571-9.

[16] Urayama S, Zou W, Brooks K, et al. Comprehensive mass spectrometry based metabolic profiling of blood plasma reveals potent discriminatory classifiers of pancreatic cancer. Rapid Commun Mass Spectrom[J],2010,24(5):613-620.

[17] Jiang Y, DiVittore NA, Young MM, et al. Altered sphingolipid metabolism in patients with metastatic pancreatic cancer[J]. Biomolecules,2013,3(3):435-448.

## **(二) 项目的研究内容、研究目标，以及拟解决的关键科学技术问题**

### **【研究内容】**

- 1 胰腺癌患者与正常对照血清脂质代谢检测，筛查差异性脂质代谢产物。
- 2 胰腺癌病理组织和癌旁组织检测差异性脂质代谢基因。
- 3 使用大数据分析差异基因和临床预后的关系，筛选出临床有意义的基因及代谢分子用于进一步研究。

### **【研究目标】**

1、本研究的目的是利用超高效液相色谱-质谱（UPLC-MS）技术进行脂质代谢产物分析，同时使用脂质相关基因表达 PCR 芯片检测脂质代谢基因，筛选得到胰腺癌相关差异性的脂质代谢产物及脂质代谢基因。

2、初步探讨差异性脂质代谢产物与胰腺癌脂肪代谢通路的关系及其与临床预后关系，用以筛选临床肿瘤生物标记。

### **【拟解决的关键科学问题】**

- 1、从脂质代谢组学的角度，初步探索胰腺癌脂质代谢产物与脂肪代谢通路的关系，是本项目拟解决的一个关键科学问题。
- 2、利用大数据分析，在差异性表达的胰腺癌脂质代谢产物中筛出特异性的指标，用于后期进一步分子机制的研究，以期成为临床候选肿瘤标志物之一，是本项目拟解决的另一个关键科学问题。

## 四、研究方案

(一) 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)

### 【研究方法】

1、胰腺癌患者与正常对照血清脂质代谢检测，筛查差异性脂质代谢产物。

1) 样品采集及制备。采集 2019 年 9 月-2020 年 12 月胰腺癌手术患者 20 例及 10 例健康体检对照的血样按照脂质代谢组学要求进行制备。

2) 制备好的样本，使用超高效液相色谱-质谱仪 (UPLC-MS) 进行检测分析。

3) 数据分析，使用 metaboanalyst 软件，进行模式判别分析，使用主成份分析 PCA 及正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA) 寻找潜在差异化合物。

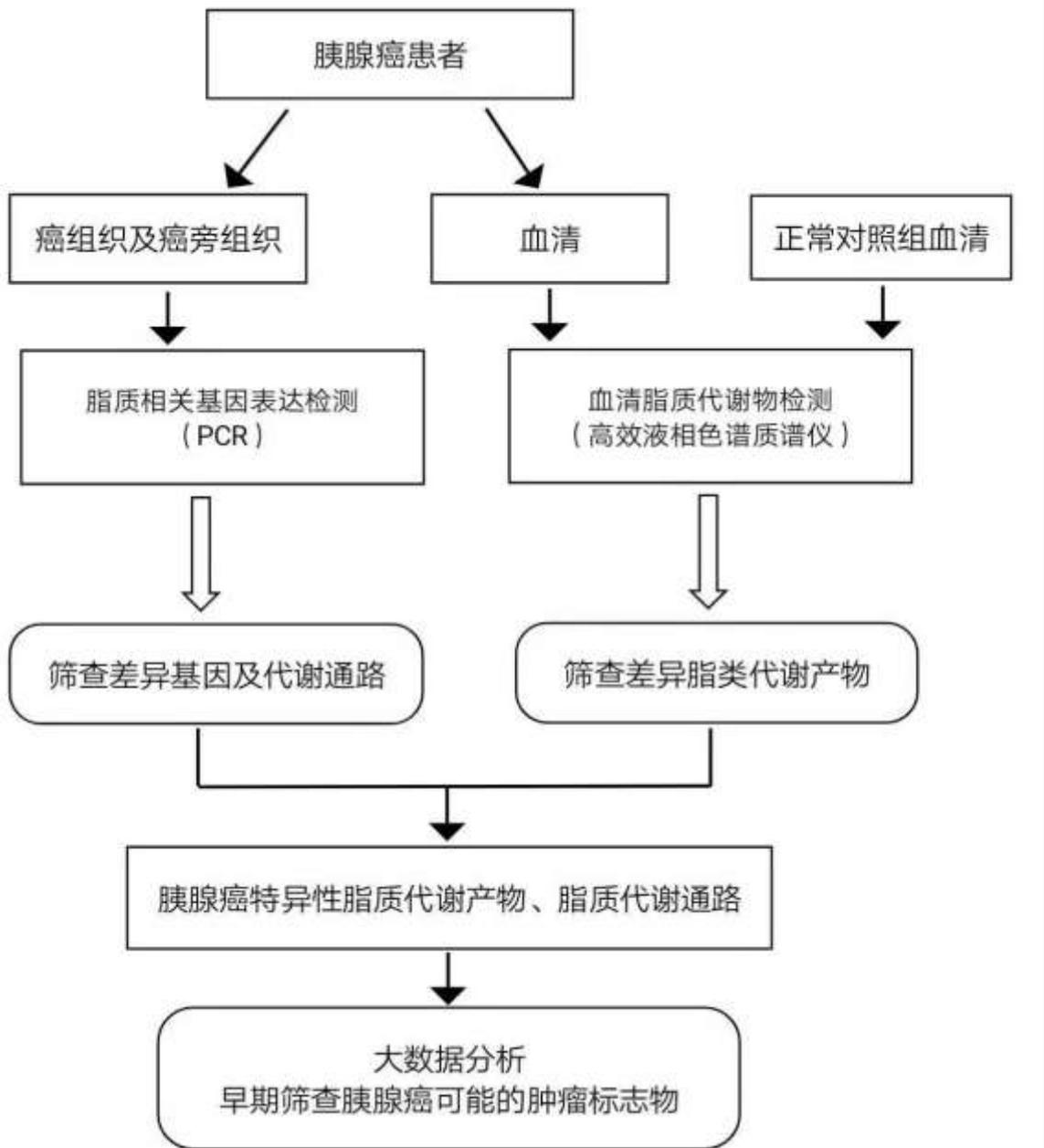
2、胰腺癌病理组织和癌旁组织检测差异性脂质代谢基因。

1) 样本采集及制备。采集 2019 年 9 月-2020 年 12 月胰腺癌手术患者 20 例，选取癌及癌旁冰冻组织提取 RNA。

2) 使用脂质相关基因表达 PCR 芯片检测 (荧光染料法) 检测脂肪代谢基因，寻找差异基因代谢通路。

3、使用大数据分析差异基因和临床预后的关系，筛选出临床有意义的基因及代谢分子用于进一步研究。

### 【技术路线】



技术路线图：脂质代谢组学在胰腺恶性肿瘤标志物筛选中的应用研究

### 【关键技术】

#### 1. 质谱分析

1) 所有血样采集于患者清晨空腹状态下，每个研究对象采集静脉血 3ml 置于 EDTA 抗凝采血管中，采集后于 4℃ 条件下 3000r/min 离心 10 分钟，吸取上清(血浆)，立即于-80℃ 冰箱内保存备用。手术患者切除标本，取癌及癌旁

组织 200ug。

2) 样品处理: 血浆样品检测前于冰上解冻, 取 100ul 血浆样品, 加入 300ul 4℃ 预冷的乙腈, 涡旋 5min 混匀, 于 4℃ 条件下 13000r/min 离心 10 分钟, 取上清随机进样分析。

3) 质控( Quality control, QC) 样本的制备: 从所有血浆样品中各吸取 10ul, 涡旋 5min 混匀后, 按照上述“样品处理”方法进行 QC 样品前处理。为保证数据的可靠性, QC 样本穿插在所有样本数据采集过程中, 每 9 个样本插入 1 个 QC 样本。

4) 色谱条件 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 柱 (100mm\*2.1mm,1.8um); 流动相: A 为乙腈, B 为 0.1% 甲酸水。梯度洗脱程序: 0-1.0min, 5% A; 9.0-15.0min, 58% A; 15.0-18.0min, 80%-100% A; 18.0-22.0min, 100% A; 22.0-25.0min, 5% A; 流速 0.2ml/min, 进样量 5ul; 柱温 40 摄氏度。

5) 质谱条件采用可加热的电喷雾离子源( HESI) , 离子源温度 350℃, 辅助气温度 300 ℃, 辅助气流速 10ul/min, 离子传输管温度 320℃; 正离子模式: 鞘气流速 40ul/min, 喷雾电压 3.5kV; 负离子模式: 鞘气流速 38ul/min, 喷雾电压 2.8kV。质谱分析扫描模式: Full scan/dd-MS2, 扫描范围 m/z80.00-1200.00, 二级质谱分辨率为 17500, 质荷比窗口宽度为 2, 碰撞能梯度为 20、30、40eV。

6) 将获得的原始数据文件导入操作软件进行峰识别、峰对齐、基线校正及峰面积归一化等前处理, 最后输出包含碎片离子信息的数据矩阵。对获得的数据矩阵中的缺失值使用 80% 去值原则进行处理。之后将其导入多变量统计软件 SIMCA-P 13.0 进行模式判别分析。根据正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA) 得到的变量权重值 (Variable important in projection, VIP) 筛选 VIP > 1 的化合物, 并结合 SPSS 20.0 进行非参数检验, 进一步筛选满足 p<0.05 的变量。将同时满足 VIP>1 和 p<0.05 的变量作为潜在的差异化合物, 将其二级质谱与网络数据库中的谱图进行比对, 从而对差异化合物进行结构确证。数据库主要包括: Metlin ( <http://metlin.scripps.edu/> ); Human Metabolite Database ( <http://www.hmdb.ca/> ); Massbank ( <http://www.massbank.jp/> ); KEGG ( <http://www.kegg.jp/> )。

## 2. 脂质基因检测

### 2.1 提取 RNA

- 1) 组织样本液氮急冻后，置入研钵体中研磨成粉末放在无 RNA 酶的离心管中，每 50-100mg 组织加 1mL 预冷的 Trizol 试剂，在离心管中加入 200 $\mu$ L 氯仿，充分振荡混匀，冰浴 5 分钟，4 $^{\circ}$ C 12000r/min，离心 15min。
- 2) 取上面无色水相至另一新的离心管中，加入 500 $\mu$ L 异丙醇，混匀，室温放置 10 分钟，然后在 12000r/min，4 $^{\circ}$ C，离心 15 分钟。
- 3) 弃去上清，RNA 即沉于管底，加入 500 $\mu$ L DEPC 处理过的水配制的 75% 乙醇，温和振荡离心管，悬浮沉淀；7500r/min，4 $^{\circ}$ C，离心 3 分钟。
- 4) 弃去上清，室温晾干，加入用 20 $\mu$ L 经 DEPC 处理过的水，在 60 $^{\circ}$ C 水浴环境中溶解 RNA 样品，检测 RNA 的浓度。

### 2.2 RNA 浓度及纯度测定

- 1) 取 1 $\mu$ L RNAase-free ddH<sub>2</sub>O 对 NanoDrop 进行调零，后取 1 $\mu$ L RNA 溶液进行 RNA 浓度和纯度测定。

### 2.3 测 RNA 的 RIN 值

- 1) 把 550 $\mu$ L 的 RNA6000 的 Nano 胶放到旋转过滤器中，把旋转过滤器中在室温中离心，1500g，10 分钟，把 65 $\mu$ L 的过滤后的胶放在 0.5ml 的无 RNase 的离心管中。
- 2) 让 RNA6000 Nano 浓缩染料在室温下平衡 30 分钟。
- 3) 涡旋 RNA6000 Nano 浓缩染料 10 秒，涡旋后加 1 $\mu$ L 的染料放在 65 $\mu$ L 的过滤后的凝胶中，涡旋后，把管子在室温下离心，13000g，10 分钟。
- 4) 把 RNA6000 Nano 芯片放在芯片台里，吸 9.0 $\mu$ L 的胶和染料混合物，放在芯片中的 G 位置。
- 5) 确保活塞在 1ml 的位置上，然后按住活塞到芯片上，等 30 秒，然后松开芯片，等待 5 秒，然后再把活塞拽回到 1ml 的位置。
- 6) 打开芯片，在 G 位置上吸取 9 $\mu$ L 的胶-染料混合物。
- 7) 吸取 5 $\mu$ L 的 RNA 6000 Nano marker，放在所有的样品中，每个样品中吸取 1 $\mu$ L 的样品，然后把 1 $\mu$ L 的 Marker 放在样品中。
- 8) 把芯片水平放在 IKA 涡旋器中涡旋，2400rpm，1 分钟。

9) 启动 Agilent 2100 分析器运行 5 分钟。

## 2.4 逆转录

1) 取出已抽提的总 RNA, 应用 PrimeScript RT Master Mix 试剂盒将 RNA 逆转录成 cDNA。10 $\mu$ l 反应体系中包含 500ng 总 RNA、2 $\mu$ l 反转录酶、RNase free 水补至 10 $\mu$ l。反应条件如下: 37 $^{\circ}$ C 15min, 85 $^{\circ}$ C 5min。合成的 cDNA 保存于-20 $^{\circ}$ C。

## 2.5 qRT-PCR

1) 在离心管中加入各组分: 2 $\times$  QPCR MIX (10 $\mu$ l)

Forward Primer (0.4 $\mu$ l)

Reverse Primer (0.4 $\mu$ l)

模板 cDNA (2 $\mu$ l)

ddH<sub>2</sub>O (7.2 $\mu$ l)

共 20 $\mu$ l

2) 照程序设置进行 RT-PCR 反应, 预变性 95 $^{\circ}$ C, 3min, 一个循环; 变性 95 $^{\circ}$ C, 3 秒, 退火 60 $^{\circ}$ C, 30 秒, 延伸 72 $^{\circ}$ C, 10 秒, 共 40 个循环。对于每个 cDNA 样本, 要同时扩增目的基因和内参基因 GAPDH, 每个样本做 3 个复孔以减小系统和人为的操作误差, 同时设置不加模板的空白对照以确定体系没有污染。

反应结束后, 通过比较目的基因与 GAPDH 基因的 Ct 值, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算实验组和对照组之间基因表达量的差异, 数据以 Mean  $\pm$  SEM 形式表示, 通过 Student's t 检验计算 p 值, \* p<0.05 被认为有统计学意义。

## 2.6 高通量转录组测序

所得组织在干冰保存条件下, 送往金维智公司进行高通量转录组测序 (Transcriptome sequencing)。转录组是特定细胞在某一功能状态下所能转录出来的所有 RNA 的总和, 包括编码的 mRNA 和非编码 RNA。RNA-seq 是一种基于二代测序技术研究转录组学的高通量测序方法, 它颠覆了人们对于传统转录组的普遍认识, 为人们研究转录组提供了新方法和途径, 使得全面刻画转录组和详细描述基因表达水平这一想法得以实现。RNA-seq 不同于传统的芯片技术, 是基于 Illumina HiSeq 测序平台, 研究特定组织或细胞在某个时期转录出来的所有 mRNA, 能够全面快速地获得某一物种特定组织或器官在某一状态下

的几乎所有转录本序列信息，能够精确地定量转录本表达、发现新的转录本、识别可变剪接事件，发现差异表达基因及其功能，从而揭示不同时间、空间下转录组的动态改变。由于 RNA-seq 技术具有数字化信号、背景噪音低、所需样本量少、检测基因数多、灵敏度高、可重复性好、检测阈值宽等突出优点，已广泛应用于基础研究、临床诊断和药物研发等领域。RNA-seq 的测序流程包括以下几个方面：RNA 样品的准备，cDNA 文库的构建和高通量测序。RNA-seq 数据分析包括以下的几个方面：获取测序数据并将其准确定位到参考序列，即对 RNA-seq 测序得到 reads 进行质量控制预处理，过滤掉低质量的 reads；去掉接头；使用比对软件，比如 Bowtie、TopHat 等将过滤后的 reads 直接比对到参考基因组上，再用 Cufflinks、Trinity 等软件实施转录组重建。对表达量进行差异表达分析，常用的表达定量用 FPKM 进行标准化，根据设定的标准，筛选，获取差异表达的基因；功能富集分析等流程。文库构建以及测序工作均由金维智公司负责。公司所用测序仪 IlluminaHiSeq X10，采用双端测序，测序读长为 150bp，要求下机数据量为 12G。转录组测序实验流程包括 RNA 提取、RNA 样品质量检测、文库构建、文库纯化、文库检测、文库定量、测序簇的生成以及上机测序。每一个环节都会对数据质量和数量产生影响，而数据质量又会直接影响后续信息分析的结果，为了保证源头数据的准确性与可靠性，要每一步实验过程都进行严格质控，检测合格后，把不同文库按照有效浓度及目标下机数据量的需求混样后进行 Illumina HiSeqX10 测序。

#### 1) 上机前数据质控

高质量的 RNA 是后续上机测序成功的有效保证。RIN 值为公认的 RNA 质量判断标准。RIN 值是由 AgilentBioanalyzer 2100 仪器根据多项参数计算出的数值，RIN 值代表 RNA 分子的完整性，其数值范围可以从 0 到 10，直接从 RNA 完整性方面反应了 RNA 质量的好坏，反之数值低则代表 RNA 降解严重，数值越大表示 RNA 越完整。计算参数主要包括总 RNA 比例、28s 峰的高度、标记峰的高度以及 Fastarea ratio 四个指标。一般规定 RIN 值大于 7 的样本则满足上机测序要求。

#### 2) 构建文库

将上述提取的总 RNA 用 DNaseI 消化去除 DNA 后,用 Ribo-Zero™ r RNA

Removal Kits 去除样本中的 rRNA；然后在 Thermomixer 加入打断试剂，将剩余的 mRNA 打断成 150~500nt 的短片段。用六碱基随机引物以打断后的 RNA 为模板合成一链 cDNA，然后加入缓冲液，dNTPs，RNaseH 和 DNA 聚合酶 I 配置成二链合成反应体系合成二链 cDNA，扩增目的片段，放大信号强度，最后用 Qia Qiuck PCR 试剂盒纯化并加入 EB 缓冲液冲洗回收，对 cDNA 片段进行粘性末端修复，cDNA 的 3' 末端加上 poly(A)尾并连接测序接头，利用琼脂糖凝胶电泳选出大于 200nt 的片段进行 PCR 扩增，从而得到测序用的 cDNA。构建好的文库用 Agilent2100 分析仪和 ABIStep One Plus 实时 PCR 系统质检，将质检合格的 cDNA 文库加入流动槽的各通道中，用 Illumina Hi Seq 4000 高通量测序仪进行测序，方法为双端 pair-end 测序。采用计算机软件同步收集和处理荧光信号，确定被测碱基，给出质量分值。采用计算机软件分析图像的位置坐标，将同一位置测得的碱基根据测序顺序连接成 reads。

### 3) 测序数据质量分析

对测序结果原始图像数据利用软件 CASAVA(v1.8.2)进行图像碱基识别 (Base Calling)，初步质量分析 (在测序过程中，Illumina 内置软件根据每个测序片段，即 read，前 25 个碱基的质量决定该 read 是保留还是抛弃)，得到测序 Pass Filter Data，结果以 FASTQ 文件格式存储，其中包含测序序列信息 (FASTQ 格式第二行) 与其对应的测序质量信息 (FASTQ 格式第四行)。

```
@GWZHISEQ01:289:C3Y96ACXX:6:1101:1704:2425 1:N:0:GGCTAC
GGGCACCAGTCGTAAAGTTAATCATGGATCTTCTCACGTCGCTGAGACC
AAAATTAAACTATG+
<<BBFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFBFFFFFFFFFFFFFFFFFFFF
F<FFFBFBFBFBFBFBFBFBFBFBFBFBFBFBFBFBFBFBFBFBFBFBFBFBFBFBFBFBFB
```

每个序列共有 4 行，第 1 行和第 3 行是序列名称 (有的 fq 文件为了节省存储空间会省略第三行 “+” 后面的序列名称)，由测序仪产生；第 2 行是序列；第 4 行是序列的测序质量，每个字符对应第 2 行每个碱基，第四行每个字符对应的 ASCII 值减去 33，即为该碱基的测序质量值，比如 @ 对应的 ASCII 值为 64，那么其对应的碱基质量值是 31。从 Illumina GA Pipeline v1.8 开始 (目前为 v1.9)，碱基质量值范围为 0 到 41。

#### 4) 测序数据质量评估

测序碱基质量受测序仪本身、测序试剂以及样品等多个因素共同影响，通常测序序列 5' 端前几个碱基错误率较高，随着测序序列长度的延伸，3' 端碱基错误率会不断升高，这是高通量测序技术特点决定的。测序错误率与碱基质量相关，Phred 质量分数 Q 与测序错误率 P 的关系如下： $Q=-10\log_{10}P$

Phred Quality Score	Probability of Incorrect BaseCall	Base Call Accuracy
10	1 in 10	90%
20	1 in 100	99%
30	1 in 1000	99.90%
40	1 in 10000	99.99%
50	1 in 100000	100.00%

备注：脂质相关基因表达 PCR 芯片可根据商品说明书操作。

#### 【可行性分析】

- 1) 脂质组学在疾病领域应用多年，有完善的研究体系和扎实的技术经验，可将此应用于胰腺癌脂质组学的研究，为胰腺癌早期诊断的研究提供思路和方法；
- 2) 随着分析技术的发展，脂质组学的研究技术也在不断创新和提高。UPLC-MS 可对脂质样本进行全扫描分析，检测得到几千到上万种物质，为脂质潜在标志物的筛选提供可能；
- 3) 脂质代谢通路研究在多种疾病如糖尿病、乳腺癌等方面取得了显著的研究成果，这为开展胰腺癌脂质代谢相关通路的研究提供了方向和思路。

### (二) 本项目的创新性与效益分析

#### 【创新性】

- 1) 目前针对胰腺癌早期筛查脂质标志物的研究国内外鲜有报道。
- 2) 胰腺癌潜在脂质标志物对细胞内脂质代谢的作用机制研究国内外鲜有报导。
- 3) 在疾病领域，脂质代谢通路的研究较为广泛和深入，但在胰腺癌脂质代谢方面，与之相关的通路有哪些尚未十分明确。

### 【效益分析】

胰腺癌往往发病隐匿，早期诊治不典型，临床就诊时大部分患者已处于中晚期。此时诊断治疗，多通过影像学检查如超声、CT、MRI等。但影像学检查不具有成本效益，并且不能将胰腺癌与诸如肿瘤形成性胰腺炎的良性胰腺疾病区分开。此外，在不必要的重复计算机断层扫描（CT）扫描期间暴露于辐射也可能增加恶性肿瘤的风险。内窥镜检查不适合筛查，因为它们的吞吐量低，并发症风险高。因此，需要一种新的准确，安全，方便，并且具有高通量的用于一般人群的胰腺癌筛查和诊断方法。脂质代谢组学通过血清学检测，能适用于早期普查人群，若能筛选出特异性胰腺癌肿瘤指标将极大提高患者的手术切除率及预后，具有极高的经济效益和社会效益。

## 五、预期成果

发表论著、专利及新药证书、技术方案、人才培养、临床应用预测。

- 1.在国内核心以上级别期刊发表论文 1-2 篇，SCI 论文 1-2 篇；
- 2.建立一套临床生物标本收集标准规范；
- 3.培养研究生一名。

## 六、课题年度计划、完成预期目标及成果

年度	课题的年度计划及年度目标（按季度划分工作节点，要求明确关键的、必须实现的节点目标）
2019年8月— 2019年12月	第三季度：收集病例，标本制作备用。网上大数据资料收集。 第四季度：使用超高效液相色谱-质谱仪（UPLC-MS）进行标本脂质代谢产物检测分析
2020年1月— 2020年12月	第一季度：继续收集病例及标本制备。 第二季度：联合大数据分析，质谱检测分析撰写论文。 第三季度：使用脂质相关基因表达PCR芯片检测（荧光染料法）检测脂肪代谢基因。 第四季度：联合大数据分析，基因检测结果分析撰写论文。
2021年1月— 2021年7月	第一季度：整理资料，统计数据，撰写临床标本收集规范流程。 第二季度：论文接收或发表。在国内外学术期刊上发表核心论文1-2篇。 第三季度：申请结题。
本课题应于 <b>2021年7月31日</b> 前进行验收	

## 七、研究基础与工作条件

(一) 工作基础 (与本项目相关的研究工作积累, 包括已完成的相关论文、科研项目、奖项以及前期研究工作成绩)

本课题组前期研究发现, 胰腺癌患者具有特定的血脂组血浆特征, 其磷脂酰乙醇胺 (PE-O 与 PE-P) 及甘油磷脂酸 (PA) 循环水平显著下降, 上述研究表明胰腺的脂类代谢与胰腺癌的发病有着密切关系, 对于胰腺的脂类代谢的检测可以一定程度上评判胰腺癌是否存在。但是限于脂类分子的多样性且参与过程及结构的复杂性, 且缺乏完善的脂类数据库, 有待进一步深入研究。

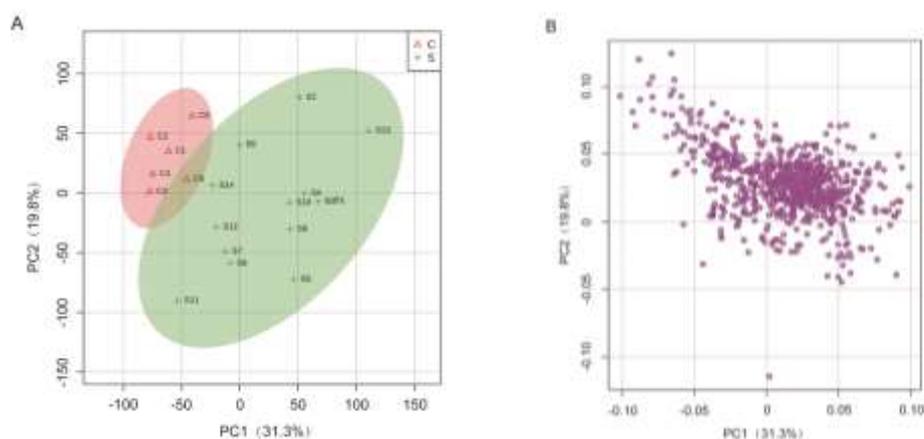


Fig 1. Multivariate analysis of lipidomics data. The PCA score (A) and loading (B) plots were obtained based on the mass levels of individual pancreatic lipid species of different groups: control (n = 6), patients(n = 12).

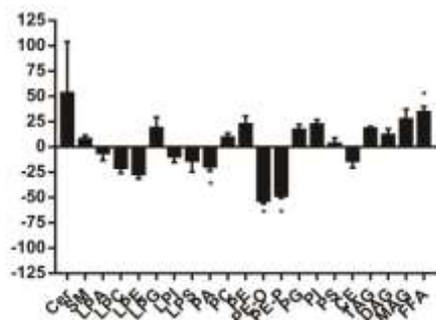


Fig 2. Mean lipid levels within each cluster. The data for each lipid are scaled to zero mean and unit variance. Average cluster level was calculated as the mean value of all scaled lipid levels belonging to the cluster. Statistical comparison was performed using linear mixed models (F-statistic; asterisk marker for  $p < 0.01$ ). Error bars show the standard error of the mean.

综上所述, 脂类代谢紊乱与机体内许多异常活动有关, 在系统和分子

水平上**研究胰腺癌患者组织或体液中脂类的变化**，有助于分析脂类代谢在肿瘤发展过程中的作用及其机制，确定其中关键的脂类及相关酶，找出潜在的异常代谢途径，**为肿瘤的早期诊断和早期治疗提供依据。**

## **(二) 工作条件 (包括已具备的软硬件条件, 尚缺少的条件和拟解决的途径)**

本课题组所在团队与长海医院胰腺肿瘤科有密切协作, 能保证胰腺癌患者的收治。

本课题组获得本院检验科支持, 协同进行血清及标本的制备。检验科拥有相应设备, 如离心机、-80℃冰箱等, 可用于标本的制备和保存。

本课题组与中山医院王向东教授 (本院特聘 PI) 团队合作, 该团队拥有一流的实验平台、有一流的细胞影像分析平台。实验所需荧光定量 PCR 仪、冷冻干燥仪、DNA 扩增仪、杂交炉、冷冻干燥机、高速冷冻离心机、超速冷冻离心机、超低温冰箱、液氮容器、超高效液相色谱-质谱仪 (UPLC-MS) 均能实现共享; 具备相应的的支持软件和技术人员。保证课题的顺利进展。脂质代谢基因 PCR 芯片为王教授团队专利产品, 已授权本课题组使用。

## **(三) 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)**

**课题负责人: 周凌, 上海市第四人民医院, 副主任医师**

主持或参加科研项目 (课题) 情况:

1.上海市虹口区卫生和计划生育委员会基金项目(区科学技术委员会立项), 虹卫 1001-01, HER-2、pAKT 在干细胞标记 ALDH1 阳性乳腺癌中的表达及临床意义, 2010/09-2012/09, 5 万元, 已结题, 主持。

2.山东省自然科学基金项目, ZR2014HPO36, TGF- $\beta$  信号通路调控乳腺肿瘤干细胞 相关机制的研究, 2014/12-2016/12, 5 万元, 已结题, 参加。

3.上海市虹口区卫生和计划生育委员会基金项目, 虹卫 1204-04, Snail 及 E-cad 在三阴性乳腺癌中的表达及临床意义, 2012/09-2014/09, 0.2 万元,

已结题，参加。

4.上海市科学技术委员会自然科学基金项目，030317,乳腺癌多药耐药基因促进肿瘤侵袭转移的机制研究，2006/03-2008/10，10 万元，已结题，参加。

代表性论著：

1. Huang Q<sup>#</sup>, Cheng J<sup>#</sup>, He S, Wang M, **Zhou L**, Zhang Z, Feng X, Yu Y, Ma J, Dai C, Zhang S, Sun L, Gong Y, Wang Y, Zhao M, Luo Y, Liu X, Tian L<sup>\*</sup>, Li CY<sup>\*</sup>. Caspase-3/PKC $\delta$ /Akt/VEGF-A Signaling Pathway Mediates Tumor Repopulation during Radiotherapy. accepted by Clinical Cancer Research, 2019.4.

2. **Zhou L**<sup>#</sup>, Wang M<sup>#</sup>, Guo C, Zhu Y, Yu H, Zhang L<sup>\*</sup>, Yu P<sup>\*</sup>. Expression of pAkt is associated with a poor prognosis in Chinese women with invasive ductal breast cancer. *Oncol Lett.* 2018 Apr;15(4):4859-4866.

3. Yu H<sup>#</sup>, W<sup>#</sup>, Gong F, Chi B, Chen J<sup>\*</sup>, **Zhou L**<sup>\*</sup>. MicroRNA-155 regulates the proliferation, cell cycle, apoptosis and migration of colon cancer cells and targets CBL. *Exp Ther Med.* 2017 Nov;14(5):4053-4060.

4. Liu X<sup>#</sup>, Li F<sup>#</sup>, Huang Q, Zhang Z, **Zhou L**, Deng Y, Zhou M, Fleenor DE, Wang H, Kastan MB<sup>\*</sup>, Li CY<sup>\*</sup>. Self-inflicted DNA double-strand breaks sustain tumorigenicity and stemness of cancer cells. *Cell Res.* 2017 Jun;27(6):764-783.

5. Yang S<sup>#</sup>, **Zhou L**<sup>#</sup>, Reilly PT, Shen SM, He P, Zhu XN, Li CX, Wang LS, Mak TW, Chen GQ<sup>\*</sup>, Yu Y<sup>\*</sup>. ANP32B deficiency impairs proliferation and suppresses tumor progression by regulating AKT phosphorylation. *Cell Death Dis.* 2016 Feb 4;7:e2082.

6. Zhang Z<sup>#</sup>, Wang M<sup>#</sup>, **Zhou L**, Feng X, Cheng J, Yu Y, Gong Y, Zhu Y, Li C, Tian L<sup>\*</sup>, Huang Q<sup>\*</sup>. Increased HMGB1 and cleaved caspase-3 stimulate the proliferation of tumor cells and are correlated with the poor prognosis in colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2015 May 20;34:51.

7. **Zhou L**<sup>#</sup>, Li K<sup>#</sup>, Luo Y<sup>#</sup>, Tian L, Wang M, Li C<sup>\*</sup>, Huang Q<sup>\*</sup>. Novel prognostic markers for patients with triple-negative breast cancer. *Hum Pathol.* 2013 Oct;44(10):2180-7.

8. **Zhou L**<sup>#</sup>, Luo Y<sup>#</sup>, Li K, Tian L, Wang M, Li C<sup>\*</sup>, Huang Q<sup>\*</sup>. *Hum Pathol.*

2013 Jul;44(7):1421-8.

9. Pei Yu<sup>#</sup>, **Ling Zhou<sup>#</sup>**, Jianfeng Wang, Aifang Jiang, Ke Li. Prognostic relevance of ALDH1 in breast cancer: a clinicopathological study of 96 cases. Chinese-German Journal of Clinical Oncology. January 2010, Vol. 9, No. 1, P31–P35

10. **周凌**, 虞佩, 王建丰, 宋科瑛, 江爱芳, 徐红, 李克. 乙醛脱氢酶 1 蛋白在乳腺癌中的表达及临床意义. 肿瘤, 2009 年 07 期: 663-667.

### 俞华

代表性论著:

1. **Hua Yu<sup>#</sup>**, WeiLing Xu<sup>#</sup>, FangChao Gong, BaoRong Chi, JunYi Chen<sup>\*</sup> and Ling Zhou<sup>\*</sup>, MicroRNA-155 regulates the proliferation, cell cycle, apoptosis and migration of colon cancer cells and targets CBL, Experimental and Therapeutic Medicine, 2017, 14:4053-4060.

2. **俞华**, 陈骏毅, 周凌, 柳汉荣, 结直肠癌患者血清和组织中 EGFR、HER-2 表达水平及临床意义, 现代仪器与医疗, 2017, 23(5), 85–87.

3. Ling Zhou<sup>#</sup>, Min Wang<sup>#</sup>, Chongyong Guo, Ying Zhu, **Hua Yu**, Lu Zhang<sup>\*</sup>, and Pei Yu<sup>\*</sup>, Expression of pAkt is associated with a poor prognosis in Chinese women with invasive ductal breast cancer, ONCOLOGY LETTERS 2018, 15: 4859-4866.

### 周德华

主持或参加科研项目及人才计划项目情况:

1. 国家自然科学基金面上项目, 81472577、前胃泌素蛋白促进结肠粘膜增生及结肠肿瘤发生发展的功能和机制研究、2015.01-2018.12、75 万元、已结题、参与。

2. 上海市申康中心, 适宜推广项目、经皮经肝穿刺胆囊造瘘联合 II 期腹腔镜胆囊切除治疗急性老年危重胆囊炎、2015.01-2017.12、15 万元、已结题、参与。

3. 同济医院, 院级基础实验型课题, 抑制 HNF-4 $\alpha$  基因表达对大鼠肝干细胞分化为肝样细胞的影响、2018.01.-2020.01, 2 万元, 在研, 第一完成

人。

代表性论著：

1.胆管内乳头状粘液瘤的诊治进展；周德华；2015, 4(1)，外科研究与新技术。

2.慢性结石性胆囊炎合并胆囊胃瘘二例——短篇论著，周德华，王冰一 施宝民 刘中砚，2018, 33(5)，中华普通外科杂志

3.胆囊肠道内瘘 17 例临床诊治经验；周德仁 周德华 肖帅 王冰一 施宝民，2018, 30(6)，肝胆胰外科杂志；

4.胰腺癌—胰腺炎—胆胰管导管内黏液腺瘤一例分析；施宝民，陈泉宁，经巍，林锐，周德华，彭康胜；2013, 40(5)；国际外科学杂志。

5.朋辈心理辅导在医学生培养中的应用；高原，张静，成娟，周德华；2014, 34(5)；中华医学教育杂志。

## 八、课题经费预算表（单位：万元）

申请总经费： 5 万元			其中 医院资助： 5		
			其他渠道资助： 0		
支出项目	支出项目明细	单价	金额	其中：医 院资助 额	备注/测算依据
材料费	1.基因芯片	0.15	3.0	3.0	共需 20 张
	2.PCR 封膜版	0.025	0.5	0.5	共需 20 张
	3.反转录试剂	0.1	0.1	0.1	共需 1 盒
	4.PCR 扩增试剂	0.05	0.4	0.4	共需 8 盒
测试化验加工费	1 质谱分析	0.03	0.3	0.3	质谱分析费用 0.01 万元/例， 共 30 例
	2 PCR	0.01	0.2	0.2	PCR 每小时 0.01 万元，共约 20 小时
会议费	0	0.1	0.1	0.1	组织开展学术研讨会 1 次
出版/文献/信息 传播/知识产权 事务费		0.4	0.4	0.4	论文发表版面

## 九、新项目、新技术等准入批件（医务科登记备案）

<p>(插入扫描文件)</p>
-----------------

## 十、医学伦理委员会审查批件

(插入扫描文件)

## 十一、学科带头人、科室负责人意见

签字：  
年 月 日

## 十二、专家意见

## 十三、合作单位意见

公 章

年 月 日

#### 十四、医院意见

公 章

年 月 日