

关于国家自然科学基金资助项目批准及有关事项的通知

川北医学院 肖江卫先生/女士：

根据《国家自然科学基金条例》的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）决定批准资助您的申请项目。项目批准号：81270561，项目名称 Sirtuin1 基因靶向增强 CD4+CD25+Foxp3+Treg 细胞功能协同凋亡干预诱导大鼠肝移植免疫耐受的实验研究，资助金额 16.00 万元，项目起止年月：2013 年 01 月至 2013 年 12 月，有关项目的评审意见及修改意见附后。

请尽早登录科学基金网络信息系统 (<https://isis.nsfc.gov.cn>)，获取《国家自然科学基金资助项目研究计划书》（以下简称计划书）并按要求填写。计划书电子文件通过科学基金网络信息系统 (<https://isis.nsfc.gov.cn>) 或通过电子邮件发至 report@pro.nsfc.gov.cn 信箱，由依托单位确认后提交至自然科学基金委；计划书纸质文件（一式两份）由依托单位审核并加盖单位公章后报送至自然科学基金委 医学科学部 科学部。

请按照依托单位规定时间，及时将电子和纸质计划书提交依托单位进行确认审核。自然科学基金委接收依托单位报送计划书截止时间为 **2012 年 9 月 10 日**。

对于有修改意见的项目，请按修改意见调整计划书相关内容；如对修改意见有异议，须在计划书报送截止日期前提出。

未说明理由且逾期不报计划书者，视为自动放弃接受资助。

附件：项目评审意见及修改意见

国家自然科学基金委员会
医学科学部

2012 年 8 月 17 日

项目评审意见及修改意见表

项目批准号	812705 61	项目负责人	肖江卫	申请代码	1 H0321
项目名称	Sirtuin1 基因靶向增强 CD4+CD25+Foxp3+Treg 细胞功能协同凋亡干预诱导大鼠肝移植免疫耐受的实验研究				
资助类别	面上项目		亚类说明	非连续资助类项目	
附注说明					
依托单位	川北医学院				
资助金额	16.00 万元	起止年月	2013 年 01 月至 2013 年 12 月		
通讯评审意见： <1> 增强 Treg 细胞的功能从而诱导器官移植免疫耐受是目前研究的热点之一。Sirtuin1 基因靶向增强 CD4+CD25+Foxp3+Treg 细胞功能可能为移植免疫耐受提供新的思路，从理论和实践上都有一定的科学意义，有一定的研究价值。通过 Sirtuin 基因不同处理的 CD4+CD25+Foxp3+Treg 细胞进行体内、体外移植免疫耐受研究是一学术创新。但主要存在以下问题：1. 项目研究内容不清晰、不明确，重点不突出，研究内容与题目亦存在差异。题目是“…Treg 细胞协同凋亡干预诱导…移植免疫耐受的实验研究”，但研究内容中体外实验并未涉及与 Nur77 诱导效应 T 细胞凋亡问题。如果是将 plenti-Nur77-EGFP 质粒转染至 Treg 细胞，那么，题目中就应该增加 Nur77 基因的内容。简单讲：Sirtuin 基因可能参与了 Treg 细胞的调节，而 Nur77 受体的表达调控效应 T 细胞的凋亡是就单个 T 细胞表面 Nur77 受体表达的增多或减少而言，通过增加 Treg 细胞表面的 Nur77 受体并输注这些 Treg 细胞，从而介导效应 T 细胞凋亡，跨越太大，缺乏理论依据。体外实验构建了 plenti-Nur77-EGFP 慢病毒质粒，接下来就没有了相关的体外实验内容，这些质粒用途何在？只是在“体内试验（2）部分”实验分组中提到“协同 plenti-Nur77-EGFP 处理组”，如何处理、如何观察都没有具体内容。2. 把一些已完成的项目作为研究目标显然是不恰当的，申请书研究目标有 6 个，现在已完成了两个，令人费解。3. 研究方案中没有“plenti-Nur77-EGFP”处理组具体体内外研究方案。4 作者目前负责的一项国家自然科学基金面上项目尚未完成，该项目与本课题有部分相关性，目前还没有该基金资助的文章发表，难以评估课题进展完成情况，因此在前一项目完成之前，不易申请类似课题。5. 技术路线不清晰，如申请者所写，是“试验流程”。鉴于以上原因，本课题难以完成，不予资助。 <2> 调节性 T 细胞在移植耐受中发挥重要作用，但其临床应用也存在一些障碍，如调节性 T 细胞表型及功能的不稳定等。本项目通过沉默去乙酰化酶 Sirt1 增强 Foxp3 表型及 Treg 功能的稳定性，有望改善输注 Treg 诱导移植耐受的效果，有非常重要的研究价值。虽然国际上也有与本项目类似的研究，但本项目的设计更贴近于临床应用并增添了新的研究内容，使用了一些当前较新的研究手段，有一定的创新性。该项目研究目标明确，研究内容重点突出，实验设计较为合理可行。建议在体内实验分组部分中加入 Sirt1-Treg 和免疫抑制剂联合治疗组，因为单独使用 Sirt1-Treg 可能不足以帮助移植物度过急性排斥期。该项目研究团队配备合理，有一定前期工作基础。申请者之前主持过一个面上项目，取得了一定成果。 <3> 申请人期望沉默 Sirtuin1 获得 Treg 细胞 Foxp3 稳定表达，探索其诱导肝移植免疫耐受的可行					

行性，具有较好的创新性；科学问题明确、清晰，具有一定的科学意义；申请人在本领域具有一定的研究基础，且本项目与申请人既往研究具有延续性；研究方案基本完整，但存在以下问题：表面分子 CD127 和核内标志 Foxp3 具有良好的负相关，CD4+CD25+CD127^{low} 在人、小鼠可鉴定出高表达 Foxp3 的 CD4+CD25+Treg 细胞，然而这在大鼠中尚缺少实验依据，而且就目前掌握信息，还没有商品化的抗大鼠 CD127 (IL-7R α) 相关（流式）抗体，申请人在研究基础和结题研究工作总结中利用此三标分选大鼠 Treg 细胞值得商榷。

对研究方案的修改意见：

医学科学部

2012 年 8 月 17 日

国家自然科学基金资助项目批准通知

川北医学院 肖江卫同志：

根据《国家自然科学基金条例》的规定和专家评审意见，国家自然科学基金委员会决定资助您的申请项目。请您登录科学基金项目管理 ISIS 网络信息系统 (<https://isis.nsfc.gov.cn>)，获取《国家自然科学基金资助项目研究计划书》(以下简称计划书)。您登录该系统的用户名和密码以电子邮件方式发送至您在申请书中填写的电子邮箱。

请您按照本通知的研究期限、资助金额和修改意见填写计划书，要求纸质原件(一式两份)和电子文档同时报送(请保证电子文档和纸质文件内容一致)。电子文档由申请人上传到科学基金网络信息系统 (<https://isis.nsfc.gov.cn>)，或用电子邮件发送到：report@pro.nsfc.gov.cn 信箱，电子文档报送截止日期为9月12日；纸质原件送所在单位审核盖章后，由依托单位在9月12日前统一报送；如对批准意见有异议，须在上述日期前提出；未说明理由逾期不报计划书者，视为自动放弃接受资助。

国家自然科学基金委员会

医学科学部

2010

年 8 月 18 日

附：批准意见表(见背面)

附：批准意见表

项目批准号	81070378	归口管理部门	医学科学部	资助领域分类代码	H0321
项目名称	抗原负载的 PD-1highCD11c+ DC 经由 PD-1/PD-L1 通路调控诱导大鼠肝移植免疫耐受的实验研究				
资助类别	面上项目		亚类说明		
附注说明					
项目负责人	肖江卫		依托单位	川北医学院	
资助金额	32.00	万元	研究期限	2011.01	至 2013.12
对研究方案的修改意见：					

申报编号: 23NSFSC4761

立项编号: 2023NSFSC1896

四川省自然科学基金项目任务书 (青年基金项目)

LINC01606通过SCD1-Wnt/ β -catenin正反馈信号抑制铁死亡(Ferroptosis)调控结直肠癌干细胞“干

项目名称: 性”的作用及机制研究

承担单位: 四川省肿瘤医院 (盖章)

项目负责人: (签字)

推荐单位: 四川省卫生健康委员会

立项经费: 10 (万元)

项目起止年限: 2023-01-01 至 2024-12-31

四川省科学技术厅制

任务书填写和打印说明

1. 填写任务书各项内容应实事求是，认真填写，表述明确。外来语要同时用原文和中文表达，第一次出现的缩略词，须注明全称。

2. 任务书各个部分都必须填写，原则上不能有空白；确实无法填写的内容，请填“无”或“0”。

3. 任务书是项目牵头单位向合作单位拨经费、中期检查、绩效评价（验收）的依据。任务书的内容应参照项目申报书填写，各项指标不能调减，可以调增。

4. 任务书必须通过四川省科技信息管理系统在线填写、上报，并经承担单位、推荐单位和四川省科技厅审核通过后签订，必须确保网上的四川省科技信息管理系统的电子文档与最终打印稿一致。

5. 项目负责人将任务书打印一式四份纸质文档，A4纸，左侧装订，不得加用塑料等额外装订材料。由承担单位和推荐单位审核签署意见并加盖公章后，报送四川省科技厅相关处室进行纸质文档和网上的审核签署。纸质文档盖“四川省科学技术厅科研项目合同专用章”后，四川省科技厅存档一份，另三份返项目单位归档（推荐单位一份、承担单位一份、项目负责人一份）。

6. 任务书是四川省科技厅与项目承担各方的约束性文本，其中四川省科技厅为甲方，项目承担单位为乙方，推荐单位为丙方。任务书受《四川省科技计划管理办法》、《四川省科技计划项目专项资金管理办法》等相关管理制度保护，由四川省科技厅负责解释。



一、项目信息表

项目名称	LINC01606通过SCD1-Wnt/ β -catenin正反馈信号抑制铁死亡（Ferroptosis）调控结直肠癌干细胞“干性”的作用及机制研究		
起始时间	2023-01-01	终止时间	2024-12-31
学科方向	基础医学/医学细胞生物学		
基金领域	肿瘤细胞命运		

项目牵头单位

单位名称	四川省肿瘤医院	社会信用代码	12510000450723900G
单位地址	成都市人民南路4段55号	邮编	610041
职工人数	1800 人	单位性质	其他
单位负责人	林桐榆	推荐单位	省卫生健康委
联系人	欧莉嘉	联系部门	
联系人手机		联系人电话	

科研（财务）助理

姓名	罗雅军	身份证号	
手机号		工作单位	四川省肿瘤医院
毕业学校	重庆医科大学	毕业时间	2022-06-30

项目合作单位

社会信用代码	单位名称	在本项目中分工

项目负责人

姓名	罗雅军	性别	男	出生年月	1989-12-21
学历（学位）	博士（博士）	职称	主治医师	手机	15892442483
现从事专业	胃肠外科				
是否是实验室固定成员	☐ 国家重点实验室固定人员 ☐ 四川省重点实验室固定人员 ☐ 天府实验室固定人员				
实验室名称					

项目组人数

项目组人数	总计 7 人，其中：高级职称 1 人，中级职称 3 人，初级职称 2 人，其他 1 人。
-------	--



二、项目概述（说明项目的目标任务、研究内容、实施方案（含合作单位分工）、技术关键、技术路线、论文、专利、人才培养等方面定性和定量的预期成果等。）

1. 研究目标

本课题以我们前期的研究为基础，结合细胞以及动物模型，从表达、功能、机制三个方面对 LINC01606 及下游信号通路进行研究，了解结直肠癌 CSCs 调控网络中是否存在 LINC01606 及下游 Wnt/ β -catenin 信号通路的改变，研究 LINC01606 是否通过 SCD1 的作用与 Wnt/ β -catenin 信号形成正反馈调控环路，并阐明其机制。为深入研究结直肠癌 CSCs 调控的分子机制，寻找结直肠癌新的分子治疗靶点提供可靠的理论和实验依据。

2. 研究内容

(1) 明确 LINC01606-SCD1-Wnt/ β -catenin 调控环路的正反馈作用机制

为了明确 LINC01606 调控 Wnt 信号之间的作用机制，我们进行体外一系列的相关研究：
体外研究：

1) 明确 LINC01606 通过 SCD1 调控 Wnt/ β -catenin 信号

①在结直肠癌 CSCs 中过表达和干扰 LINC01606 后，观察 SCD1、Wnt3a、AXIN2、GSK-3 β 、 β -catenin、TCF 和 miR-423-5p 的表达水平，检测细胞内 MUFAs 的水平、SFAs/MUFAs 的比例；

②使用原位杂交(FISH)定位 LINC01606 和 SCD1 在结直肠癌 CSCs 中的位置；

③并且过表达和干扰 miR-423-5p 后，观察 LINC01606 和 SCD1 的表达水平；

④双荧光素酶报告基因试验明确 miR-423-5p 与 LINC01606 和 SCD1 的作用位点。

⑤在结直肠癌 CSCs 中应用 siRNA 和过表达慢病毒手段比较 LINC01606 干扰、SCD1 干扰、LINC01606 过表达、SCD1 过表达以及 LINC01606 干扰+SCD1 过表达、LINC01606 过表达+SCD1 干扰、LINC01606 干扰+SCD1 干扰、LINC01606 过表达+SCD1 过表达处理后 Wnt3a、Axin2、TCF4、cyclin D1、c-myc、E-cadherin、总 β -catenin、核 β -catenin 及 vimentin 的表达变化，检测细胞内 MUFAs 的水平、SFAs/MUFAs 的比例；

2) 验证 LINC01606-SCD1-Wnt/ β -catenin 环的正反馈机制

①在结直肠癌 CSCs 中用 Wnt/ β -catenin 抑制剂和激动剂处理细胞后，观察 LINC01606 和 SCD1 的表达水平，检测细胞内 MUFAs 的水平、SFAs/MUFAs 的比例；

②应用 siRNA 和过表达慢病毒手段比较 LINC01606 沉默、LINC01606 过表达、



LINC01606 沉默+Wnt 激动剂、LINC01606 过表达+Wnt 抑制剂处理后 Wnt3a、AXIN2、GSK-3 β 、 β -catenin、TCF4 的表达变化，检测细胞内 MUFAs 的水平、SFAs/MUFAs 的比例；

③通过 Promoter Pull-down 检测技术检测与 LINC01606 启动的 Wnt 信号相关的转录蛋白；

3) 验证 LINC01606 启动子区域与转录因子 EP300 的结合

①应用 LINC01606 Promoter pull down 验证 LINC01606 启动子区域与转录因子 EP300 的结合；

②双荧光素酶报告基因试验明确 EP300 与 LINC01606 启动子的作用位点。

③应用 Chip-seq 进一步的验证 LINC01606 与 EP300 之间的关系。

(2) 阐释 LINC01606 通过铁死亡信号调控结直肠癌 CSCs 的生物学功能

为了明确 LINC01606 调控结直肠癌 CSCs 的生物学功能，我们进行体外的相关研究：

体外实验：

1) 明确 LINC01606 调控结直肠癌“干性”的作用

①过表达和干扰 LINC01606 后观察结直肠癌干细胞系细胞成球能力；

②过表达和干扰 LINC01606 后通过软琼脂实验验证结直肠癌干细胞系“干性”的变化；

③ 过表达和干扰 LINC01606 后检测 Sox2、Oct4、PRRX1、Nanog、Lin28 等干性转录因子的表达变化及 E-cadherin、vimentin 等侵袭性分子的表达情况；

④过表达和干扰 LINC01606 后检测干细胞对化疗药物的敏感性，观察细胞活性变化及计算 IC₅₀；

⑤过表达和干扰 LINC01606 后观察结直肠癌“干性”标志物的变化；

2) 明确 LINC01606 调控结直肠癌 CSCs 铁死亡的作用

①在结直肠癌干细胞中过表达和干扰 LINC01606 后检测铁死亡相关指标：细胞内总铁量、Fe²⁺浓度、脂质 ROS、线粒体超氧化物和线粒体膜电位；透射电镜观察铁死亡形态学的变化；

②在结直肠癌干细胞中过表达和干扰 LINC01606 后，分别使用铁死亡诱导剂 RSL3、FINO2 和铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1、D-PUFAs 处理后检测铁死亡相关指标：细胞内总铁量、Fe²⁺浓度、脂质 ROS、线粒体超氧化物和线粒体膜电位，并检测上述“干性”指标；

③ 在结直肠癌干细胞中分别使用铁死亡诱导剂 RSL3、FINO2 和铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1、D-PUFAs 处理后检测铁死亡相关指标：细胞内总铁量、Fe²⁺浓度、脂质 ROS、线粒体超氧化物和线粒体膜电位，并检测上述“干性”指标。

(3) 探明 LINC01606-SCD1-Wnt/ β -catenin 正反馈调控环路抑制铁死亡在调控结直肠癌



CSCs “干性”中的作用

体外实验：

①在结直肠癌 CSCs 中应用 siRNA 和过表达慢病毒手段比较 LINC01606 干扰、SCD1 干扰、LINC01606 过表达、SCD1 过表达以及 LINC01606 干扰+SCD1 过表达、LINC01606 过表达+SCD1 干扰、LINC01606 干扰+SCD1 干扰、LINC01606 过表达+SCD1 过表达、LINC01606 过表达+Wnt3a 过表达+ Wnt 抑制剂（C59）、LINC01606 干扰+SCD1 干扰+ Wnt 激动剂（BML-284）、LINC01606 过表达+Wnt3a 过表达+ 铁死亡诱导剂（FINO2、RSL3）、LINC01606 干扰+SCD1 干扰+ 铁死亡诱导剂（FINO2、RSL3）检测“干性”指标的变化及铁死亡标志物的变化；②探索上述处理对 LINC01606 介导的信号通路以及侵袭相关的分子的影响。

在体研究：

我们通过 SCID 小鼠皮下成瘤实验、裸小鼠皮下移植瘤模型以及裸小鼠结直肠癌血道转移模型，使用 LINC01606 沉默、LINC01606 过表达、以及 LINC01606 沉默+Wnt 激动剂、LINC01606 过表达+Wnt 激动剂、LINC01606 沉默+ Wnt 抑制剂、LINC01606 过表达+ Wnt 抑制剂几种情形处理上述模型，进一步分析验证体外实验结果。

3. 拟采取的研究方案及技术路线

3.1.1 明确 LINC01606 通过 SCD1 调控 Wnt/ β -catenin 信号

体外研究(见技术路线 1a)

3.1.1.1 结直肠癌 CSCs 的获取及验证

（1）结直肠癌 CSCs 的体外培养：无血清 L-15 培养基中添加细胞因子（EGF 20 ng/ml, bFGF 20 ng/ml 等）作为肿瘤干细胞培养液,富集培养结肠癌 SW480 、HT29 以及 HCT116 细胞，获得干细胞系（SW480csc、HT29csc 和 HCT116csc）。

（2）干细胞“干性”的验证：流式检测干细胞标志物 CD44 及 CD133、细胞成球试验、软琼脂克隆形成实验、CCK8 检测细胞对化疗药物 5-FU、顺铂的敏感性、Western blot 及 q-PCR 技术检测 Sox2、Oct4、PRRX1、Nanog、Lin28 等肿瘤干性转录因子。

3.1.1.2 结直肠癌 CSCs 中明确 LINC01606 调控 SCD1 的作用及机制

（1）合成 LINC01606 和 SCD1 荧光探针，在结直肠癌干细胞系 SW480csc、HT29csc 和 HCT116csc 及结直肠癌组织与合成的探针进行杂交，用荧光显微镜观察 LINC01606 和 SCD1 在细胞中的富集位置。

（2）在结直肠癌干细胞系 SW480csc、HT29csc 和 HCT116csc 中应用质粒过表达或 siRNA



下调 LINC01606 的表达, 处理 48h, 收获细胞后通过细胞流式及提取 RNA 通过 q-PCR 技术检测转染效率; 利用 Western blot 及 q-PCR 技术检测 SCD1 的表达水平, 采用 q-PCR 技术检测 miR-423-5p 的表达水平。利用超高效液相色谱-质谱法(UHPLC-MS)检测细胞内 MUFAs 的水平、SFAs/MUFAs 的比例。

(3) 利用 miR-423-5p mimic 及 miR-423-5p inhibitor 转染上述结直肠癌干细胞系, 处理 48h, 收获细胞后通过细胞流式及提取 RNA 通过 q-PCR 技术检测转染效率; 利用 Western blot 及 q-PCR 技术检测 SCD1 的表达水平, 采用 q-PCR 技术检测 LINC01606 的表达水平。

(4) 双荧光素酶报告基因试验检测 miRNA-423-5p 与 LINC01606 和 SCD1 的 3'-UTR 作用位点。将 LINC01606 和 SCD1 转录因子表达质粒 psiCHECK-h-LINC01606-3'UTR-wt/mut 及 psiCHECK-h-Wnt3a-3'UTR-wt/mut 分别与 hsa-miR-423-5p/Negative Control 共转染 293T 细胞。检测荧光的强度, 判断 miRNA-423-5p 是否结合 LINC01606 和 SCD1 的 3'-UTR。

3.1.1.3 结直肠癌 CSCs 中明确 LINC01606-SCD1 轴调控 Wnt/ β -catenin 信号的作用及机制

(1) 在结直肠癌干细胞系 SW480csc、HT29csc 和 HCT116csc 中应用 siRNA 和过表达慢病毒手段是 LINC01606 沉默、SCD1 沉默、LINC01606 过表达、SCD1 过表达、LINC01606 沉默+SCD1 沉默、LINC01606 过表达+SCD1 过表达、LINC01606 沉默+SCD1 过表达、LINC01606 过表达+SCD1 过表达沉默, 处理 48h, 收获细胞后通过细胞流式及提取 RNA 通过 q-PCR 技术检测转染效率; 利用 Western blot 及 q-PCR 技术检测 Wnt 信号分子表达水平: Wnt3a、Axin2、TCF4、cyclin D1、c-myc、E-cadherin、总 β -catenin、核 β -catenin 及 vimentin。利用 UHPLC-MS 检测细胞内 MUFAs 的水平、SFAs/MUFAs 的比例。

3.1.1.4 结直肠癌 CSCs 中验证 LINC01606-SCD1-Wnt/ β -catenin 环的正反馈机制

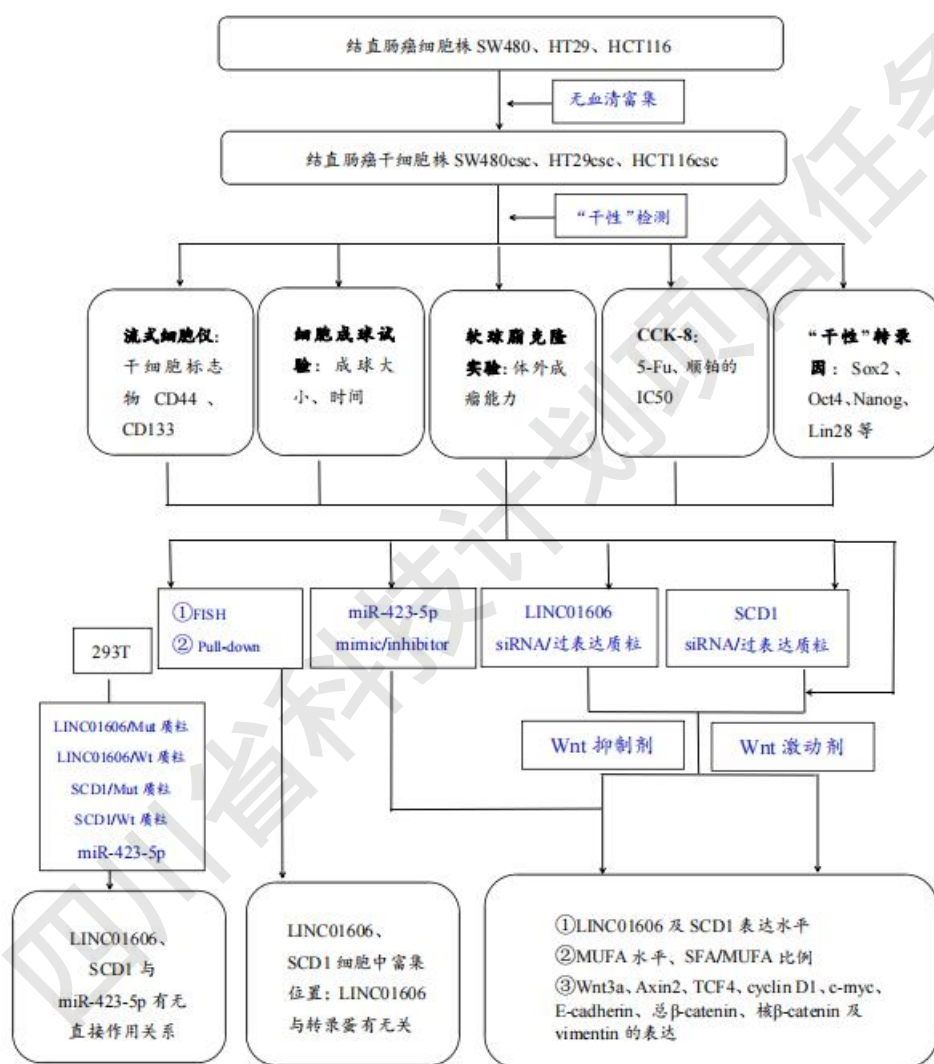
(1) 在结直肠癌干细胞系 SW480csc、HT29csc 和 HCT116csc 中应用 Wnt 抑制剂(C59)、Wnt 激动剂(BML-284)处理 24h, 收获细胞后利用 Western blot 及 q-PCR 技术检测 SCD1 的表达水平, q-PCR 技术检测 LINC01606 的表达。利用 UHPLC-MS 检测细胞内 MUFAs 的水平、SFAs/MUFAs 的比例。

(2) 在结直肠癌干细胞系 SW480csc、HT29csc 和 HCT116csc 中应用 siRNA 和过表达慢病毒手段比较 LINC01606 沉默+Wnt 抑制剂(C59)、LINC01606 过表达 Wnt 激动剂(BML-284)、



LINC01606 沉默+Wnt 激动剂（BML-284）、LINC01606 过表达+Wnt 抑制剂（C59），收获细胞后利用 q-PCR 技术检测 LINC01606 的表达，Western blot 及 q-PCR 技术检测 SCD1 以及 Wnt 信号分子表达水平：Wnt3a、Axin2、TCF4、cyclin D1、c-myc、E-cadherin、总 β -catenin、核 β -catenin 及 vimentin。利用 UHPLC-MS 检测细胞内 MUFAs 的水平、SFAs/MUFAs 的比例。

（3）通过 DNA Pull-down 和 Chip-seq 检测技术与 Wnt 转录因子相关蛋白与 LINC01606 的作用关系。



技术路线 1a

3.1.2 阐释 LINC01606 通过铁死亡信号调控结直肠癌 CSCs 的生物学功能

体外研究(见技术路线 2a)

3.1.2.1 明确 LINC01606 调控结直肠癌 CSCs “干性”的作用

（1）在结直肠癌干细胞系 SW480csc、HT29csc 和 HCT116csc 中应用 siRNA 和过表达慢



病毒手段分别干扰和过表达 LINC01606, 获得稳定感染后对比 LINC01606 沉默和 LINC01606 过表达的细胞成球试验、软琼脂实验、CCK-8 检测对 5-FU、顺铂的耐药性及计算 IC₅₀、流式检测干性”标志物 CD44、CD133。利用 Western blot 及 q-PCR 技术检测干性转录因子: Sox2、Oct4、PRRX1、Nanog、Lin28 等, 以及侵袭相关分子: E-cadherin、vimentin 等。

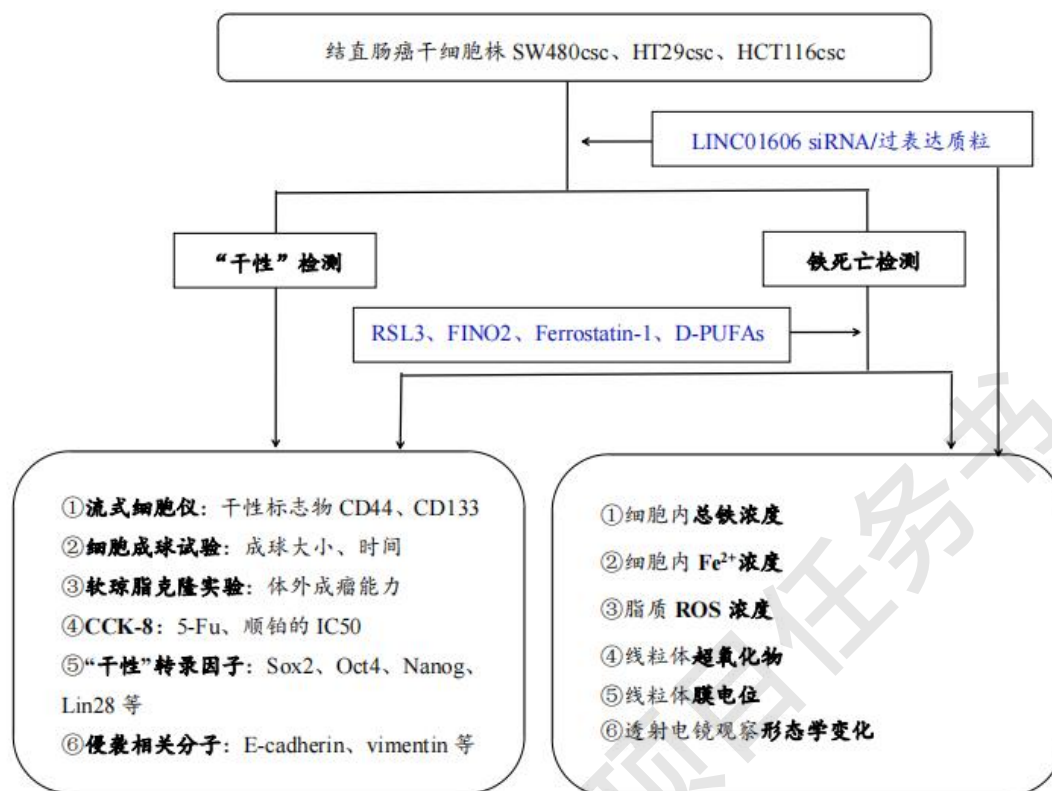
3.1.2.2 明确 LINC01606 调控结直肠癌 CSCs 铁死亡的作用

(1) 在结直肠癌干细胞系 SW480csc、HT29csc 和 HCT116csc 中应用 siRNA 和过表达慢病毒手段分别干扰和过表达 LINC01606, 获得稳定感染后对比 LINC01606 沉默和 LINC01606 过表达的细胞内总铁量、Fe²⁺浓度、脂质 ROS、线粒体超氧化物和线粒体膜电位, 观察细胞形态学变化;

(2) 在上述稳定感染细胞株中, 分别使用铁死亡诱导剂 RSL3、FINO2 和铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1、D-PUFAs 处理 24h 后, 检测细胞内总铁量、Fe²⁺浓度、脂质 ROS、线粒体超氧化物和线粒体膜电位; 以及细胞成球试验、软琼脂实验、CCK-8 检测对 5-FU、顺铂的耐药性及计算 IC₅₀、流式检测干性”标志物 CD44、CD133。利用 Western blot 及 q-PCR 技术检测干性转录因子: Sox2、Oct4、PRRX1、Nanog、Lin28 等, 以及侵袭相关分子: E-cadherin、vimentin 等;

(3) 在结直肠癌干细胞系 SW480csc、HT29csc 和 HCT116csc 中分别使用铁死亡诱导剂 RSL3、FINO2 和铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1、D-PUFAs 处理 24h 后, 检测细胞内总铁量、Fe²⁺浓度、脂质 ROS、线粒体超氧化物和线粒体膜电位; 以及细胞成球试验、软琼脂实验、CCK-8 检测对 5-FU、顺铂的耐药性及计算 IC₅₀、流式检测干性”标志物 CD44、CD133。利用 Western blot 及 q-PCR 技术检测干性转录因子: Sox2、Oct4、PRRX1、Nanog、Lin28 等, 以及侵袭相关分子: E-cadherin、vimentin 等;





技术路线 2a

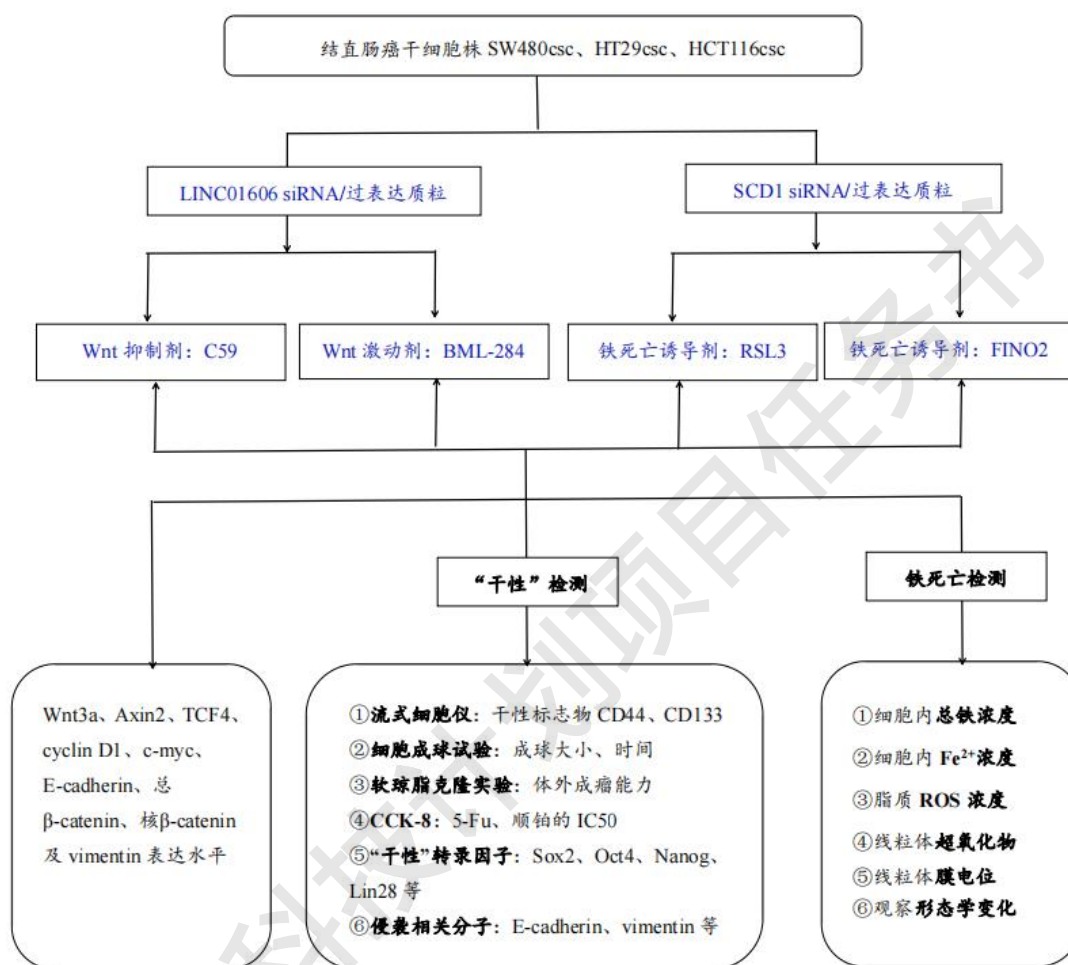
3.1.3 探明 LINC01606-SCD1-Wnt/ β -catenin 正反馈调控环路抑制铁死亡在结直肠癌 CSCs “干性”中的作用

体外研究(见技术路线 3a):

(1) 在结直肠癌干细胞系 SW480csc、HT29csc 和 HCT116csc 中应用 siRNA 和过表达慢病毒手段分别干扰和过表达 LINC01606，获得稳定感染后比较 LINC01606 干扰、SCD1 干扰、LINC01606 过表达、SCD1 过表达以及 LINC01606 干扰+SCD1 过表达、LINC01606 过表达+SCD1 干扰、LINC01606 干扰+SCD1 干扰、LINC01606 过表达+SCD1 过表达、LINC01606 过表达+Wnt3a 过表达+Wnt 抑制剂（C59）、LINC01606 干扰+SCD1 干扰+Wnt 激动剂（BML-284）、LINC01606 过表达+Wnt3a 过表达+铁死亡诱导剂（FINO2、RSL3）、LINC01606 干扰+SCD1 干扰+铁死亡诱导剂（FINO2、RSL3）处理组“干性”指标的变化：①流式细胞仪：干性标志物 CD44、CD133；②细胞成球试验：成球大小、时间；③软琼脂克隆实验：体外成瘤能力；④CCK-8：5-Fu、顺铂的 IC50；⑤“干性”转录因子：Sox2、Oct4、Nanog、Lin28 等；⑥侵袭相关分子：E-cadherin、vimentin 等；以及铁死亡标志物的变化：①细胞内总铁浓度；②细胞内 Fe²⁺ 浓度；③脂质 ROS 浓度；④线粒体超氧化物；⑤线粒体膜电位；



(2) 使用 Western blot 及 q-PCR 技术检测上述处理组中 Wnt 信号分子表达水平: Wnt3a、Axin2、TCF4、cyclin D1、c-myc、E-cadherin、总 β -catenin、核 β -catenin 及 vimentin。



技术路线 3a

在体研究(见技术路线 3b)：

(1) SCID 小鼠皮下成瘤实验

①收集 SW480csc 细胞，消化成单个细胞，分别用过表达 LINC01606 的慢病毒及沉默 LINC01606 的慢病毒以及相应的对照病毒转染细胞；②培养 4d 后，收集细胞，消化成单个细胞， 1×10^3 细胞悬于 0.1ml PBS 中，分四组接种于 4-6 周龄 SCID 小鼠颈部皮下，每组 5 只；③注射后每周观察小鼠 2 次，记录成瘤情况；④到接种后第六周，处死小鼠，记录成瘤情况并收集肿瘤。瘤体称重、摄像，计算肿瘤体积 $V = 1/2 (\text{宽度}^2 \times \text{长度})$ ；⑤应用 Western blot、q-PCR、免疫组化检测 SCD1、Wnt3a、Axin2、TCF4、cyclin D1、c-myc、E-cadherin、总 β -catenin、



核 β -catenin 及 vimentin 的表达。

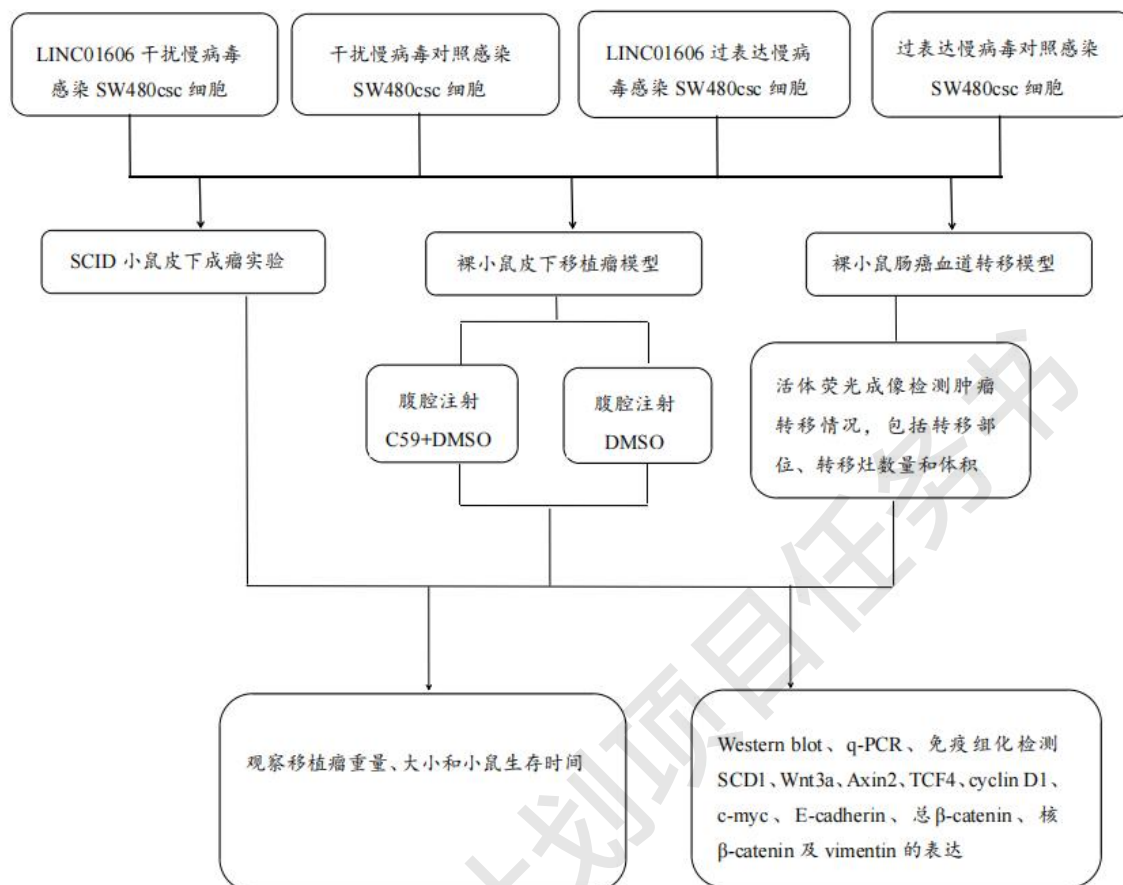
(2) 裸小鼠皮下移植瘤模型

收集 SW480csc 细胞,消化成单个细胞,分别用 LINC01606 沉默、SCD1 沉默、LINC01606 过表达、SCD1 过表达、LINC01606 沉默+SCD1 沉默、LINC01606 过表达+SCD1 过表达、LINC01606 沉默+SCD1 过表达、LINC01606 过表达+SCD1 过表达以及对照慢病毒转染细胞。培养 4 天后,收集细胞,消化成单个细胞, 2×10^6 细胞悬于 0.2ml PBS 中,分两组接种于 6-8 周龄裸小鼠臀部皮下,每组 10 只。各组再分为两组,每组 5 只,分为 C59 (Wnt 抑制剂) $0.5 \mu\text{M}$ 组及对照 DMSO (C59 溶剂) 0.2ml 组,腹腔注射给药,1 次/周;到接种后第六周,处死小鼠,记录成瘤情况并收集肿瘤。瘤体称重、摄像,计算肿瘤体积 $V = 1/2 (\text{宽度}^2 \times \text{长度})$ 。瘤体检测 SCD1、Wnt3a、Axin2、TCF4、cyclin D1、c-myc、E-cadherin、总 β -catenin、核 β -catenin 及 vimentin 的表达。

(3) 裸小鼠结直肠癌血道转移模型

①构建荧光素酶标记过表达 LINC01606、si-LINC01606 (选取干扰效率较高的)的慢病毒以及相应的对照病毒,分别转染 SW480csc 细胞;②培养 4 d 后,收集细胞,消化成单个细胞, 1×10^6 细胞悬于 0.2 ml PBS 中,分四组经裸小鼠尾静脉注射,每周观察小鼠 2 次,记录体重、精神状态等;③一般情况,2 周后开始用小动物活体成像仪检测转移灶大小、数目和部位,2 次/周。④6 周后处死小鼠,应用 Western blot、q-PCR、免疫组化检测转移灶瘤体中 SCD1、Wnt3a、Axin2、TCF4、cyclin D1、c-myc、E-cadherin、总 β -catenin、核 β -catenin 及 vimentin 的表达。





技术路线 3b

4. 预期研究结果

- (1) 阐释 LINC01606-SCD1-Wnt/ β -catenin 正反馈调控环路的机制；
- (2) 明确 LINC01606 在铁死亡及“干性”调控网络中的分子机制；
- (3) 建立荷瘤小鼠模型，体内评价 LINC01606 对“干性”及的影响以及抗肿瘤的效力；
- (4) 发表论文 4 篇左右，SCI 收录的国际期刊发表 2 篇以上，力争单篇论文影响因子 5 以上。并在国际和国内学术会议上进行交流。



补充说明

四川省科技计划项目任务书



三、项目绩效目标和考核目标

技术创新目标

知识产权	发明专利授权 <u> 0 </u> 项，发明专利受理 <u> 0 </u> 项，实用新型专利授权 <u> 0 </u> 项，实用新型专利受理 <u> 0 </u> 项。
技术标准制定	国际标准 <u> 0 </u> 项，国家、行业标准 <u> 0 </u> 项，地方、企业标准 <u> 0 </u> 项
认证、许可	新药证书 <u> 0 </u> 项，新品种审定证书 <u> 0 </u> 项，计算机软件著作权登记证书 <u> 0 </u> 项，计量许可证书 <u> 0 </u> 项，计量型式证书 <u> 0 </u> 项，新药临床批件 <u> 0 </u> 件，三类医疗器械注册受理证明 <u> 0 </u> 件，三类医疗器械临床试验许可 <u> 0 </u> 件
论文专著	公开发表 <u> 3 </u> 篇，引用 <u> 0 </u> 次，出版专著 <u> 0 </u> 部。

社会效益目标

形成的公益性贡献、价值和可持续影响	本课题将围绕结直肠癌代谢异常的科学核心问题，探讨不同阶段的肿瘤病人，尤其是晚期病人及进展的病人脂肪酸的代谢状态，及其与铁死亡的关系，通过靶向脂肪酸代谢联合临床一线治疗，提出潜在的靶向治疗方法，为临床结直肠癌治疗提供新的思考和潜在的治疗手段。
-------------------	--

人才培养目标

高端人才	院士 <u> 0 </u> 人，享受国务院政府特殊津贴专家 <u> 0 </u> 人，国家杰出青年科学基金 <u> 0 </u> 人，全国杰出专业技术人才 <u> 0 </u> 人，长江学者 <u> 0 </u> 人，新世纪优秀人才 <u> 0 </u> 人，省有突出贡献的优秀专家 <u> </u> 人，省学术和技术带头人 <u> 0 </u> 人，省学术和技术带头人后备人选 <u> 0 </u> 人，其他国家级高层次人才 <u> 0 </u> 人，其他省级高层次人才 <u> </u> 人。
职称晋升	高级 <u> 1 </u> 人，中级 <u> 1 </u> 人。
学位人才	在读博士后 <u> 0 </u> 人，在读博士研究生 <u> 0 </u> 人，在读硕士研究生 <u> 0 </u> 人，毕业博士后 <u> 1 </u> 人，毕业博士研究生 <u> 1 </u> 人，毕业硕士研究生 <u> 1 </u> 人，毕业学士 <u> 0 </u> 人。

科技报告的呈交情况

进展报告	年度报告 <u> 1 </u> 篇，中期报告 <u> 1 </u> 篇
最终报告	<u> 1 </u> 篇

关键核心考核指标(在上述指标中选择2-3项，人才培养目标必选)

论文专著、人才培养目标

四、计划进度和阶段目标（以半年为单位，叙述项目的进度安排和阶段目标任务。）

开始时间	结束时间	阶段目标
2023-01-01	2023-06-30	明确LINC01606调控SCD1的作用关系；探明LINC01606-SCD1轴调控Wnt/ β -catenin信号的机制；
2023-07-01	2023-12-31	探明LINC01606-SCD1-Wnt/ β -catenin正反馈调控环路抑制铁死亡在结直肠癌“干性”中的作用；



2024-01-01	2024-06-30	SCID小鼠皮下成瘤实验、裸小鼠皮下移植瘤模型及裸小鼠结肠癌血道转移模型，分析LINC01606及SCD1调控干细胞的“干性”作用；
2024-07-01	2024-12-31	数据整理、分析、作图，论文写作及投稿。

四川省科技计划项目任务书



五、项目主要研究人员基本情况表

姓名	所在单位	职称	累计为本项目 工作时间 (人月)	聘用人员
易波	四川省肿瘤医院	中级	5	是
潘涛	四川省肿瘤医院	中级	8	是
陈新	四川省肿瘤医院	中级	8	是
饶露蓓	四川省肿瘤医院	初级	10	是
李玉苹	四川省肿瘤医院	初级	10	是
刘宥苒	四川省肿瘤医院	其他	10	否



六、项目经费预算

项目经费预算表（表1）

单位：万元

序号	预算科目名称	财政科技经费	自筹经费	合计
1	一、经费支出	10	0	10
2	（一）直接费用	8.5	0	8.5
3	1、设备费	0	0	0
4	（1）购置设备费			
5	（2）试制设备费/设备改造费/设备租赁费			
6	2、业务费	8.5	0	8.5
7	3、劳务费	0	0	0
8	（二）间接费用	1.50	0	1.50
9	其中：绩效支出	1.05	0	1.05
10	二、经费来源	10	0	10
11	1、申请项目专项经费	10	/	10
12	2、自筹经费	/	0	0
13	其中：非同级其他财政经费	/	0.00	0.00

经费拨付进度（单位：万元）

科目	总经费	第一年	第二年	第三年	第四年	第五年
财政经费	10	10	0	0	0	0
承诺自筹	0	/	/	/	/	/



项目经费支出预算分解表(表2)

序号	单位名称	社会信用代码	单位类型	任务分工	任务负责人	合计	专项经费		自筹经费
							小计	其中:间接费用	
1	四川省肿瘤医院	12510000450723900G	A、承担单位	项目的基础实验及动物实验	罗雅军	10.00	10.00	1.50	0.00
累计						10.00	10.00	1.50	0.00

填表说明:单位类型分为: A、牵头单位(即项目第一承担单位); B、合作单位(即合作承担单位); 同一承担或合作单位若有多个项目组共同参与本项目研究任务的, 应在“任务分工”“项目负责人”栏分别列示。



各科目预算说明表（表3）

（一）设备费

设备费主要列支项目实施过程中购置或试制专用仪器设备，对现有仪器设备进行升级改造，以及租赁使用外单位仪器设备而发生的费用。计算类仪器设备和软件工具可在设备费科目列支。

（1）购置设备费

单台50万元及以上设备费

设备名称	规格/型号	与研究任务的相关性	测算说明	金额	专项经费	自筹经费
------	-------	-----------	------	----	------	------

单台50万元以下设备费

设备名称	与研究任务的相关性
合计：专项经费 万元，自筹经费 万元，总经费 万元。	

（2）试制设备费/设备改造费/设备租赁费

单台50万元及以上设备费

设备名称	类型	规格/型号	与研究任务的相关性	测算说明	金额	专项经费	自筹经费
------	----	-------	-----------	------	----	------	------

单台50万元以下设备费

设备名称	类型	与研究任务的相关性
合计：专项经费 0 万元，自筹经费 0 万元，总经费 0 万元。		

（二）业务费

业务费主要列支项目实施过程中消耗的各种材料、辅助材料等低值易耗品的采购、运输、装卸、整理等费用，发生的测试化验加工、燃料动力、出版/文献/信息传播/知识产权事务、会议/差旅/国际合作交流等费用，以及其他相关支出。

（1）材料费

材料类型	材料名称	与研究任务的相关性
主要材料	TFE3干扰及过表达慢病毒	构建TFE3敲低及过表达的稳态肠癌细胞株 干扰病毒1.00万及过表达病毒1.00万元，总共1.70万元
主要材料	铁死亡指标检测试剂盒	检测细胞内铁、线粒体膜电位、线粒体超氧化物、脂质ROS 每个0.2万元*4=0.8万元
合计：专项经费 2.50 万元，自筹经费 0 万元，总经费 2.50 万元。		

（2）测试化验加工费



加工或测试内容	与研究任务的相关性
Chip-seq、转录组测序	检测TFE3与LINC01606启动子结合的情况 1.8万元
非靶标脂代谢检测	检测TFE3对短中长链脂肪酸的调控 1.2 万元
透射电镜、激光共聚焦	检测铁死亡的形态学变化 1.0万元
合计:专项经费 4.00 万元, 自筹经费 0 万元, 总经费 4.00 万元。	

(3) 燃料动力费

设备名称	与研究任务的相关性
合计:专项经费 0 万元, 自筹经费 0 万元, 总经费 0 万元。	

(4) 会议费/差旅费/国际合作交流费

合计:专项经费 万元, 自筹经费 0 万元, 总经费 万元。	
--------------------------------	--

(5) 出版/文献/信息传播/知识产权事务费

费用名称	与研究任务的相关性
出版/文献	发表SCI论文一篇版面费1.5 万元, CSCD论文一篇0.5万元, 总费用2.0万元
合计:专项经费 2.00 万元, 自筹经费 0 万元, 总经费 2.00 万元。	

(6) 其他支出

费用名称	与研究任务的相关性
合计:专项经费 万元, 自筹经费 万元, 总经费 万元。	

(三) 劳务费

劳务费主要列支项目实施过程中支付给参与项目的研究生、博士后、访问学者和项目聘用的研究人员、科研辅助人员等的劳务性费用; 以及支付给临时聘请的咨询专家的费用等。

劳务费开支标准, 参照当地科学研究和技术服务业从业人员平均工资水平, 根据项目聘用人员在项目研究中承担的工作任务确定。

项目聘用人员所需人力成本可通过劳务费科目列支, 包括项目聘用人员社会保险补助、住房公积金等。

(1) 聘用人员

聘用人员	参与的研究任务(承担的具体工作)
其他	
合计:专项经费 万元, 自筹经费 0 万元, 总经费 万元。	



(2) 专家咨询费

咨询形式	与研究任务的相关性
合计:专项经费 万元，自筹经费 万元，总经费 万元。	

(四) 间接费用

本项目专项经费中间接费用预算为 1.50 万元，其中绩效支出核定为 1.05 万元。

四川省科技计划项目任务书



七、项目牵头单位承诺书

1. 我单位保证在项目实施（包括项目申请、评估评审、检查、项目执行、资源汇交、验收等过程）中所提交的材料真实、准确、有效。

2. 我单位将严格履行《四川省科技计划管理办法》、《四川省科技计划项目专项资金管理办法》等项目及经费管理办法文件规定，组织实施管理机构的职责和《项目任务书》中的各项约定，承诺项目经费专款专用、单独核算，为项目实施提供必要的条件和进行有效的管理与监督。

3. 我单位保证严肃调查处理或配合相关调查机构调查处理在实施项目过程中发现的科研不端行为，并及时向推荐单位和四川省科技厅报告相关调查处理结果。

4. 我单位已对任务书的内容和密级进行了审核，项目所属密级符合《中华人民共和国保守国家秘密法》、《科学技术保密规范》及《对外科技交流保密提醒制度》中的密级要求和条件，保证严格遵守国家有关保密规定，在科研活动和对外合作中不泄露国家秘密。

5. 我单位保证在项目执行期间及时做好科技报告的呈交工作，在项目完成后1年内做好项目验收工作，如项目通过验收，及时做好项目的科技成果登记工作。

6. 我单位已按照《国家科技计划（专项、基金等）严重失信行为记录暂行规定》的要求建立了规范科研行为、调查处理科研不端行为的相关制度，并自愿接受监督。

（项目牵头单位盖章）

年 月 日



八、项目负责人承诺书

1. 本人承诺在项目实施（包括项目评估评审、检查、项目执行、资源汇交、验收等过程）中，遵守科学道德和诚信要求，严格执行《四川省科技计划项目管理办法》、《四川省科技计划项目专项资金管理办法》等相关科技计划管理及经费管理办法规定和《项目任务书》中的约定，不发生下列科研不端行为：

- （1）在职称、简历以及研究基础等方面提供虚假信息；
- （2）抄袭、剽窃他人科研成果；
- （3）捏造或篡改科研数据；
- （4）在涉及人体研究中，违反知情同意、保护隐私等规定；
- （5）违反科研伦理和实验动物管理规范；
- （6）其他科研不端行为。

2. 如本人被举报在项目实施中存在科研不端行为，将积极配合相关调查机构组织开展的调查。

3. 本人承诺严格遵守《中华人民共和国保守国家秘密法》、《科学技术保密规范》及《对外科技交流保密提醒制度》，在科研活动和对外合作中不泄露国家秘密。

项目负责人签字：

年 月 日



九、任务书签订各方盖章及意见

甲方	单位名称	四川省科学技术厅	(项目合同章) 年 月 日
	分管厅领导	(签章)	
	分管处室负责人	(签章)	
	项目管理人	喻茹	
	电话及传真	86729286	
乙方	牵头单位名称	四川省肿瘤医院	(牵头单位公章) 年 月 日
	地址及邮编	成都市人民南路4段55号, 610041	
	电话及传真	85420010	
	开户银行	建行成都金河支行	
	帐 号	51050150860809996666	
丙方	推荐单位名称	四川省卫生健康委员会	(单位公章) 年 月 日
	电话及传真		



十、附加条款

1. 任务各方共同遵守《四川省科技计划管理办法》、《四川省科技计划项目专项资金管理办法》等相关管理的办法，以下简称《办法》，并自愿接受其约束。
2. 任务书下达后，项目负责人全面负责项目的实施工作，各成员必须严格履行相应职责。
3. 在项目实施过程中，如变更牵头单位、项目负责人、项目执行期、项目主要研究目标和考核指标等重大调整事项，由牵头单位书面申请，推荐单位审核提出意见，报科技厅同意后调整。变更合作单位，由项目牵头单位自主调整。变更项目研究方案、技术路线、项目参与人员等，由项目负责人自主调整后，报项目牵头单位备案。
4. 乙方必须接受甲方对项目进度及经费使用的监督和检查，并按甲方要求及时提供相关执行情况报告和相关统计报表，逾期不报，甲方有权暂停资助或终止项目。
5. 乙方应遵守任务书的约定，及时呈送符合撰写标准的科技报告，并获得科技报告收录证明。乙方可根据项目具体情况提出科技报告的保密和解密期限要求。乙方应在项目验收后按规定进行成果登记。
6. 任务到期完成后，乙方必须在三个月内完成验收准备，主动提交验收材料，并在任务到期后1年内完成项目验收手续。项目验收评价结论分为优秀、合格和不合格。不合格的项目，暂停项目负责人3年项目申报资格，并通报推荐单位。
7. 项目到期1年后仍未完成验收评价工作的，由甲方撤销项目。项目牵头单位（含法人代表）和项目负责人，取消其四川省科技计划项目申报资格，并通报推荐单位。
8. 牵头单位按时间按规定负责将需退回的项目资金先行垫足经原渠道退回财政。
9. 推荐单位作为任务书中的丙方加盖公章，负责协调项目的组织实施、经费使用及监督检查中出现的有关问题。
10. 项目的研究成果及其形成的知识产权归项目承担单位所有。在特定情况下，国家根据需要保留无偿使用、开发、使之有效利用和获取收益的权利。乙方申报成果、专利、发表论文时需注明由“四川省科技计划资助”（英文标注：“Supported by Sichuan Science and Technology Program”）。乙方因实施本项目而引起的各种知识产权纠纷由乙方负全部责任。
11. 乙方对项目执行过程中产生的研究成果须及时采取知识产权保护措施，依法取得相关知识产权，并予以有效管理和充分使用。
12. 乙方指定项目组成员_____为本项目档案员，负责本项目档案的收集、积累和保存工作，要做到随时收集、编号登记、入袋保管，归档的重点是项目各个阶段形成的不同载体的文件材料和技术资料，特别是研究实验阶段形成的作为成果依据的原始材料。
13. 乙方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，并对科研安全负全部责任。
14. 乙方在项目实施过程中，应遵守科研诚信、科技行为廉洁的有关规定，不得向甲方、丙方工作人员行贿或报销应由个人支付的任何费用，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。
15. 任务书是对签订各方都有法定约束力的协议，自各方签字盖章之日起正式生效，若有争议或纠纷，按照《办法》有关条款处理。





219

申报编号: 22NSFSC1850

立项编号: 2022NSFSC0050

四川省自然科学基金项目任务书 (重点项目)

靶向调控SLC7A11经由SLC7A11-GSH-GPX4轴促进耐药

项目名称: 胃癌细胞铁死亡逆转获得性耐药的机制研究

承担单位: 成都医学院第一附属医院 (盖章)

项目负责人: (签字)

推荐单位: 省卫生健康委

立项经费: 40 (万元)

项目起止年限: 2022-01-01 至 2024-12-31

四川省科学技术厅制

靶向调控SLC7A11经由SLC7A11-GSH-GPX4轴促进耐药胃癌细胞铁死亡逆转获得性耐药的机制研究

任务书填写和打印说明

- 填写任务书各项内容应实事求是, 认真填写, 表述明确。外来语要同时用原文和中文表达, 第一次出现的缩略词, 须注明全称。
- 任务书各个部分都必须填写, 原则上不能有空白; 确实无法填写的内容, 请填写“无”或“0”。
- 任务书是项目牵头单位向合作单位拨付经费、中期检查、绩效评价(验收)的依据。任务书的内容应参照项目申报书填写, 各项指标不能调减, 可以调增。
- 任务书必须通过四川省科技信息管理系统在线填写、上报, 并经承担单位、推荐单位和四川省科技厅审核通过后签订, 必须确保网上的四川省科技信息管理系统电子文档与最终打