



项目批准号	81660399
申请代码	H1617
归口管理部门	
依托单位代码	65003108A0616-1140



816603991003927

# 国家自然科学基金委员会 资助项目计划书

资助类别：地区科学基金项目

亚类说明：

附注说明：

项目名称：膜相关鸟苷酸激酶Dlg5通过Girdin/Tks5轴调节肝细胞癌侵袭性伪足形成的机制研究

直接费用：37万元 执行年限：2017.01-2020.12

负责人：王琳

通讯地址：云南省昆明市呈贡新城雨花街道春融西路1168号

邮政编码：650500 电 话：13888294845

电子邮件：wanglinghjt@hotmail.com

依托单位：昆明医科大学

联系人：王振宇 电 话：0871-65922935

填表日期：2016年08月24日

国家自然科学基金委员会制



## 国家自然科学基金委员会资助项目计划书填报说明

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



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



简表

申请者信息	姓 名	王琳	性 别	男	出生年月	1968年07月	民 族	汉族
	学 位	博士			职称	教授		
	电 话	13888294845		电子邮件	wanglinghjt@hotmail.com			
	传 真	0871-65334416		个人网页				
	工 作 单 位	昆明医科大学						
	所 在 院 系 所	第二附属医院						
依托单位信息	名 称	昆明医科大学					代码	65003108A0616
	联 系 人	王振宇		电子邮件	kykych@163.com			
	电 话	0871-65922935		网站地址				
合作单位信息	单 位 名 称							代 码
项目基本信息	项 目 名 称	膜相关鸟苷酸激酶Dlg5通过Girdin/Tks5轴调节肝细胞癌侵袭性伪足形成的机制研究						
	资 助 类 别	地区科学基金项目			亚 类 说 明			
	附 注 说 明							
	申 请 代 码	H1617:消化系统肿瘤			H1606:肿瘤复发与转移			
	基 地 类 别							
	执 行 年 限	2017.01-2020.12						
	直 接 费 用	37万元						



## 项目摘要

### 中文摘要(500字以内):

侵袭性伪足在肿瘤侵袭转移中起关键作用,但其形成的分子机制尚不完全清楚。研究表明促肿瘤侵袭分子Girdin (Girders of actin filaments) 与酪氨酸激酶底物Tks5 (Tyrosine kinase substrate with five SH3 domains) 相互作用可促进侵袭性伪足形成;课题组发现敲低膜相关鸟苷酸激酶家族成员Dlg5 (Discs large homolog 5) 表达也能促进肝癌细胞侵袭性伪足形成,且肝癌组织普遍Dlg5表达降低。项目拟研究Dlg5是否通过Girdin/Tks5调控侵袭性伪足形成。拟采用已有肿瘤数据库、肝癌组织标本、肝癌细胞系及基因敲低和过表达技术,研究Dlg5如何调控Girdin和Tks5相互作用及活化,进而是否影响体外肝癌细胞侵袭性伪足的形成以及体内肝癌的生长和转移。预期研究结果对理解肝癌细胞侵袭和转移、发现新诊治靶标具有重要意义。

**关键词:** 肝和肝内胆管肿瘤; 侵袭性伪足; 大盘基因同源物5; 肌动蛋白细丝桥梁蛋白; 含5个SH3域的酪氨酸激酶底物

### Abstract(limited to 4000 words):

Invasion and metastasis are important features of hepatocellular carcinoma (HCC) and greatly impact the prognosis of HCC patients. Recent studies have shown that tumor cell invasion is closely related to a special cell structure invadopodia. However, the mechanisms underlying the regulation and function of invadopodia in HCC invasion and metastasis remain unexplored. Our preliminary experiments indicated the potential role of Discs large homolog 5 (Dlg5) in HCC metastasis. Dlg5 expression was significantly lower in HCC tissues compared to neighboring non-tumor tissues, and was negatively correlated with the stage of HCC. Moreover, Dlg5 expression was significantly lower in high invasive HCC cell lines such as SK-Hep1 and MHCC97-H than in low invasive HCC cell lines such as HepG2 and MHCC97-L. In addition, knockdown of Dlg5 led to epithelial-mesenchymal transition of HepG2 cells, promoting the formation of invadopodia and the degradation of matrix. Evidence from our group and others suggests that Girders of actin filaments (Girdin), a bona fide metastasis-related protein, can interact with and activate tyrosine kinase substrate with five SH3 domains (Tks5), which is recognized as a “molecular switch” that directs invadopodium formation. Interestingly, a recent study reported that Dlg5 interacted with and inhibited the activity of Girdin, thereby suppressing the migration of prostate cancer cells. Therefore, we hypothesized that Dlg5 modulates Girdin/Tks5 pathway to inhibit the formation and function of invadopodia in HCC, finally impede HCC invasion and metastasis. To confirm our hypothesis, we will employ HCC specimens, HCC cell lines and xenografts in nude mice as in vitro and in vivo models. In clinical research, we will perform immunohistochemistry and qRT-PCR assays to detect the expression Dlg5 and Girdin in more than 60 pairs of primary HCC tissues and matched adjacent tissues. The relationship of Dlg5 and Girdin expression will be analyzed using Spearman method. The Cox proportional-hazards regression model will be established to analyze the relationship of Dlg5 expression and different clinic-pathological features including BCLC stage, and the influence of Dlg5 expression on the prognosis of HCC patients will be analyzed using Kaplan-Meier method. Then HCC cells will be transfected with different constructs, such as expression vectors or siRNA (or shRNA). The malignant phenotypes of HCC cells will be examined such as cell proliferation,



migration and invasion as well as the formation and function of invadopodia. The growth and metastasis of HCC cells derived from xenografts will be examined in nude mice. Mechanistically, co-immunoprecipitation and immunofluorescence assay will be performed to confirm the interactions among Dlg5, Girdin, and Tks5. It is expected that these experiments will help elucidate the molecular mechanism by which Dlg5 inhibits the metastasis of HCC, and identify novel diagnostic biomarkers and therapeutic targets for HCC to improve the prognosis of HCC patients.

**Keywords:** Hepatocellular carcinoma; Invadopodium; Discs large homolog 5; Girders of actin filaments; Tyrosine kinase substrate with five SH3 domains



## 项目组主要成员

编号	姓名	出生年月	性别	职称	学位	单位名称	电话	证件号码	项目分工	每年工 作时间 (月)				
1	王琳	1968. 07	男	教授	博士	昆明医科大学	13888294845	310104196807052858	项目负责 人	6				
2	朱红	1963. 04	女	主任医师	博士	昆明医科大学	13888232207	530112196304223249	western blot及qRT-PCR检测	6				
3	戈佳云	1975. 11	男	副主任医师	博士	昆明医科大学	13708446277	420104197511251612	免疫共沉淀、荧光共定位检测	6				
4	柯阳	1988. 12	男	博士生	硕士	昆明医科大学	15808875159	530111198812184410	细胞培养，荧光共定位，统计分析	8				
5	鲍天昊	1982. 04	男	博士后	博士	昆明医科大学	13700657351	231181198204030011	细胞，病理组织学，荧光共聚焦显微镜检测	8				
6	吴雪松	1973. 10	男	讲师	硕士	昆明医科大学	18669207351	533222197310100099	病理学检测	6				
7	施智甜	1986. 10	女	医师	硕士	昆明医科大学	13987136766	530425198610041723	质粒转染，免疫共沉淀	6				
8	张成	1990. 11	男	硕士生	学士	昆明医科大学	18213539684	53230119901101001X	裸鼠实验，影像学检查	8				
9	谭宇棋	1988. 05	男	硕士生	学士	昆明医科大学	15508710432	220621198805160530	动物实验，影像学检测，病理学检测	8				
10	陈浩天	1992. 04	男	硕士生	学士	昆明医科大学	15105307057	372928199204180018	临床标本收集；裸鼠模型建立	8				
总人数			高级		中级		初级		博士后		博士生		硕士生	



10	3	1	1	1	1	3
----	---	---	---	---	---	---





## 国家自然科学基金项目直接费用预算表（定额补助）

项目批准号：81660399

项目负责人：王琳

金额单位：万元

序号	科目名称	金额
1	一、项目直接费用	37.0000
2	1、设备费	0.0000
3	(1)设备购置费	0.00
4	(2)设备试制费	0.00
5	(3)设备改造与租赁费	0.00
6	2、材料费	27.5000
7	3、测试化验加工费	3.0000
8	4、燃料动力费	0.0000
9	5、差旅/会议/国际合作与交流费	1.3000
10	6、出版/文献/信息传播/知识产权事务费	0.9000
11	7、劳务费	4.3000
12	8、专家咨询费	0.0000
13	9、其他支出	0.00
14	二、自筹资金	0.00



## 预算说明书（定额补助）

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

本项目资金共 37.0000 万元，其中直接费用共 37.0000 万元，具体预算：

（1）设备费 0 万元。

（2）材料费 27.5000 万元。

①细胞培养液，胎牛或小牛血清等细胞培养试剂 3.47 万元；

②Western blot、免疫组织化学、免疫共沉淀及免疫荧光染色抗体，主要包括：anti-Dlg5、anti-Girdin、anti-pGirdin、anti-Tks5、anti-pTks5、anti-FAK、anti-pFAK、anti-Src、anti-pSrc、anti- $\beta$ -tubulin；抗鼠、抗兔或抗羊单克隆或多克隆二抗抗体；ECL 显色剂或荧光显色剂等 9.56 万元；

③RNA/DNA/蛋白纯化相关试剂，qRT-PCR 试剂盒，分子克隆相关试剂，转染试剂（Lipofectamine 3000）2.60 万元；

④免疫共沉淀试剂盒、MTT 试剂盒、Transwell 迁移/侵袭试剂盒 3.47 万元；

⑤侵袭性伪足实验用普通明胶，荧光明胶，Phalloidin、DAPI 等荧光染料，荧光共聚焦显微镜培养皿等 2.60 万元；

⑥TGF $\beta$ 1 及其抑制剂 1.38 万元；

⑦免疫缺陷雄性 BALB/c 裸小鼠购买及运输 200 元/只，60 只，SPF 级饲养平均价格 8.0 元/只天，平均饲养周期 40 天，共 60 只 $\times$ （200 元/只+8.0 元/只天 $\times$ 40 天）=3.12 万元；

⑧其他：PCR 管，离心管，移液管，枪头，注射器，冻存管，一次性口罩、帽子、医用酒精、新洁尔灭等消耗性器材 1.30 万元。

（3）测试化验加工费 3.00 万元。

①生物信息学挖掘 0.40 万元 $\times$ 1 次=0.40 万元

②免疫荧光共聚焦荧光显微镜 800 元/小时 $\times$ 20 小时=1.60 万元

③人体及裸鼠组织标本病理检测分析 50 元/张 $\times$ 200 张=1.00 万元



(4) 差旅费 1.30 万元，参与外埠与本课题相关的各种形式的学术交流。

(5) 会议费 0 万元。

(6) 国际合作与交流费 0 万元。

(7) 出版/文献/信息传播/知识产权事务费 0.90 万元。

(8) 劳务费 4.30 万元。

用于直接参与项目研究的研究生劳务费用，3 名硕士研究生参加本课题，按 2 年支付费用，每人每月 437.5 元，共计支付： $437.5 \text{ 元/月} \times 8 \text{ 月} \times 2 \text{ 年} \times 3 \text{ 人} = 2.10 \text{ 万元}$ 。  
1 名博士生及 1 名博士后参加本课题，按 2 年支付费用，每人每月 687.5 元，共计支付： $687.5 \text{ 元/月} \times 8 \text{ 月} \times 2 \text{ 年} \times 2 \text{ 人} = 2.2 \text{ 万元}$ 。

(9) 专家咨询费 0 万元。

本项目自筹资金 0 万元。

项目负责人签字：

科研部门公章：

财务部门公章：



## 报告正文

研究内容和研究目标按照申请书执行。



## 国家自然科学基金资助项目签批审核表

	<p>我接受国家自然科学基金的资助，将按照申请书、项目批准意见和计划书负责实施本项目（批准号：81660399），严格遵守国家自然科学基金委员会关于资助项目管理、财务等各项规定，切实保证研究工作时间，认真开展研究工作，按时报送有关材料，及时报告重大情况变动，对资助项目发表的论著和取得的研究成果按规定进行标注。</p> <p>项目负责人（签章）： 年 月 日</p>	<p>我单位同意承担上述国家自然科学基金项目，将保证项目负责人及其研究队伍的稳定和研究项目实施所需的条件，严格遵守国家自然科学基金委员会有关资助项目管理、财务等各项规定，并督促实施。</p> <p>依托单位（公章） 年 月 日</p>					
本栏目由基金委填写	<p>科学处审查意见：</p>						
	<p>建议年度拨款计划（本栏目为自动生成，单位：万元）：</p>						
	年度	总额	第一年	第二年	第三年	第四年	第五年
	金额						
	<p>科学部审查意见：</p> <p>负责人（签章）： 年 月 日</p>						
本栏目主要用于重大项目等	<p>相关局室审核意见：</p> <p>负责人（签章）： 年 月 日</p>						
	<p>委领导审批意见：</p> <p>委领导（签章）： 年 月 日</p>						