

安徽省科学技术厅文件

皖科基奖〔2019〕13号

关于下达 2019 年度安徽省自然科学基金 项目计划的通知

各依托单位：

根据《安徽省自然科学基金管理办法》规定，现将 2019 年度安徽省自然科学基金项目计划下达给你们。本次立项项目 705 项，其中杰青项目 30 项、面上项目 294 项、青年项目 381 项。

请各依托单位接此通知后，及时组织项目承担人严格按照项目申报书的内容，于 2019 年 3 月 22 日—4 月 19 日登录省科技管理信息系统(<http://kjgl.ahinfo.gov.cn/egrantweb/>)，完成项目计划任务书网上填写，由依托单位审核提交，经省科技厅确认通

- 1 -



扫描全能王 创建

过后，再一式四份打印，由依托单位统一提交纸质文本。项目任务书的签定工作须于 2019 年 4 月 26 日前完成，逾期视为自动放弃。

联系人：谢敏、王积成，联系电话：0551-62677732、62659625
信息系统咨询电话：400-161-6289、0551-62654951

附件：2019 年度安徽省自然科学基金项目表



1908085MH262	KIRREL 基于 PI3K/AKT 信号通路调控胃癌血管生成的作用及机制	张明军	安徽医科大学
1908085MH263	肿瘤微环境响应的水凝胶载体程序释放化疗药物、免疫抗体及新型光动力诊疗剂协同增强抗肿瘤效应的研究	陈静	合肥师范学院
1908085MH264	VraSR 通过 H1b 调控巨噬细胞自噬促进金黄色葡萄球菌免疫逃逸的分子机制研究	戴媛媛	安徽省立医院
1908085MH265	马拉松运动后血管内皮功能变化与颈动脉血流动力学因素的关联机制研究	李艳蕾	中国科学院合肥物质科学研究院
1908085MH266	解毒化浊祛瘀方调控 PI3K-Akt-mTOR 信号通路抑制肝星状细胞自噬改善 Wilson 病 TX 小鼠肝纤维化的机制研究	吴鹏	安徽中医药大学
1908085MH267	基于 Wnt/ β -catenin 信号通路研究丹蛭降糖胶囊对糖尿病血管钙化的影响及机制	倪英群	安徽中医药大学
1908085MH268	青蒿素在黄花蒿体内特异合成分子机理的研究	邢世海	安徽中医药大学
1908085MH269	新型高选择性 AT2 受体激动剂的研究	张艳春	安徽中医药大学
1908085MH270	吞蛋白 A2 调节自噬在神经炎症中的作用及鸡豆黄素 A 的调节作用	尹艳艳	安徽医科大学
1908085MH271	TXNIP/NLRP3 经 RANKL 轴调节破骨细胞分化的分子机制	谢强	安徽省立医院
1908085MH272	细胞穿透肽 iRGD 靶向的纳米载药系统构建及其在乳腺癌靶向治疗中的应用研究	李丽华	皖南医学院
1908085MH273	P62-HDAC6 介导的选择性细胞自噬在肺缺血再灌注损伤中的作用机制	陈齐	安徽医科大学
1908085MH274	T 细胞协同刺激分子在肠道微生物群介导的早产小鼠细胞免疫应答中的作用机制	张士发	皖南医学院
1908085MH275	Twist 结合 Wnt5a 信号通路调控 EMT 在子宫内膜癌侵袭转移中的作用及机制	冯振中	蚌埠医学院
1908085MH276	miR-185-3p 靶向 TRAF3 基因调控破骨细胞分化的作用机理研究	付应霄	蚌埠医学院
1908085MH277	RFWD2 调控小鼠大脑皮层神经元树突棘及突触形成的作用机制研究	郭保	蚌埠医学院
1908085MH278	Nrf2 调控内质网相关的蛋白质降解在甲基苯丙胺成瘾机制中的研究	焦东亮	蚌埠医学院
1908085MH279	IL-34 在 1 α , 25(OH)2D3 治疗阿尔茨海默病中的作用	应松成	安徽医科大学
1908085MH280	乳源多肽 PGPIP 通过诱导巨噬细胞自噬抑制 Toll 样受体激活介导的炎症反应	戚楠	安徽医科大学



蚌埠医学院文件

院字（2017）220号

关于下达 2017 年度 蚌埠医学院科研课题计划的通知

各学院、系部，各直属附属医院及各相关部门：

为促进培育开拓新科研方向和培养中青年科技人员的科研能力，根据《关于做好 2017 年度蚌埠医学院科研项目申报的通知》和《蚌埠医学院科研计划管理条例》精神，经专家评审，校学术委员会审议批准同意，确定 291 项科研课题列入蚌埠医学院 2017 年度科研课题计划。自然科学类项目 248 项，其中重点项目 172 项（含自然科学基金重点项目 50 项、科技发展基金项目 122 项），面上项目 76 项；人文社会科学类 43 项，其中，重点项目 20 项，面上项目 16 项，思政专项 2 项，辅导员专项 5 项。研究经费为自然科学类重点项目 2.0 万元、面上项目 1.0 万元；人文社会科学类重点项目 0.8 万元、面上项目 0.4 万元，思政专项、辅导员专项项目专项 0.4 万元，研究年限为 2017 年 11 月至 2019 年 10 月。现予以公布。

课题承担部门要做好科研课题的管理，确保课题顺利开展；课题负责人须严格执行科研项目管理的有关规定，合理使用科研经费，发表论文应标注项目计划来源，按时履行结题程序。

特此通知。

附件：1. 蚌埠医学院自然科学类项目

2. 蚌埠医学院人文社会科学类项目



附件1：蚌埠医学院自然科学类项目

编号	项目名称	姓名	所属部门	项目类型	备注
BYKF1701	新型水溶性光热治疗剂的研制	韦正友	公共基础学院	科技发展基金项目	
BYKF1702	核磁共振环境下陶瓷医疗器械的研制和应用研究	杨俊松	公共基础学院	科技发展基金项目	博士启动基金
BYKF1703	多孔TaON半导体的制备及其光催化选择性氧化苯甲醇作用	陈艳	公共基础学院	科技发展基金项目	博士启动基金
BYKF1704	发光性三价金属铽卟啉化合物作为抗癌药物研究与应用	华莉娟	公共基础学院	科技发展基金项目	博士启动基金
BYKF1705	虫草素对人舌癌Tca8113细胞增殖、凋亡的影响及机制研究	郑庆委	基础医学院	科技发展基金项目	
BYKF1706	基于TGF- β /Smad信号通路探讨金雀异黄酮对糖尿病大鼠心肌纤维化的保护作用机制	贾强	基础医学院	科技发展基金项目	
BYKF1707	Snail在三阴性乳腺癌EMT发生和VM形成中的作用和机制	龚晓萌	基础医学院	科技发展基金项目	
BYKF1708	趋化因子受体CCR7对VEGF-D介导的乳腺癌淋巴转移机制研究	赵云霞	基础医学院	科技发展基金项目	
BYKF1709	自噬在L型结核杆菌调节树突状细胞免疫应答中的作用机制研究	韦莉	基础医学院	科技发展基金项目	博士启动基金
BYKF1710	Wnt5a信号通路调控EMT抑制子宫内膜样腺癌侵袭转移的研究	冯振中	基础医学院	科技发展基金项目	博士启动基金

科研处



扫描全能王 创建

重大科研项目 申 请 书

项目名称： 联合调控 Twist 和 Wnt5a 对子宫内膜
癌侵袭转移的抑制作用及机制研究

申 请 者： 冯振中

所在部门： 基础医学院

合作单位名称：

蚌埠医学院
二〇一八年制

一、研究内容和意义（摘要）研究意义

子宫内膜癌是女性生殖道最常见的恶性肿瘤之一，侵袭和转移是肿瘤治疗失败、临床预后不良的主要原因，探讨侵袭转移过程中相关分子机制，对于落实肿瘤转化医学的实际应用，提高临床肿瘤治疗效果，均具有重要的理论意义和应用价值。本项目在前期人体组织标本研究的基础上，**发现 Twist 和 Wnt5a 可能在子宫内膜癌的侵袭转移中发挥重要调控作用**，为了进一步验证该推测，本研究拟采用 RNA 干扰和质粒转染技术，建立 Twist-shRNA 和 Wnt5a 质粒稳定表达的子宫内膜癌细胞株，在肿瘤细胞系及动物实验中，分别和同时调控 Twist、Wnt5a 的表达，观察其对子宫内膜癌细胞增殖、侵袭转移能力的影响，以及对上皮-间质转化(EMT)过程的逆转作用，结合高通量二代测序、肿瘤分类基因芯片、免疫共沉淀和双荧光素酶报告基因，筛选、确认与肿瘤生长、侵袭转移有关的 Twist 和 Wnt5a 新的上下游靶基因，并探讨 Twist 直接结合 Wnt5a 表达的分子机制和互作基因。

子宫内膜癌近年来发病率逐渐上升并呈年轻化趋势，大约 25% 的患者发生于绝经前，其中 40 岁以下患者占 3%-14%。年轻患者的肿瘤多处于早期，具有分化程度较高(G1-G2)、较少发生肌层浸润的特点，对早期、复发及有生育要求的子宫内膜癌患者，大剂量孕激素用药是主要临床措施，其治疗后的肿瘤结局及生育结局良好。但 30%-40% 病例在治疗不同时期出现对孕激素不敏感现象(孕激素抵抗)，导致肿瘤进展，严重影响治疗效果和患者预后。进一步研究和明确孕激素抵抗分子机制以及可能的增敏机制，对提高早期子宫内膜癌患者的疗效并保留生殖内分泌功能具有重要意义，并为今后子宫内膜癌的预后判断和个体化靶向治疗提供新的思路和理论基础。

通过 TCGA 数据分析、免疫组化及体外细胞学实验，课题组前期研究发现：Twist 蛋白表达和子宫内膜样腺癌的 ER、PR 激素受体呈负相关性，在孕激素抵抗的子宫内膜癌细胞株中，Twist 和磷酸化 Akt 蛋白表达呈升高趋势，**由此合理推测：Twist 和 PI3K/AKT/mTOR 信号途径可能在子宫内膜癌孕激素抵抗中具有关键分子作用**。故本项目拟：进一步探索 Twist 过度表达与子宫内膜癌激素受体异常的临床相关性，以及可能调控 PI3K/AKT/mTOR 信号通路在孕激素抵抗中的机制；采用高通量二代测序、转录组测序、表达谱芯片、

生物信息学分析等技术，筛选、鉴定与肿瘤耐药、孕激素抵抗相关新的靶基因。本研究将为更有效阐明子宫内膜癌孕激素抵抗发生的分子机制提供新的实验基础，亦为肿瘤耐药的个体化治疗提供新的策略。

研究内容

1. 验证 Twist 和 Wnt5a 信号通路、EMT 相关蛋白在不同内膜组织中的差异性表达

采用免疫组化染色结合组织芯片技术，检测大样本量子宫内膜样腺癌、不典型增生内膜组织、正常内膜组织中 Twist 和 Wnt5a 信号通路、EMT 相关蛋白的表达水平，并分析其临床意义以及对病例预后影响。

2. 探讨干预 Twist 和 Wnt5a 信号通路，对子宫内膜癌细胞 EMT 过程和侵袭转移的影响

应用本实验室保存的 6 株常用子宫内膜癌细胞株：Ishikawa、RL95-2、AN3 CA、HEC-1A、HEC-1B、KLE，Real-time PCR 和 Western blot 检测 Twist 和 Wnt5a mRNA 及蛋白的表达，筛选表达量适合的肿瘤细胞株 RL95-2，进行质粒和 shRNA 干扰，用于后续细胞功能实验。

在原有工作的基础上，以转染质粒和 shRNA 分别和同时干扰 Twist 和 Wnt5a 基因，建立稳定干扰 Twist 和 Wnt5a 信号通路表达的子宫内膜癌细胞株；分别检测肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移等指标，结合三维动态细胞培养，观察细胞形态学变化，检测 EMT 分子标记物的改变；开展动物实验，种植转染基因的细胞到裸鼠皮下，观察肿瘤体积和重量，主要了解对肿瘤生长及转移的影响；应用高通量二代测序和 Super Array 肿瘤分类基因芯片（检测肿瘤转移基因芯片、肿瘤血管形成基因芯片、干细胞基因芯片），分析 Twist 和 Wnt5a 信号通路对子宫内膜癌相关基因的影响，筛选、确定新的下游侵袭转移相关靶基因；明确 Twist 和 Wnt5a 通路对于子宫内膜癌细胞 EMT 过程的调控。

3. 探讨 Twist 直接结合 Wnt5a 信号通路的分子机制和结构基础

应用 transfac（真核生物基因转录调控因子数据库，<http://transfac.gbf.de>）对人 Wnt5a mRNA 全长序列进行分析，筛查启动子区域和增强子区域潜在的

Twist 结合位点, 然后通过双荧光素酶报告基因载体、电泳迁移率实验(EMSA)和染色质共沉淀(ChIP)实验, 研究 Wnt5a 基因相关区域是否含有 Twist 反应结构域, 明确 Twist 直接结合 Wnt5a 信号通路的分子机制。

探讨 Twist 和 Wnt5a 信号通路的调控作用机制: 沉默 Twist 表达后, 对于非经典 Wnt5a/Ca²⁺/CaMK II, 以及 Wnt5a/ PKC 信号通路相关分子的改变, 同时观察对于经典的 Wnt/ β -catenin 信号通路的调控作用。

4. 明确 Twist 结合 PI3K/Akt /mTOR 信号通路在子宫内膜癌孕激素抵抗中的作用和分子机制

免疫组化检测子宫内膜样腺癌中的 Twist 和激素受体 ER 及 PR 两种亚型: ER α 、ER β 、PRA、PRB 差异表达水平, 分析 Twist 表达水平与患者激素受体缺失和临床病理特征的关系。通过逐步递增孕激素类药物 MPA, 建立稳定的孕激素耐药的子宫内膜癌肿瘤细胞株 Ishikawa-MPA。检测并比较 Ishikawa 和孕激素耐药 Ishikawa-MPA 肿瘤细胞株的差异性, 包括肿瘤生物学行为(增值能力、细胞周期和细胞凋亡、侵袭转移)、耐药性相关分子途径的改变(Twist 和 PI3K/Akt /mTOR 信号通路相关基因, 以及 MAPK、ERK、ITGB1、FAK、ILK、NF- κ B 等基因)、EMT 分子的变化(EZH2、E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, Sox-2、 β -catenin、DACH1、CXCL8、CXCR1 等指标)。

加入外源性 MPA, 分别处理亲本 Ishikawa 和 Twist-shRNA-Ishikawa 肿瘤细胞株, 检测肿瘤细胞增殖能力、细胞凋亡、侵袭转移能力, 比较 PI3K/Akt /mTOR 信号通路相关蛋白的差异表达。分别加入 PI3K 抑制剂 LY294002 和 Akt 抑制剂 MK-2206, 检测 Twist 蛋白和相关信号通路相关蛋白的不同情况表达。

5. 应用二代测序、转录组测序、表达谱芯片和生物信息学技术, 进一步寻找和子宫内膜癌孕激素耐药相关的关键基因。

利用Ishikawa和孕激素耐药Ishikawa-MPA肿瘤细胞株, 采用高通量二代测序、转录组测序和表达谱芯片技术、结合生物信息学分析, 筛选耐药细胞株及亲本细胞株差异表达基因, 构建蛋白互作模型, 最终筛选出新的子宫内膜癌孕激素抵抗关键分子。采用一代测序(Sanger法)结合荧光定量PCR, 验证筛选的耐药关键基因。

二、研究团队三、研究背景

研究背景和进展

上皮-间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)是指在特定生理和病理条件下, 具有极性的上皮细胞转化为具有间质特性的细胞并获得侵袭迁移能力的过程, EMT 不仅存在于胚胎发育和器官形成中, 也是肿瘤细胞原位浸润和远处转移的起始环节和关键步骤^[1]。Twist 是一种在进化上高度保守的螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix, bHLH)转录因子, 可以促进胚层上皮转变为间质细胞并具有迁徙能力, 在中胚层形成过程中具有重要作用。目前研究表明, Twist 是诱导肿瘤细胞发生 EMT 并促进侵袭转移的关键调控因子^[2, 3]。Li 等^[4]采用 Twist 重组质粒转染乳腺癌细胞株 MCF7 和宫颈癌细胞株 Hela, 免疫荧光显微镜观察发现细胞间连接丧失, 形态呈纺锤形或成纤维细胞样, 蛋白印迹法结果出现 EMT 分子标记物的改变, 包括间质细胞标记物 α -SMA 和波形蛋白表达上调, 上皮细胞标记物 E-cadherin 表达下调, 提示 Twist1 基因的激活在乳腺癌 EMT 的发生、肿瘤的侵袭转移中发挥重要作用。Hui 等^[5]对 120 例非小细胞性肺癌研究发现, Twist 在 38.3%的肺癌组织中过表达, 并和淋巴结累及、胸腔转移等密切相关, Twist 阳性患者预后明显较短, 细胞学实验干扰 Twist 基因的表达, 可以明显降低肺癌细胞的迁徙能力和转移特性。本课题组在组织标本中发现^[6], Twist 蛋白在正常子宫内膜组织中低度表达, 在不典型增生内膜组织中表达增高, 而在子宫内膜样腺癌中呈显著增高 ($P<0.01$), 并与肿瘤的肌层浸润、淋巴结转移等恶性生物学行为紧密相关 ($P<0.05$), 结果表明 Twist1 基因的激活可能促进了子宫内膜癌细胞的运动迁移能力, 在肿瘤的侵袭转移过程中具有重要作用。

高度保守的 Wnt 信号家族在胚胎发育中发挥重要作用, 可调节细胞生长、迁移、分化及发育等。Wnt 信号分为两类, 经典 Wnt/ β -catenin 通路和非经典信号通路, 包括 Wnt/细胞平面极性通路 (PCP)和 Wnt/ Ca^{2+} 通路, 通过增加细胞内 Ca^{2+} 浓度, 激活钙调蛋白依赖性激酶II和蛋白激酶 C(Protein Kinase, PKC), 调节细胞黏附迁移能力^[7-9]。Wnt5a 基因是 Wnt 非经典家族中的关键成员, 位于人染色体 3p14-p21, 其在不同恶性肿瘤中的生物学作用存在一定分歧: 在结肠癌、甲状腺癌、血液系统肿瘤中可以发挥抑癌作用, 而在乳腺癌、

黑色素瘤、胰腺癌等研究中具有原癌基因功能^[10,11]。Wnt5a 可以产生 Wnt5a-long 和 Wnt5a-short 两种蛋白亚型,它们在癌细胞系中发挥不同的活性: Wnt5a-L 抑制肿瘤细胞系的增殖,而 Wnt5a-S 促进其生长^[12]。Wnt5a 既能参与经典的 Wnt/ β -catenin 通路,又能活化非经典通路发挥拮抗作用,并且二者之间相互联系。上述因素可能导致 Wnt5a 在不同肿瘤微环境中的作用不一致,具有差异肿瘤活性功能。**我们在前期研究中报道**, Wnt5a 蛋白在正常子宫内膜组织中高表达,在不典型增生内膜组织中表达减少,在子宫内膜样腺癌中呈明显降低($P<0.05$),体外细胞学研究中,稳定转染 Wnt5a 质粒的子宫内膜癌细胞株,肿瘤细胞增殖、迁移、侵袭能力明显降低($P<0.05$),上述结果强烈提示, **Wnt5a 通路可能是子宫内膜恶变过程中的重要的肿瘤抑制基因**,过度表达能够拮抗子宫内膜细胞的增殖及恶性转化。

那么在子宫内膜样腺癌中, Twist 和 Wnt5a 的异常表达是否和 EMT 的发生有关? 其具体调控的相关靶基因有哪些? EZH2 (果蝇 zeste 基因增强子同源物 2, enhancer of zeste homolog 2)是多梳基因家族的重要成员,在细胞分化、细胞周期调节和肿瘤发生过程中具有重要作用。E-钙粘蛋白(E-cadherin)是钙依赖性的跨膜受体,通过同类分子间结合介导细胞之间的粘附作用,维持上皮细胞的粘附力和完整性。许多研究证明, EZH2 可以抑制上皮细胞标志物 E-cadherin 的表达,促进 EMT 过程,并与肿瘤的恶性生物学行为相关^[13,14]。**本课题组前期实验发现**,在子宫内膜的恶性转化过程中,随着 Twist 和 Wnt5a 蛋白表达的异常, EZH2 蛋白明显升高,而 E-cadherin 蛋白降低,上述标记物的表达呈明显的相关关系($P<0.05$),结果说明 EZH2、E-cadherin 可能是 Twist 和 Wnt5a 的共同下游靶基因,当采用质粒转染和 RNA 干扰作用 Twist 和 Wnt5a 后,能够协同调节 EZH2、E-cadherin 的转录和表达,降低子宫内膜癌的侵袭转移等恶性行为(待发表实验资料)。综合相关文献, **可以合理推测:在子宫内膜样腺癌中, Twist 和 Wnt5a 信号通路能够有效诱导 EMT 相关靶基因的表达**,并影响肿瘤细胞的侵袭转移能力。

迄今为止, Twist 和 Wnt5a 信号通路在肿瘤中的相互作用,以及具体分子调控机制尚不明确,需要进一步深入研究。Cao 等^[15]采用基因芯片筛查,报道 Wnt5a 非经典信号通路中重要的受体 ROR1,是 Twist 的直接下游基因和效

靶点，沉默或敲除 ROR1 基因，可以有效降低 Twist 蛋白表达，并抑制乳腺癌 EMT 过程和肿瘤细胞侵袭转移能力，减少荷瘤小鼠的肺脏转移率。Shi 等^[16]通过蛋白组学和基因测序发现，Wnt5a 基因启动子和增强子区域，可能存在于 Twist/BRD4 复合体直接作用位点和结构基础，药理抑制剂降低 Twist/BRD4 结合，可以直接调控 Wnt5a 的表达，并抑制基底细胞样乳腺癌肿瘤细胞的侵袭、干细胞特征表达和肿瘤形成率。上述结果说明，**Twist 和 Wnt5a 信号通路之间存在明确的、直接的、复杂的调控关系**，两者共同的上下游靶基因以及相关分子信号通路，需要更为深入细致的实验研究。

临床研究发现孕激素治疗不仅是早期保留生育能力的子宫内膜样腺癌患者的主要治疗方法，对晚期和复发的患者治疗仍然有效，其依从性较高，且毒副作用较小。但调查显示，超过 30% 的早期患者对孕激素不敏感或在治疗过程中产生孕激素抵抗，为子宫内膜癌患者的激素治疗带来困难。目前孕激素抵抗的机制尚未明确，可能与雌、孕激素受体改变、PI3K/Akt/mTOR 通路活化、表皮生长因子受体(EGFR)异常、凋亡抑制基因过表达、胰岛素抵抗和乙二醛酶I(GloI)过表达有关^[17,18]。

PI3K/Akt 信号转导通路在多种人类肿瘤中表达失调，其异常激活能使肿瘤细胞过度增殖和分化，抑制细胞凋亡，在恶性肿瘤的发生、发展中起重要作用，该通路的活化也是多药耐药产生的机制之一^[19]。PI3K 是生长因子超家族信号传导过程中的重要分子，由调节亚基 p85 和催化亚基 p110 构成，接受来自酪氨酸激酶和 G 蛋白偶联受体的信号，两者在临近质膜的部位转化底物 PIP3 形成，可以和蛋白激酶 B (Akt) N 端 PH 结构域结合，使 Akt 从细胞质转移到细胞膜上，磷酸化 Akt 蛋白使其激活，通过直接和间接两种途径激活其底物雷帕霉素靶体蛋白(mTOR)^[20]。

在一项研究裸鼠体内子宫内膜癌移植瘤的实验中发现，激活子宫内膜癌细胞中的 PI3K/Akt 信号转导通路，可导致孕激素拮抗；用 PI3K 抑制剂 LY294002 抑制 PI3K/Akt 信号转导通路的活化，会阻止孕激素抵抗现象的发生^[21]。应用高效、高选择性的 Akt 抑制剂 MK-2206 一方面能降低子宫内膜癌细胞的生存能力，抑制细胞增殖，加速凋亡进程；另一方面能增加孕激素受体 B (PR-B) 的表达，并对孕激素调节基因加以修饰，与孕激素协同作用减

小肿瘤体积，增强对激素治疗的敏感性^[22]。应用孕激素类药物醋酸甲羟孕酮（Medroxyprogesterone Acetate, MPA）和 PI3K 抑制剂 LY294002 作用于子宫内膜癌 Ishikawa 细胞，结果显示 MPA 在孕激素敏感的 Ishikawa 细胞株中抑制 PI3K/Akt 通路，减少肿瘤细胞的生长增殖；但持续 MPA 诱导的孕激素抵抗型 Ishikawa 细胞或 HEC-1A 细胞中会活化 PI3K/Akt 通路，并对肿瘤细胞增殖无明显抑制作用，LY294002 拮抗 PI3K/Akt 通路后，孕激素受体 PR-B 表达上调并且明显降低肿瘤的活性和增殖，结果证明 **PI3K/Akt 通路的激活在孕激素抵抗的产生过程中具有重要作用**^[23,24]。

Twist 作为上皮-间充质转化（EMT）和肿瘤转移的主要调节因子，也在调控肿瘤细胞的信号通路中具有重要作用。在乳腺癌 MCF10A 细胞中鉴定了 194 种 EMT、细胞黏附连接、肿瘤迁移和侵袭相关蛋白的表达变化，结果发现 Twist 和整合素 $\beta 1$ （ITGB1）是核心调节信号分子，Twist 转录调控 ITGB1 表达导致 EMT、PI3K/AKT、FAK/ILK 和 WNT 信号的激活，并和乳腺癌恶性生物学行为明显相关、促进乳腺肿瘤的进展，敲除 Twist 的表达则降低了 FAK、ILK 及其下游信号 PI3K/AKT 的活性，抑制 FAK 或 PI3K/AKT 信号通路也可逆转 EMT 过程和肿瘤细胞的侵袭转移，说明 Twist-ITGB1-PI3K/AKT 通路及下游信号网络决定了乳腺癌细胞的 EMT 过程^[25]。研究报道^[26]在 4 个乳腺癌细胞系和 57 个乳腺癌标本中检测 Twist 和细胞因子 CCL2 的水平，发现两者和乳腺癌的侵袭性呈正相关，在 MCF-7 肿瘤细胞中加入外源性雌激素 17β -雌二醇（E2）刺激，可促进激素依赖性乳腺癌的增殖、侵袭和转移，Twist 的敲除显著抑制 PI3K/AKT/NF- κ B 信号转导的激活，拮抗 E2 诱导的 CCL2 产生并逆转 EMT 和肿瘤侵袭进展过程。胰岛素抵抗（Insulin resistance, IR）是一种常见疾病并在子宫内膜癌孕激素抵抗中发挥重要作用。有报道^[27]在体外以 3T3-L1 脂肪细胞为基础，高糖/胰岛素刺激建立 IR 模型，在体内建立高脂饮食（HFD）诱导的小鼠 IR 模型，结果显示 twist 在发生 IR 的脂肪细胞中升高，导致线粒体超微结构损伤及功能障碍，而慢病毒靶向沉默 twist1 表达抑制了信号通路 IRS/PI3K/AKT 激活并降低 IR 的发生，提示 twist1 通过下游 IRS/PI3K/AKT 途径介导线粒体功能障碍和 IR 过程。此外，Twist 结合 PI3K/AKT/mTOR 通路，在结直肠癌细胞因子 CXCR7 促进肿瘤转移和化疗抵

抗、诱导肿瘤细胞能量代谢的重编程、骨桥蛋白（OPN）促进肝癌的 EMT 和恶性转移中均至关重要^[28, 29]。

以多个转录因子为靶点的多基因调控，协同治疗肿瘤的研究，是目前精准治疗的新领域和新方向^[30]。Twist、Wnt5a、PI3K/AKT/mTOR 信号通路是肿瘤侵袭转移、孕激素抵抗过程的关键分子信号，本课题组拟将 Twist 特异性 shRNA 和 Wnt5a 质粒分别和同时转染子宫内膜癌细胞株，观察对子宫内膜癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响，以及 EMT 分子标志物表达的改变；利用动物实验结合小动物活体成像技术，观察裸鼠体内成瘤和转移的特点；应用高通量二代测序、转录组测序、表达谱芯片、肿瘤分类基因芯片和生物信息分析，探索 Twist 结合 Wnt5a、PI3K/AKT/mTOR 信号途径，对子宫内膜癌侵袭转移、肿瘤耐药相关分子的改变，筛选出新的上下游靶基因；使用生物信息学软件对 Wnt5a mRNA 全长序列进行分析、双荧光素酶报告基因、电泳迁移率实验 (EMSA) 和免疫共沉淀 (ChIP) 的方法，研究 Twist 直接调控 Wnt5a 基因启动子区和增强子区的分子机制和结构基础；探讨 Twist 调控 PI3K/AKT /mTOR 信号途径在子宫内膜癌孕激素抵抗中的分子机制，最后通过一代测序结合荧光定量 PCR，验证新的肿瘤相关基因在子宫内膜癌中的表达情况，以及与侵袭转移、孕激素肿瘤耐药性等恶性生物学指标的关系。

本课题以 Twist、Wnt5a 和 PI3K/AKT/mTOR 信号通路对子宫内膜癌侵袭转移、孕激素抵抗为切入点，深入探讨 1. 干扰 Twist、Wnt5a 对子宫内膜癌肿瘤细胞增殖、侵袭、转移能力的影响；2. Twist 和 Wnt5a 在 EMT 和肿瘤转移中的调控机制以及新的上下游靶基因；3. Twist 直接结合 Wnt5a 的分子结构基础和相关信号通路；4. Twist 结合 PI3K/Akt /mTOR 信号通路在子宫内膜癌孕激素抵抗中的作用和分子机制；5. 应用二代测序、转录组测序、表达谱芯片和生物信息学技术，进一步寻找和子宫内膜癌侵袭转移、肿瘤耐药相关的关键基因。本研究有利于阐明子宫内膜癌侵袭转移、孕激素抵抗的相关机制，有望发现新的肿瘤转移基因和耐药关键分子，为子宫内膜癌的转化医学和个体化精准治疗提供新的思路 and 手段。

参考文献：

1. Liu T, Zhao X, Zheng X, et al. The EMT transcription factor, Twist1, as a

- novel therapeutic target for pulmonary sarcomatoid carcinomas. *Int J Oncol.* 2020; 56 (3): 750 -760.
2. Khot M, Sreekumar D, Jahagirdar S, et al. Twist1 induces chromosomal instability (CIN) in colorectal cancer cells. *Hum Mol Genet.* 2020;29(10):1673-1688.
 3. Zhang D, Sun B, Zhao X, et al. Twist1 accelerates tumour vasculogenic mimicry by inhibiting Claudin15 expression in triple-negative breast cancer. *J Cell Mol Med.* 2020;24(13):7163-7174.
 4. Li J and Zhou BP. Activation of β -catenin and Akt pathways by Twist1 are critical for the maintenance of EMT associated cancer stem cell-like characters. *BMC Cancer*, 2011, 11: 49.
 5. Hui L, Zhang S, Dong X, et al. Prognostic significance of Twist1 and N-cadherin expression in NSCLC. *PLoS One.* 2013, 8(4):e62171.
 6. **Feng ZZ**, Gan H, Cai Z, et al. Aberrant Expression of Hypoxia-inducible Factor 1 α , TWIST1 and E-cadherin is Associated with Aggressive Tumor Phenotypes in Endometrioid Endometrial Carcinoma. *Jpn J Clin Oncol.* 2013. 43(4): 396-403.
 7. Wang JN, Li L, Li LY, et al. Emerging role and therapeutic implication of Wnt signaling pathways in liver fibrosis. *Gene.* 2018, 67457-67469.
 8. Wang Y, Singhal U, Qiao Y, et al. Wnt Signaling Drives Prostate Cancer Bone Metastatic Tropism and Invasion. *Transl Oncol.* 2020;13(4):100747.
 9. Li J, Gong W, Li X, et al. Recent Progress of Wnt Pathway Inhibitor Dickkopf-1 in Liver Cancer. *Journal of nanoscience and nanotechnology.* 2018, 18 (8):5192-5206.
 10. Lopez-Bergami P, Barbero G. The emerging role of Wnt5a in the promotion of a pro-inflammatory and immunosuppressive tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev.* 2020; 39(3):933-952.
 11. Astudillo P. Wnt5a Signaling in Gastric Cancer. *Front Cell Dev Biol.* 2020; 8:110.
 12. Matthieu Bauer, Jean Bénard, Terry Gaasterland, Karl Willert, et al. WNT5A Encodes Two Isoforms with Distinct Functions in Cancers. *PLoS One*, 2013, 8(11): e80526.
 13. Shinya Oki, Kenbun Sone, Katsutoshi Oda, Ryuji Hamamoto, et al. Oncogenic histone methyltransferase EZH2: A novel prognostic marker with therapeutic potential in endometrial cancer. *Oncotarget*, 2017, 8(25): 40402–40411.

14. Nakagawa M, Kitabayashi I. Oncogenic roles of enhancer of zeste homolog 1/2 in hematological malignancies. *Cancer science*, 2018; 110(1): 194-208.
15. Cao J, Wang X, Dai T, et al. Twist promotes tumor metastasis in basal-like breast cancer by transcriptionally upregulating ROR1. *Theranostics*. 2018, 8(10): 2739-2751.
16. Shi J, Wang Y, Zeng L, et al. Disrupting the interaction of BRD4 with diacetylated Twist suppresses tumorigenesis in basal-like breast cancer. *Cancer Cell*. 2014, 25 (2): 210-225.
17. Jerzak KJ, Duska L, MacKay HJ. Endocrine therapy in endometrial cancer: An old dog with new tricks. *Gynecol Oncol*. 2019;153(1):175-183.
18. MacKintosh ML, Derbyshire AE, McVey RJ, et al. The impact of obesity and bariatric surgery on circulating and tissue biomarkers of endometrial cancer risk. *Int J Cancer*. 2019;144(3):641-650.
19. Qi Y, Tan M, Zheng M, et al. Estrogen/estrogen receptor promotes the proliferation of endometrial carcinoma cells by enhancing hMOF expression. *Jpn J Clin Oncol*. 2020;50(3):241-253.
20. Oaknin A, León-Castillo A, Lorusso D. Progress in the management of endometrial cancer (subtypes, immunotherapy, alterations in PIK3CA pathway): data and perspectives. *Curr Opin Oncol*. 2020;32(5):471-480.
21. Liu Z, Hong Z, Ma H, et al. Key factors mediated by PI3K signaling pathway and related genes in endometrial carcinoma. *J Bioenerg Biomembr*. 2020;52(6):465-473.
22. Uko NE, Güner OF, Matesic DF, et al. Akt Pathway Inhibitors. *Curr Top Med Chem*. 2020;20(10):883-900.
23. Zhang X, Kan H, Liu Y, et al. Plumbagin induces Ishikawa cell cycle arrest, autophagy, and apoptosis via the PI3K/Akt signaling pathway in endometrial cancer. *Food Chem Toxicol*. 2020; 148:111957.
24. Slomovitz BM, Coleman RL. The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in endometrial cancer. *Clin Cancer Res*. 2012;18(21):5856-5864.
25. Yang J, Hou Y, Zhou M, et al. Twist induces epithelial-mesenchymal transition and cell motility in breast cancer via ITGB1-FAK/ILK signaling axis and its associated downstream network. *Int J Biochem Cell Biol*. 2016;71: 62-71.
26. Rui Han 1, Shanzhi Gu 2, Yujiao Zhang, et al. Estrogen promotes progression of hormone-dependent breast cancer through CCL2-CCR2 axis by upregulation of Twist via PI3K/AKT/NF-κB signaling. *Sci Rep*,

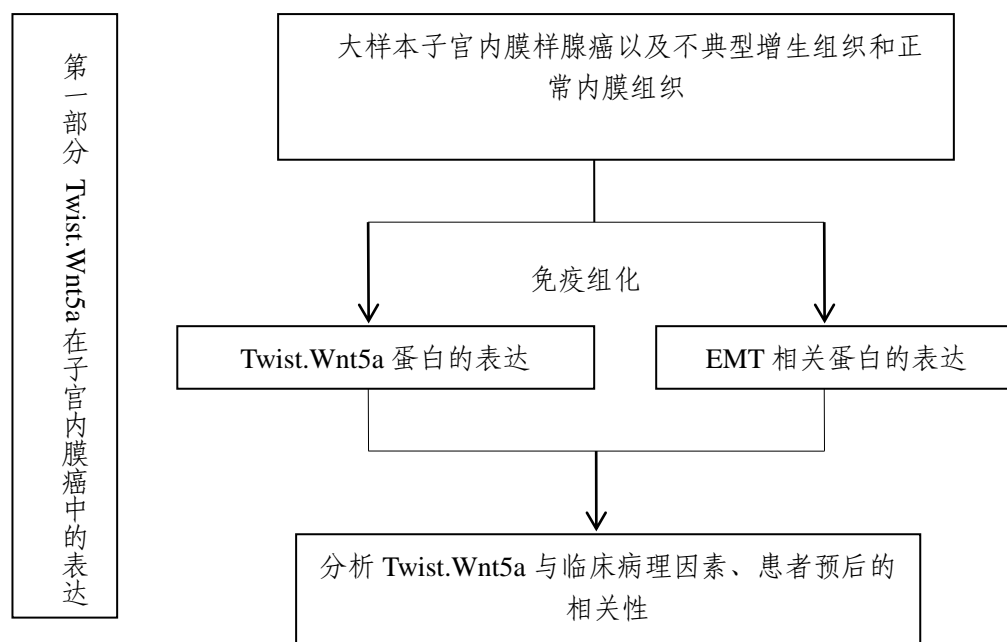
- 2018;8(1):9575.
27. Lu S, Wang H, Ren R, et al. Reduced expression of Twist1 is protective against insulin Resistance of adipocytes and involves mitochondrial dysfunction. *Sci Rep*, 2018; 8(1): 12590.
 28. Gao LL, Xu JT, He GD, et al. CCR7 high expression leads to cetuximab resistance by cross-talking with EGFR pathway in PI3K/AKT signals in colorectal cancer. *Am J Cancer Res*. 2019;9(11):2531-2543.
 29. Yu X, Zheng Y, Zhu X, et al. Osteopontin promotes hepatocellular carcinoma progression via the PI3K/AKT/Twist signaling pathway. *Oncol Lett*. 2018; 16(4): 5299-5308.
 30. Li S, Liu Y, Rui Y, et al. Dual target gene therapy to EML4-ALK NSCLC by a gold nanoshell-based system. *Theranostics*. 2018, 8 (10): 2621-2633.

四、技术方案

1. 研究Twist、Wnt5a以及EMT相关分子在子宫内膜癌中的差异性表达及其临床预后意义

(1) Twist、Wnt5a以及EMT相关蛋白的表达及临床意义：

经过蚌埠医学院伦理审查委员会批准，以本科室存档保存的石蜡子宫内膜癌手术切除样本，构建子宫内膜癌组织芯片，采用免疫组织化学染色方法，检测子宫内膜样腺癌、不典型增生内膜组织、正常内膜组织中的 Twist 和 Wnt5a 以及 EMT 相关蛋白的差异表达水平，分析其表达水平与患者临床病理特征和预后因素的关系。



2. 明确干扰Twist和Wnt5a对于子宫内膜癌细胞侵袭转移能力的影响

(1) 筛选 Twist、Wnt5a 表达量相对适合的子宫内膜癌细胞株：

应用本实验室保存的 6 株常用子宫内膜癌细胞株：Ishikawa、RL95-2、AN3 CA、HEC-1A、HEC-1B、KLE，采用 Real-time PCR 和 Western blotting 方法，检测 Twist、Wnt5a 表达量相对适合的肿瘤细胞株，为下一步实验做好准备。

(2) 建立稳定转染 Twist-shRNA 和 Wnt5a 质粒表达的肿瘤细胞株：

A. 构建 Wnt5a 质粒表达载体（pMSCV-Wnt5a-IRES-GFP）：以亲本细胞和转

染空载体作为对照。瞬时转染 Wnt5a: Wnt5a 质粒载体转染至特定的子宫内膜癌细胞株, 获得瞬时高表达 Wnt5a 的肿瘤细胞, 确认所构建的“Wnt5a 质粒载体”的有效性。稳定转染 Wnt5a: 转染“Wnt5a 表达载体”的子宫内膜癌细胞株, 经 G418 筛选出抗性细胞克隆, 进一步筛选出稳定高表达 Wnt5a 的肿瘤细胞株。

- B. 构建 Twist-shRNA 表达载体: 设计 shRNA 专一性序列, 针对靶位点设计 3-4 对 shRNA, 选择最有效的进行后续研究, 并设立阴性对照。建立抑制 Twist 表达的小发夹型 RNA (small hairpin-shaped RNA, shRNA) 表达载体。
- C. 分别瞬时转染“Twist- shRNA、Wnt5a 质粒表达载体”至子宫内膜癌细胞株, 以亲本细胞和转染空载体作为对照。确认所构建的 shRNA 和质粒表达载体的有效性后, 经 G418 筛选出稳定抑制 Twist 表达的细胞株和稳定表达 Wnt5a 的细胞株。通过荧光标记观察 shRNA 转染效率, 采用 real-time PCR、western blot 判断目的基因的沉默效果。
- D. 同时转染“Twist- shRNA 和 Wnt5a 质粒表达载体”至子宫内膜癌细胞株, 以亲本细胞和转染空载体作为对照。步骤同上, 建立同时稳定表达“Twist-shRNA 和 Wnt5a 质粒”的肿瘤细胞。

(3) 观察调控 Twist 和 Wnt5a 表达对于子宫内膜癌细胞增殖、凋亡、侵袭转移能力的影响:

CCK8 实验、细胞克隆团形成实验、凋亡检查、细胞周期分析、Transwell 小室 (Transwell chamber) 结合基质胶 (Matrigel)、划痕实验、细胞动态三维培养的方法, 比较野生型子宫内膜癌细胞株与相应的稳定转染细胞株在细胞迁移能力及侵袭能力的差异。

(4) 观察调控 Twist 和 Wnt5a 表达对于子宫内膜癌细胞转移相关基因的影响:

- A. 采用 Super Array 肿瘤转移分类基因芯片、干细胞分类基因芯片、肿瘤血管形成分类基因芯片 (Oligo Tumor Metastasis Microarray), 检测子宫内膜癌分别及同时转染 Twist 和 Wnt5a 表达的肿瘤细胞, 与肿瘤转移、干细胞特征、血管形成等基因表达的改变, 筛选出相应的上下游转移相关靶基因。
- B. Real-time PCR 和 Western blot 技术, 分别在 mRNA 和蛋白水平验证基因芯片分析的结果, 从有差异表达的基因中初步筛选出可能是 Twist 和 Wnt5a

共同的上下游转移靶基因。

C. 免疫组织化学染色，结合组织芯片技术，在子宫内膜癌临床手术标本中再次验证转移相关基因与临床病理因素的关系。

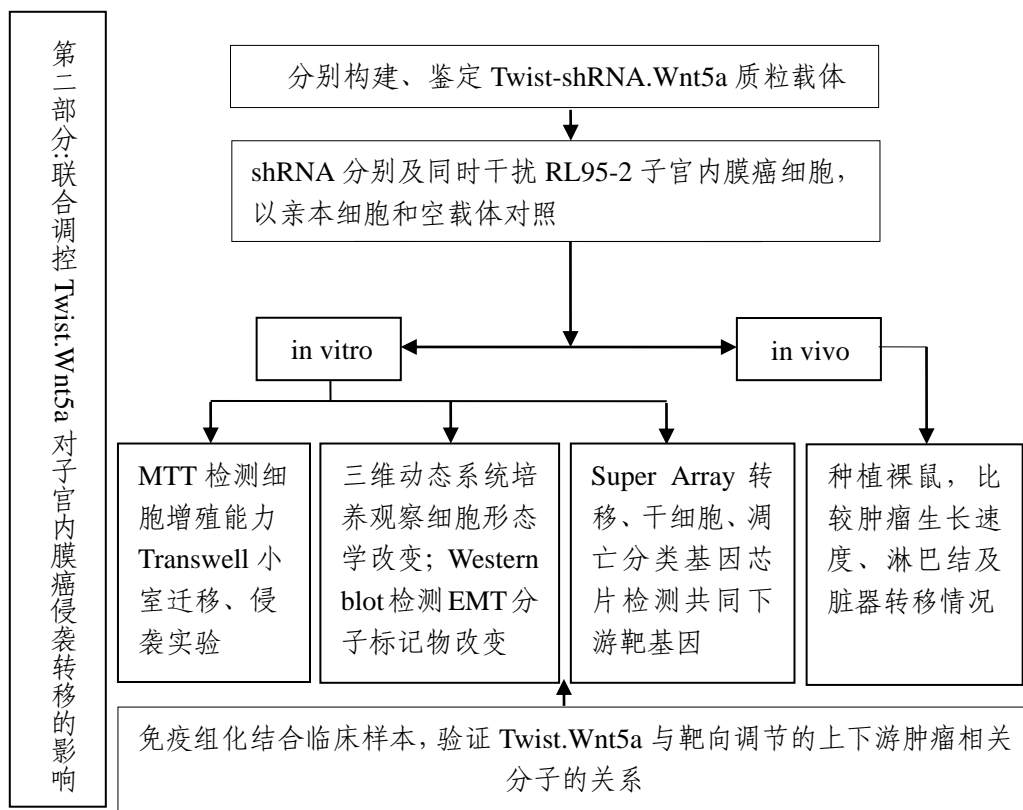
(5) 观察干扰Twist和Wnt5a表达对于EMT过程的逆转作用：

A. 分别及联合调控Twist和Wnt5a后，利用荧光显微镜和细胞动态三维培养，观察子宫内膜癌细胞形态学改变，是否出现EMT表型的逆转。

B. 分别及联合调控Twist和Wnt5a后，采用Western blot检测EMT分子标记物的变化，包括EZH2、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、Sox-2、 β -catenin等指标。

(6) 动物实验：

A. 裸鼠皮下接种野生型子宫内膜癌细胞，以及相应的稳定调控 Twist 和 Wnt5a 表达的肿瘤细胞株，观察成瘤特点与转移能力的差异。

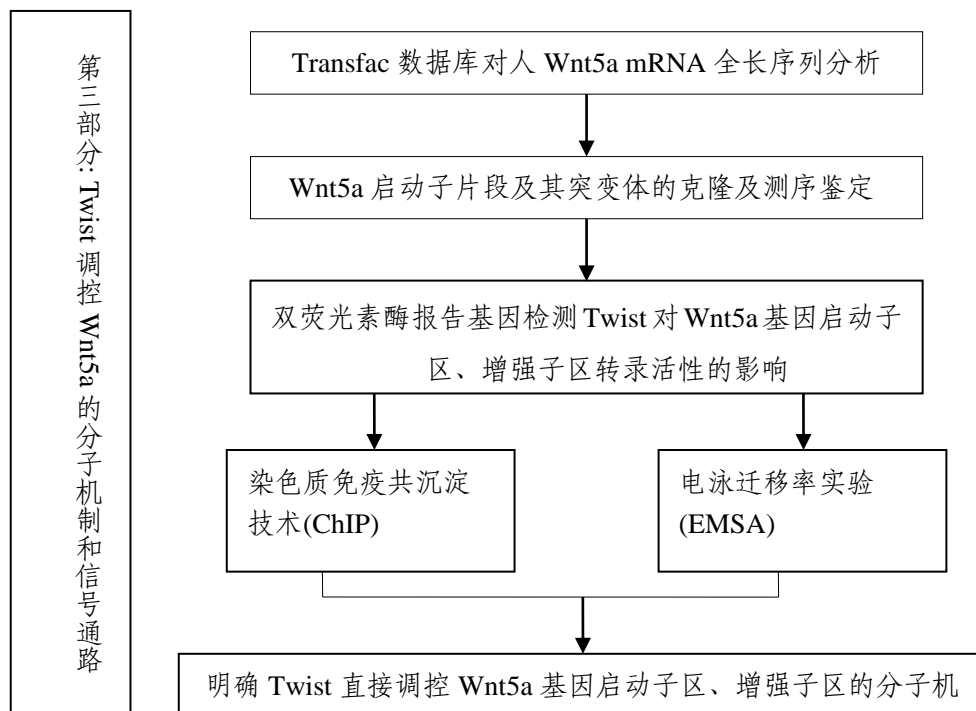


3. 明确Twist直接结合Wnt5a基因的分子机制和信号通路

(1)探讨Twist直接结合Wnt5a基因的分子结构基础：

首先通过生物信息学技术，应用transfac（真核生物基因转录调控因子数

数据库, <http://transfac.gbf.de>) 对人Wnt5a mRNA全长序列进行分析, 寻找Wnt5a 基因启动子序列、增强子序列中与Twist DNA结合相似的结构基础, 并克隆 Wnt5a的一段启动子序列, 根据这些序列合成相应的寡核苷酸探针并构建分别 针对两个结合位点的突变体mut1和mut2, 然后采用Promega的双荧光素酶报告 基因测试系统 (DLR), 萤火虫荧光素酶作为实验报告基因, 海肾荧光素酶作为 对照报告基因, pRL-SV40载体和脂质体转染, 将两个报告基因载体共转染。化 转染混和液中载体DNA量及其共转染报告基因载体比例, 组成比约20: 1左右。 TD-20/20荧光测试仪检测结果。结合电泳迁移率实验(EMSA)和染色质共沉淀 (ChIP)实验, 检测Wnt5a基因启动子区域是否含有对应的结合序列, 明确Twist 直接调控Wnt5a的分子机制。



(2)探讨Twist和Wnt5a经典型、非经典型信号通路的调控作用机制:

检测 Twist-shRNA 稳定表达后, 对于非经典 Wnt5a/Ca²⁺/CaMKII, 以及 Wnt5a/PKC 信号通路相关分子的变化, 同时探讨对于经典的 Wnt/β-catenin 信号通路的拮抗作用。

A. 采用流式细胞仪, 检查肿瘤细胞内 Ca²⁺浓度的变化, 运用 Western blotting 法, 检测 CaMKII、PKC 等非经典通路相关蛋白的表达, 研究 Twist 对于 Wnt5a 非经典 Wnt 通路的调控作用。

B. 采用 Western blotting 法, 检测 β -catenin、C-myc 等经典通路相关蛋白的水平, 研究 Twist 和 Wnt5a 和经典 Wnt 通路的之间的联系和作用。

4. 明确 Twist 和 PI3K/Akt /mTOR 信号通路在子宫内膜癌孕激素抵抗中的作用和分子机制

(1) 同前所述步骤, 构建子宫内膜癌组织芯片, 采用免疫组织化学染色方法, 检测子宫内膜样腺癌中的 Twist 和激素受体 ER 及 PR 两种亚型:ER α 、ER β 、PRA、PRB 差异表达水平, 分析 Twist 表达水平与患者激素受体缺失和临床病理特征的关系。

(2) 建立稳定的孕激素耐药的子宫内膜癌肿瘤细胞株

采用逐步递增外源性孕激素类药物醋酸甲羟孕酮 (MPA) 浓度方法, 进行 Ishikawa 细胞株耐药体外诱导。采用 MTS 法测定药物敏感性; 绘制细胞生长曲线和计算群体倍增时间, 建立 MPA 诱导的人子宫内膜癌耐 MPA 细胞株 Ishikawa-MPA。

(3) MPA 对 Ishikawa 和孕激素耐药 Ishikawa-MPA 肿瘤细胞株的作用和分子机制

A. 首先检测并比较 Ishikawa 和孕激素耐药 Ishikawa-MPA 肿瘤细胞株的差异性, 具体包括: 增值能力 (CCK8 实验、细胞克隆团形成实验)、细胞周期和细胞凋亡 (流式细胞仪分析)、侵袭转移 (Transwell 小室结合细胞动态三维培养的方法)。

B. 采用荧光定量 PCR 和 Western blotting 法, 检测比较 Ishikawa 和孕激素耐药 Ishikawa-MPA 肿瘤细胞株耐药性相关分子途径的改变, 主要是 Twist 和 PI3K/Akt /mTOR 信号通路相关基因, 具体包括: Twist、PI3K、总量 Akt、磷酸化 Akt、mTOR、MAPK、ERK、ITGB1、FAK、ILK、NF- κ B。

C. 采用荧光定量PCR和Western blotting法, 检测比较Ishikawa和孕激素耐药 Ishikawa-MPA肿瘤细胞株EMT分子的改变, 包括EZH2、E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, Sox-2、 β -catenin、DACH1、CXCL8、CXCR1指标。

(4) 检测 Twist 和 PI3K/Akt/mTOR 通路对于子宫内膜癌孕激素耐药的作用机制

A. 同前所述步骤，构建Twist-shRNA表达载体，建立稳定降低靶基因表达的“Twist-shRNA”的Ishikawa肿瘤细胞株。

B. 加入外源性MPA，分别处理亲本Ishikawa和Twist-shRNA-Ishikawa肿瘤细胞株，检测肿瘤细胞增殖能力、细胞凋亡、侵袭转移能力（具体同前步骤）。

C. 加入外源性MPA，分别处理亲本Ishikawa和Twist-shRNA-Ishikawa肿瘤细胞株，采用Western blotting法，检测PI3K/Akt /mTOR信号通路相关蛋白的差异表达，具体内容同4-3。

D. 分别加入PI3K抑制剂LY294002和Akt抑制剂MK-2206，检测肿瘤细胞增殖能力、细胞凋亡、侵袭转移能力（具体同前步骤）。

E. 分别加入PI3K抑制剂LY294002和Akt抑制剂MK-2206，采用Western blotting法，检测Twist蛋白和相关信号通路相关蛋白的差异表达，具体内容同4-3。

5. 应用二代测序、转录组测序、表达谱芯片和生物信息学技术，进一步寻找和子宫内膜癌孕激素耐药相关的关键基因。

A. 利用Ishikawa和孕激素耐药Ishikawa-MPA肿瘤细胞株，采用高通量二代测序、转录组测序和表达谱芯片技术（Agilent Gene Expression Analysis），寻找耐药细胞株及亲本细胞株之间的差异基因谱。

B. 利用生物信息学分析，筛选差异表达基因，构建蛋白互作模型，寻找可能的关键基因。采用PANTHER、DAVID信息学网站，对差异基因进行GO富集分析，筛选不同的分子功能区基因；运用Metascape软件分析和孕激素耐药相关的蛋白互相作用系统；基于癌症基因组图谱（TCGA）结合R语言分析，在子宫内膜癌组织数据库中挖掘孕激素受体和耐药细胞差异基因的交集，最终筛选出新的子宫内膜癌耐药关键基因。

C. 采用一代测序（Sanger法）结合荧光定量PCR，验证筛选的耐药关键基因，为子宫内膜癌孕激素抵抗的临床治疗，提供崭新的思路和可能靶点。

五、预期研究成果

预期研究成果：

1. 调控 Twist 和 Wnt5a 能够抑制子宫内膜癌的侵袭转移，可能机制与逆转肿瘤的 EMT 过程和共同抑制下游转移靶基因有关。
2. 可能发现新的与子宫内膜癌侵袭转移相关的 Twist 和 Wnt5a 共同的上下游靶基因。
3. 明确 Twist 直接结合 Wnt5a 基因的分子结构基础和信号通路机制。
4. 揭示 Twist 和 PI3K/Akt /mTOR 信号通路在子宫内膜癌孕激素抵抗中的作用和分子机制。
5. 筛选并验证和子宫内膜癌孕激素耐药相关的关键基因和信号途径。
6. 发表标注受本项目资助的 SCI 论文 4 篇，国家级核心刊物 4 篇，出版相关论著 1 部，积极申请相关发明专利。
7. 培养硕士研究生 3 名，青年医师 2 名。
8. 以本项目研究作为基础，作为负责人申报安徽省自然科学基金，积极准备国家自然科学基金，并申报省厅级或市级科技进步奖，促进研究成果的临床转化。

六、经费预算

序号	经费科目	经费说明	金额（万元）
1	材料费	是指在项目研究过程中消耗的各种原材料、辅助材料、低值易耗品等的采购及运输、装卸、整理等费用。	<p>共计 63.00 万元</p> <p>包括 1.实验动物购置和饲养费（6.00 万元）：拟使用多种基因修饰小鼠，C57 野生型小鼠以及裸鼠（BALB/c-nu），预期使用基因小鼠 100 只左右；其他小鼠各 120 只左右。</p> <p>2.抗体购置费（28.00 万元）：包括 Twist、Wnt5a、Wnt/β-catenin 通路、PI3K/Akt/mTOR 通路（PI3K、总量 Akt、磷酸化 Akt、mTOR、MAPK、ERK、ITGB1、FAK、ILK、NF-κB 等指标）、EMT 相关分子(EZH2、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、Sox-2、β-catenin、DACH1、CXCL8、CXCR1 等指标)、激素受体（ER α、ER β、PRA、PRB）等检测。3. 细胞培养基和胎牛血清的购置费（10.00 万元）：包括细胞培养和肿瘤细胞表型实验。4. 细胞培养使用的耗材（3.00 万元），分子克隆相关酶（3.00 万元），常用分子生物学、肿瘤学实验试剂及试剂盒（6.00 万元），常用化学试剂和耗材（4.00 万元），染色质免疫共沉淀（ChIP）试剂盒（1.00 万元），蛋白质免疫印记实验显影液（Western Blot）（1.00 万元），动物麻醉试剂异氟烷（1.00 万元）。</p>
2	测试化验加工费	是指在项目研究过程中支付给外单位（包括依托单位内部独立经济核算单位）的检验、测试、化验及加工等费用。	<p>共计 26.00 万元</p> <p>包括 1.本项目需要较大量合成 shRNA 慢病毒、携带生物荧光标记序列的慢病毒及腺相关病毒，进行细胞稳定转染与基因敲降、荧光标记的操作；2.本项目需要开展二代测序、转录组测序、表达谱芯片、Super Array 分类基因芯片；3.使用我院公共实验平台荧光显微镜、共聚焦显微镜；4. 动物实验需要使用“小动物成像 uCT”。</p>
3	差旅费	是指在项目研究过程中开展科学实验（试验）、科学考察、业务调研、学术交流等所发生的外埠差旅费等。	<p>共计 1.00 万元</p> <p>包括本项目学术骨干参与国内会议的差旅费。</p>
4	会议费	是指在项目研究过程中为了组织开展学术研讨、咨询以及协调项目研究工作等活动而发生的会议费用。	<p>共计 2.00 万元</p> <p>包括本项目拟与国内知名院校开展项目交流的会议费。</p>

5	出版/文献/ 信息传播/知 识产权事务 费	是指在项目研究过程中,需要支付的出版费、资料费、专用软件购买费、文献检索费、专利申请及其他知识产权事务等费用。	共计 3.00 万元 包括本项目的研究成果在国际 SCI 和国内核心学术期刊发表的版面费、查重费。
6	专家咨询费	是指在项目研究过程中支付给临时聘请的咨询专家的费用。	无
7	其他支出	(详细列出支出范围、预算)	共计 5.00 万元 劳务费: 包括直接参加本项目的 3 位研究生劳务费, 研究周期 3 年, 工作 9 个月/每年。
	合计		100.00 万元