

杭州市卫生科技计划（重点）项目

申 请 书

学 科 领 域： 临床医学

项 目 名 称： LncRNA 在桥本氏病合并甲状腺乳头状癌中的表达研究

申 请 单 位： 杭州市肿瘤医院

项目负责人： 罗定存

联 系 电 话： 13732225858

电 子 信 箱： ldc65@163.com

申 请 日 期： 2013.5.31

杭州市卫生局

二〇一〇年制

一、简 表

研究项目	项目名称	LncRNA 在桥本氏病合并甲状腺乳头状癌中的表达研究					
	类 别	A、基础研究 B、应用研究 C、实验开发 D、推广应用 E、科技服务				申报类别	A
	学科领域	A、基础医学 B、临床医学 C、预防医学与卫生学 D、药学 E、中西医结合 F、其他				申报领域	B
	学科名称	肿瘤学		学科代码	320-67		
	起止时间	2013年6月至2015年12月		成果形式	文章		
申请经费	总 额	5 万元		其他经费来源			
	分 年 度 拨 款	2013 年	2014 年	2015 年	年	是否偿还	否
		2.5 万元	1.5 万元	1 万元	万元	偿还期限	年
首席专家	姓 名	罗定存	性 别	男	出生年月	1965 年 10 月	
	身 份 证	330302196510170839			是否重点学科	否	
	所在单位	杭州市肿瘤医院			行政职务	副院长	
	最后学历	本科			专业技术职务	主任医师	
	留学国别		留学时间	共 月	是否博（硕）士 研究生导师	硕导	
项目组主要成员（除首席专家）	姓 名	性 别	年 龄	职 称	专 业	工作单位	承担任务
	彭友	男	32	主治医师	肿瘤外科	杭州市第一人民医院	病例收集
	张卧	男	31	主治医师	肿瘤外科	杭州市第一人民医院	病例收集
	丁金旺	男	30	主治医师	肿瘤外科	杭州市第一人民医院	分子生物学实验
	潘钢	男	30	主治医师	肿瘤外科	杭州市第一人民医院	分子生物学实验
	余道军	男	40	主任技师	检验科	杭州市第一人民医院	分子生物学实验指导
	徐如君	女	48	主任医师	病理科	杭州市第一人民医院	病理诊断

研究内容、意义及主要技术经济指标	摘要	<p>甲状腺乳头状癌 (papillary thyroid carcinoma, PTC)是最常见的恶性肿瘤之一,近年来发病率上升很快,严重危害人类生命健康。桥本氏病 (Hashimoto's thyroiditis, HT)是非常常见的甲状腺自身免疫性疾病,病程漫长,在其疾病发展过程中,可有向肿瘤发展的趋势。20 世纪 50 年代, Lindsay 提出 HT 与甲状腺癌之间有密切关系,近年来 HT 合并 PTC 呈上升趋势, HT 合并 PTC 的发病率甚至高达 12-23%,但是, HT 合并 PTC 的发病机制尚未完全阐明。最新研究表明,长链非编码 RNA(long noncoding RNA,lncRNA)与 PTC 的发生发展有关,探索 HT 背景下 PTC 的 lncRNA 表达状况,有利于寻求 HT 疾病发展过程中发生 PTC 的机理。</p> <p>LncRNA 是指不能翻译为蛋白的功能性 RNA 分子,其调节生长发育、细胞定向分化、亚细胞结构分布、进化选择等和人类疾病的关系。由于在 HT 合并 PTC 的发生机制中, lncRNA 的角色尚未明了。申请者试图对 HT 背景下甲状腺乳头状癌样本中 lncRNA 的差异表达进行系统筛选。选取甲状腺乳头状癌患者标本 10 例,其中 5 例为无 HT 背景的 PTC, 5 例为 HT 合并 PTC, 取 10 份 PTC 标本及对应患者的癌旁甲状腺组织,应用 lncRNA 芯片技术进行 lncRNA 筛选,寻求 HT 合并 PTC 的 lncRNA 特异性表达谱。</p> <p>根据特异性 lncRNA,选取 PTC 患者标本 30 例,其中 15 例为无 HT 背景的 PTC, 15 例为 HT 合并 PTC, 取 30 份 PTC 标本及对应患者的癌旁甲状腺组织,通过 qRT-PCR 技术进行验证,以确定特异性 lncRNA,并且分析其在 HT 背景下发生 PTC 的作用。</p>
主题词		<p>1、主题词限填二个; 2、主题词之间空一格; 3、按《医学主题词表 MESH》填写</p> <p>甲状腺肿瘤 长链非编码 RNA</p>

1. 本项目研究意义、国内外同类研究现状及文献查新情况:

甲状腺乳头状癌 (papillary thyroid carcinoma, PTC) 是近年来发病率上升最快的恶性肿瘤之一, 严重危害人类生命健康。桥本氏病 (Hashimoto's thyroiditis, HT) 是常见的甲状腺自身免疫性疾病, 与肿瘤发生发展密切相关。桥本氏病合并甲状腺癌呈上升趋势, 尤其是甲状腺乳头状癌, 所以二者的关系已成为研究热点。

1955 年 Dailey 等首先提出甲状腺癌是由 HT 演变而来, 其后大量学者的研究也印证了此观点。但也有学者认为二者并存为偶然现象。所以, HT 与 PTC 的关系到底如何? Eng C 等研究发现 Ret/PTC 癌基因的表达几乎只存在于 PTC 中; 而 Pasquale 等发现所有 PTC 和部分 HT 中的不典型结节免疫组化均显示 RET/PTC 蛋白阳性, 因而认为桥本甲状腺炎中的不典型结节可能是甲状腺乳头状癌的癌前病变。Dailey 等观察到桥本甲状腺炎病理改变区域与明显的甲状腺癌之间, 存在一上皮细胞过度增生的过度带。王家耀认为 HT 病变区部分甲状腺滤泡内的甲状腺上皮细胞由于淋巴细胞的刺激呈乳头状增生, 并有非典型增生和微小癌灶移行区的现象。因此, 认为 HT 为 PTC 的前期病变。

又有学者研究发现, HT 和 PTC 病变中存在大量树突状细胞, 而正常甲状腺无树突状细胞存在。树突状细胞激活免疫细胞, 进而造成免疫杀伤, 自身免疫反应越强, 甲状腺滤泡上皮增生越显著, 越易癌变, 提示自身免疫机制在 HT 发生癌变过程中起一定作用。另外, HT 可导致甲状腺结构破坏, 影响甲状腺激素产生, 使甲状腺长期处于功能低下状态, 反馈性地引起促甲状腺激素分泌增加, 促甲状腺激素作用于促甲状腺激素受体, 长期过度刺激使甲状腺滤泡过度增生而发生癌变。在 HT 背景下出现 PTC 的机制尚待清楚。

长链非编码 RNA 首先是在大鼠全长 cDNA 序列文库中被描述的, 最初分离出的 lncRNA 是接近编码基因的非编码 RNA, 包括重叠、顺反义、内含子非编码 RNA。LncRNA 不单独表现已知 RNA 特性, 而是表现对这些特性的综合。LncRNA 异常丰富, 最初被认为是由于转录过程中 RNA 聚合酶的低保真度所致。LncRNA 可以通过许多机制调节 RNA 聚合酶 II 的活性, 包括通过干扰起始复合物的形成, 影响启动子的选择性, 从而控制转录过程。同时, 其在转录调节中也可作为关键蛋白的共激活因子, 影响结合蛋白的活性。LncRNA 功能异常常导致分化和发育过程疾病的发生。许多 lncRNA 涉及疾病的病因, 现已引起研究者越

来越大的兴趣,尤其是癌症中 lncRNA 的错调。

最近研究发现 linRNA 在慢性淋巴细胞白血病、结肠直肠癌和肝细胞癌中都存在异常表达,这些 linRNA 大都位于脆性位点或癌基因附近。通过对比乳腺癌初期和晚期细胞,发现很多 linRNA 的表达具有很大差异;此外,在不同类型肿瘤中 linRNA 表达量有时也会相差数百至数千倍。LinRNA 异常表达能引起错误的染色质修饰和 DNA 甲基化状态的改变,可能导致细胞生长加快、失控,促进肿瘤的发生。在原位癌中,linRNA-ANRIL(抑癌基因 CDKN2A、CDKN2B 的反义转录子)可作用于 CBX7(PRC1 亚基)引起异染色质化导致基因沉默。LinRNA-MALAT-1 在很多肿瘤中都高表达,它可以调节 SR 剪接子在核斑上的分布,它是患者预后不良的重要标记。某些信号通路蛋白可通过 linRNA 影响通路下游靶基因的表达,如 linRNA-p21 被 P53 诱导募集蛋白 hnRNP-K 抑制下游通路基因表达。这些都证明 linRNA 异常表达不仅仅是癌症发生发展的副效应,它与肿瘤的进程有很大关联。

但是, LncRNA 在 HT 合并 PTC 中研究尚未见相关报道。

1. Calin GA, Liu CG, Ferracin M, et al. Ultraconserved regions encoding ncRNAs are altered in human leukemias and carcinomas. *Cancer Cell*, 2007. 12: 215-229.
2. Gupta RA, Shah N, Wang KC, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature*, 2010, 464: 1071-1076.
3. Tsai MC, Spitale RC, Chang HY. Long intergenic non-coding RNAs-New links in cancer progression. *Cancer Res*, 2011, 71: 3-7.
4. Tsai MC, Manor O, Wall Y, et al. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science*, 2010. 329: 689-693.
5. Yap KL, Li S, Munoz-Cabello AM, et al. Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. *Mol Cell*, 2010, 38: 662-674.
6. Tripathi V, Ellis JD, Shen Z, et al. The Nuclear-Retained Noncoding RNA MALAT1 Regulates Alternative Splicing by Modulating SR Splicing Factor Phosphorylation. *Mol Cell*, 2010. 39: 925-938.
7. Huarte M, Rinn JL. Large non-coding RNAs: missing links in cancer? *Hum Mol Genet*, 2010, 19: R152-161.

2. 主要研究内容、目标、方案、拟解决的关键问题及创新点:

研究目标

1. 寻求桥本氏病合并甲状腺乳头状癌的 lncRNA 特异性表达谱。

研究内容

1. 探索阶段:

选取甲状腺乳头状癌患者标本 10 例, 其中 5 例为无 HT 背景的甲状腺乳头状癌, 5 例为 HT 合并甲状腺乳头状癌, 取 10 份甲状腺乳头状癌标本及对应患者的癌旁甲状腺组织, 应用 lncRNA 芯片技术进行 lncRNA 筛选, 寻找差异显著的特异性 lncRNA。

2. 验证阶段:

根据特异性 lncRNA, 选取甲状腺乳头状癌患者标本 30 例, 其中 15 例为无 HT 背景的甲状腺乳头状癌, 15 例为 HT 合并甲状腺乳头状癌, 取 30 份甲状腺乳头状癌标本及对应患者的癌旁甲状腺组织, 通过 qRT-PCR 技术进行验证, 以确定特异性 lncRNA, 并分析其在 HT 背景下发生甲状腺乳头状癌的作用。

入组标准

- 1、所有标本均取得患者知情同意;
- 2、排除甲状腺乳头状癌外其他恶性肿瘤疾病史;
- 3、病理证实甲状腺乳头状癌或桥本氏病合并甲状腺乳头状癌。
- 4、所有标本全部经过二位主治以上病理科医师确诊。

基因芯片技术

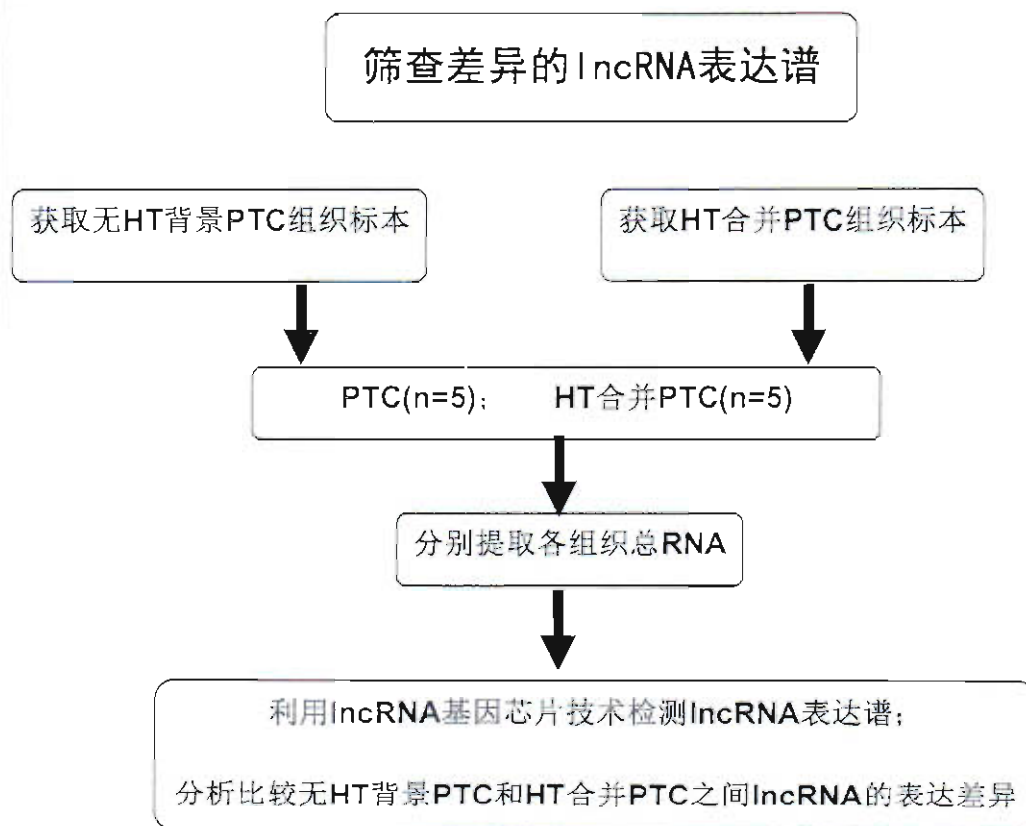
用 Trizol (Invitrogen) 和 miRNeasy mini kit (QIAGEN) 提取总 RNA, 并用 NanoDrop 100 对所得 RNA 样本的质量进行检测, 之后用 Arraystar 公司 12×135K 的 Human lncRNA 芯片, 芯片探针为~60nt 的长寡核苷酸, 最后用 Axon GenePix 4000B 进行扫描并输入 GenePix Pro 6.0 software (Axon) 进行分析以获取差异性表达的特异性 lncRNA。

RT-PCR 技术:

Trizol 法提取标本总 RNA, 并将所得 RNA 通过分光光度仪 (UV-2401PC) 进行总 RNA 浓

度、纯度和完整性的分析，以吸光度 A260/A280 为 1.9~2.1、RNA 完整性值(RIN)≥6.0 及 28S/18S>0.7 判定为合格。RNA 经判定合格后利用 Invitrogen 公司提供的 cDNA 进行逆转录，逆转录完成后行 RT-PCR，利用 Incbase 数据库对基因芯片分析所得特异性 lncRNA 进行引物设计，在 ABI7500RT-PCR 仪中进行扩增反应。反应结束由计算机自动计算得到各反应管循环阈值(threshold cycle,Ct)，目的基因表达量= $2^{-\Delta Ct}$ ， $\Delta Ct = Ct(miRNA) - Ct(6U RNA)$ 。

技术路线



验证差异表达的 lncRNA

分别收集无HT背景PTC的组织标本 (n=15) 及HT合并PTC组织标本 (n=15)

分别提取组织中的总RNA

选择芯片结果中表达差异显著lncRNA, 设计相应lncRNA的引物

进行qRT-PCR验证, 确定差异表达的目标lncRNA

拟解决的关键问题:

是明确桥本氏病背景下甲状腺乳头状癌 lncRNA 表达状况。

创新点:

通过研究有无桥本氏病背景甲状腺乳头状癌 lncRNA 表达的差异, 明确桥本氏病与甲状腺乳头状癌的密切关系; 阐明 lncRNA 在桥本氏病背景下发生甲状腺乳头状癌的作用。

3. 分年度计划安排及具体考核指标:

2013.6-2013.12

- (1) 收集甲状腺乳头状癌患者标本 10 例, 其中 5 例为无 HT 背景的甲状腺乳头状癌标本, 5 例为 HT 合并甲状腺乳头状癌标本, 及对应患者的癌旁甲状腺组织;
- (2) 应用 lncRNA 芯片技术进行 lncRNA 筛选, 寻找二组差异 lncRNA 表达谱, 确定特异性 lncRNA。

2014.1-2015.6

- (1) 收集甲状腺乳头状癌患者标本 30 例, 其中 15 例为无 HT 背景的甲状腺乳头状癌, 15 例为 HT 合并甲状腺乳头状癌, 并取对应患者的癌旁甲状腺组织;
- (2) 利用 qRT-PCR 技术对特异性 lncRNA 进行验证。

2015.7-2015.12

- (1) 撰写科研论文;
- (2) 课题结题;
- (3) 申报成果。

4. 预期成果形式、应用前景、成果转化方式及效益:

1、通过 lncRNA 在桥本氏病合并甲状腺乳头状癌中表达的研究, 明确桥本氏病与甲状腺乳头状癌的密切关系, 为干预桥本氏病向甲状腺乳头状癌发展提供理论指导; 同时为桥本氏病背景下甲状腺乳头状癌的发生途径揭示新的思路。

3、在核心期刊发表 2-3 篇文章, SCI 论文 1 篇;

4、培养研究生 2-3 名。

5. 本项目已有的工作条件及需添置的仪器设备：

本院中心实验室具有分光光度仪（日本 UV-2401PC）、ABI7500RT-PCR 仪等本项目相关的工作条件，无需添置仪器设备，基因芯片委托上海康成生物。

6. 经费预算（单位：万元）：

	合 计	仪器 设备费	实验 材料费	科研 业务费	科研 协作费	组织 实施费	其 他
合 计	5		2	0.5	1.6	0.5	0.4
2013 年	2.5		1	0.2	1	0.2	0.1
2014 年	1.5		0.7	0.2	0.3	0.2	0.1
2015 年	1		0.3	0.1	0.3	0.1	0.2
年							

项目负责人专业特长与科研业绩

专业特长	擅长专业	甲状腺肿瘤、乳腺肿瘤、胃肠肿瘤
	熟悉专业	肿瘤外科
	相关或了解专业	普通外科

主要科研业绩（包括五年内承担的课题、获得的专利、成果及奖励、论文发表情况，并要求注明来源、级别及名次）：
 承担的课题(主持人，已完成)
 1. 荧光原位杂交技术检测乳腺癌 HER-2/neu 基因扩增的临床应用研究-----卫生部子课题 2008
 2. 血清 Tbx3 在乳腺癌诊断中的临床应用研究-----杭州市科技局 2010
 3. 甲状腺乳头状癌 MicroRNAs 表达谱研究及其临床相关性分析
 -----浙江省 151 人才培养资助基金 2012

论文发表（通讯作者）
 (1) 甲状腺乳头状癌患者颈淋巴结转移的临床研究. 医学研究杂志, 2012, 41(7): 169-171.
 (2) 颈侧区淋巴结转移阳性甲状腺乳头状癌颈淋巴结转移规律分析 [J]. 现代实用医学, 2012, 24(10): 1135-1136.
 (3) Zuckerkandl 结节在甲状腺手术中的临床意义 [J]. 医学研究杂志, 2012, 41(8): 180-183.
 (4) 血清 CEA 升高诊断甲状腺髓样癌 3 例诊治分析 [J]. 现代实用医学, 2012, 24(11): 1293-1295.
 (5) 甲状旁腺肿瘤合并甲状腺乳头状癌 5 例临床分析 [J]. 肿瘤学杂志, 2012, 18(9): 713-714.
 (6) HER-2 蛋白表达和基因扩增与乳腺癌预后的关系, 浙江医学, 2010, 32 (2): 166-168
 (7) 超声造影对甲状腺乳头状癌诊断价值的探讨, 现代实用医学, 2009, 21 (4): 308-309
 (8) 甲状腺乳头状癌超声造影的定量分析, 中国癌症杂志, 2009 年, 19 (1): 76-77
 (9) 41 例双侧甲状腺癌外科治疗分析, 肿瘤学杂志, 2009, 15 (2): 123-125
 (10) 中央区淋巴结清扫在 cN0 甲状腺乳头状癌手术中的价值, 浙江临床医学, 2008, 10 (11): 1426-1427
 (11) 甲状腺 microRNAs 表达谱研究及其临床相关性分析. 中华普通外科杂志, 2013. 8 (待发表)

7. 项目负责人承诺:

我保证上述填报内容的真实性。如果获得资助,我与本项目组成员将严格遵守杭州市卫生科技计划(重大)项目管理的有关规定,切实保证研究工作时间,认真开展工作,按时报送有关材料。

项目负责人(签名):

年 月 日

8. 申请单位审核意见与承诺:

申请单位审核意见(包括配套经费情况说明):

并承诺:

已对申请书内容进行审核,申请课题如获资助,保证对研究计划实施所需的人力、物力和工作时间等条件给予保障,严格遵守杭州市卫生科技计划(重大)项目管理的有关规定,督促项目首席专家和项目组成员以及本单位项目管理部门按规定及时报送有关材料。

单位负责人(签章)

单位公章

年 月 日

9. 合作单位承诺:

同意参加合作研究,并保证对合作研究所需的人力、物力和工作时间等条件给予保障,督促参加合作研究人员按计划完成所承担的任务并提交科学可靠的研究资料。

合作单位1(公章)

合作单位2(公章)

合作单位3(公章)

年 月 日

年 月 日

年 月 日

10. 上级主管单位意见

单位负责人（签章）

单位公章：

年 月 日

11. 杭州市卫生局审批意见

重点项目，补助5万元



单位公章：

年 月 日

浙江省科技计划项目

任 务 书

计 划 编 号 : 2017C33180

项 目 名 称 : 右侧喉返神经后方淋巴结清扫在甲状腺乳
头状癌中的前瞻性临床研究

计 划 类 别 : 公益技术应用研究

承 担 单 位 : 杭州市第一人民医院

项 目 负 责 人 : 丁金旺

起 止 年 月 : 2017-01-01 至 2019-12-31

浙 江 省 科 学 技 术 厅

2 0 1 6 年 制



填写说明

1. 本任务书文本适用于财政科技经费以“分期拨款”方式资助的一般科研计划项目、软科学研究项目。

2. 本任务书所列内容应事实就是填写，表达要明确、严谨。

3. 任务书中的“主要研发内容”，包括主要研发内容、关键技术及创新点等。

4. 任务书中的“项目主要技术、经济指标”，包括项目完成时应达到的主要技术指标和水平、发表论文、申请获得专利等知识产权、人才培养及其他应考核的指标；技术及产品所形成的市场规模、生产能力、示范基地、产值、销售收入、利润等经济效益指标。公益类项目侧重于社会效益和潜在的经济效益指标。软科学研究项目需填写项目成果提供形式。

5. 任务书中的“项目经费支出预算”，按《浙江省省级科技研发和成果转化项目经费管理暂行办法》（浙财教〔2012〕357号）规定的开支范围填写。



一、项目基本情况

项目名称	右侧喉返神经后方淋巴结清扫在甲状腺乳头状癌中的前瞻性临床研究		
项目主管处室	社发处	项目主管	叶琳
项目计划类别	公益技术应用研究	技术管理领域	外科
归口管理部门	杭州市科技局	项目技术来源	自主开发
项目开始日期	2017-01-01	项目完成日期	2019-12-31
承担单位	单位名称	杭州市第一人民医院	
	单位类型	其他	法人代码 47011661-4
	通讯地址	杭州市浣纱路 261 号	邮政编码 310006
	联系人	陈文通	手机 13805799571
	电话/传真	0571-56005600	E-mail hzsyyy1@163.com



二、项目负责人及项目组成员

项目负责人

姓名	丁金旺	证件号码	332528198303130610			
学历	研究生	学位	硕士			
职称	中级	现从事专业	肿瘤外科			
手机	13735420108	E-mail	zjlsdjw@163.com			
工作单位	杭州市第一人民医院	法人代码	47011661-4			
通讯地址	浙江省杭州市浣纱路261号	邮政编码	310006			

项目组成员

姓名	证件号码	所在单位	职称	从事专业	项目分工	年参加项目工作时间(月)
张卧	330105198206130012	杭州市第一人民医院	中级	肿瘤外科	参加	5
张煜	320722198912130025	杭州市第一人民医院	初级	肿瘤外科	参加	5
罗定存	330302196510170839	杭州市第一人民医院	正高	肿瘤外科	参加	5
韩志江	211324197610225012	杭州市第一人民医院	副高	放射科	参加	5
王克义	330326197609091116	杭州市第一人民医院	副高	医学检验	参加	5
彭友	230121198004012612	杭州市第一人民医院	中级	肿瘤外科	参加	5
张仕蓉	330203198211140947	杭州市第一人民医院	中级	分子检测 (转化医学)	参加	3
时晶晶	320722199009122648	杭州市第一人民医院	初级	肿瘤外科	参加	3
荀延萍	142603198604243048	杭州市第一人民医院	初级	分子检测	参加	3



雷志锴	362531197811060611	杭州市第一人民医院	副高	超声科	参加	2
潘钢	330624198302170395	杭州市第一人民医院	中级	肿瘤外科	参加	3
俞灵莺	330621197604301166	杭州市第一人民医院	副高	内分泌科	参加	2
王伟	342224198009290058	杭州市第一人民医院	中级	病理学检测	参加	2
赵春雷	210711197204274213	杭州市第一人民医院	正高	核医学科	参加	1
沈杰	32058219921007791X	杭州市第一人民医院	其他	肿瘤外科	参加	4
陆思	330522199309060822	杭州市第一人民医院	其他	肿瘤外科	参加	5



三、主要研发内容

1、研究主要内容

(1) 遴选 LN-prRLN 转移的高危因素 (即 LN-prRLN 清扫指征): 收集 LN-prRLN 清扫病例的临床病理资料如性别、年龄、大小、数量、腺外侵犯、淋巴结转移等, 检测 BRAFV600E 等分子指标表达情况, 筛选 LN-prRLN 转移高危因素, 通过其预测效能指标 (如灵敏度、特异度及 AUC 等), 最后遴选出有较高预测价值的高危特征。

(2) 优化 LN-prRLN 的影像学术前评估方案: 入组 PTC 行高分辨率彩色超声检查、颈部 CT 扫描及三维重建、核磁共振检查, 观察甲状腺结节及颈部淋巴结 (尤其 LN-prRLN) 的超声特征, 分析甲状腺癌颈部淋巴结转移的 CT 和核磁共振特征, 探索并优化这 3 种影像学新技术联合检查对甲状腺癌颈部淋巴转移 (尤其是 N-prRLN) 的诊断评估方法。

(3) 评估 LN-prRLN 清扫对 PTC 的疗效与安全性: 分析无病生存、无复发生存及总生存率等预后指标在 LN-prRLN 清扫组与非清扫组中的差异, 比较手术后近、远期各种并发症 (如出血、淋巴漏、声音改变、手足麻木、血钙、PTH、骨折等) 的差异, 综合评估 LN-prRLN 清扫在 PTC 患者手术治疗中的利与弊。

2、关键技术

(1) 确定 LN-prRLN 清扫的范围: 目前并无明确标准, 通过前期的摸索研究, 结合文献资料, 定义了 LN-prRLN 清扫范围: 上界: 右喉返神经入喉水平; 下界: 颈总动脉与气管食管沟交叉处 (临近右侧肺尖胸膜顶处); 内侧界: 气管食管旁; 外侧界: 颈总动脉内侧缘, 深面: 颈深筋膜深层 (椎前筋膜) 及食管前壁; 浅层: 右喉返神经所在平面。

(2) LN-prRLN 清扫时右喉返神经及甲状旁腺的保护: 掌握精细化甲状腺被膜解剖技术是保证术中避免或尽可能减少右喉返神经及甲状旁腺损伤的最重要措施。本课题组参与手术的主刀和一助均是经验丰富的甲状腺外科专科医师, 精通喉返神经及甲状旁腺的保护, 而且在前期的研究训练和学习曲线中均已熟练掌握 LN-prRLN 清扫的手术技巧, 可以保证本项目立项后的顺利开展。

(3) BRAFV600E 等分子检测: 实时荧光定量 PCR 技术是目前检测 BRAFV600E 基因突变等异常表达中灵敏度和特异度最高的方法, 本项目组已熟练掌握该技术, 市面上已有非常成熟的商品化 PCR 试剂盒可直接用于检测。

(4) 实验组和对照组的长期随访: 本项目组依托所在单位甲状腺疾病诊治中心的“甲状腺癌重大科技创新专项项目平台”, 现已成功开发并运行“甲状腺癌随访管理系统 (多中心)”, 本项目后期的前瞻性随机对照随访研究可以一并纳入该数据库, 专人管理, 保证项目的长期有效开展。

3、主要创新点

(1) 本项目为甲状腺乳头状癌 LN-prRLN 清扫的前瞻性研究, 具有较高的可信度, 目前仍无该方法的大样本研究报道。

(2) 本项目首次以 LN-prRLN 为研究重点, 探索高分辨力彩色超声、颈部 CT 及三维成像技术、核磁共振等对甲状腺癌颈部淋巴转移 (尤其是 N-prRLN) 的评估价值。

(3) 本项目不仅从传统的临床病理特征中寻找 LN-prRLN 转移的高危因素, 而且从核酸水平 (如 BRAFV600E 等) 探究本质性的因素。

(4) 本项目除观察 LN-prRLN 清扫的近期疗效和并发症外, 还将研究对象全部纳入“甲状腺癌随访管理系统 (多中心)”一并随访, 可以获取远期疗效及并发症的数据, 为



最终分析 LN-prRLN 清扫的临床应用价值提供科学有力的依据。



四、项目成果提供形式

本项目计划通过设计开展 PTC 患者的右侧喉返神经后方淋巴结清扫系列研究，不仅期望获得短期内的科研成果（如遴选 LN-prRLN 转移的预测指标、探索并优化 LN-prRLN 的术前影像学评估方案、积累手术经验、发表论文、培养后备人才等），而且也期待为获得 LN-prRLN 清扫的长期随访结果而奠定坚实的基础。具体成果形式如下：

- (1) 遴选预测 LN-prRLN 转移的高危因素，确定 LN-prRLN 清扫的手术指征；
- (2) 探索并优化 LN-prRLN 的术前影像学评估方案；
- (3) 评价 LN-prRLN 清扫对 PTC 的疗效与安全性；
- (4) 发表国内核心期刊论文 5-6 篇，发表有影响力的 SCI 论文 1-2 篇；
- (5) 参加全国级甲状腺癌学术大会 2 次，争取做大会报告交流 LN-prRLN 清扫的经验；
- (6) 举办医学继续教育类学术会议 2 次，推广 LN-prRLN 的临床应用；
- (7) 培养研究生 2 名，培养学科后备人才 1 人。



五、项目经费来源

1、本项目研发总结费 20 万元,其中:甲方补助 10 万元,乙方自筹 10 万元,丙方配套 0 万元。

2、经费拨付和到位计划:

单位:万元

	首期	合计
甲方	10	10
乙方自筹	10	10
丙方配套	0	0

六、项目经费支出预算

单位:万元

经费开支科目		预算经费总额	其中省科技厅经费
一	直接费用	19.5	9.5
1	设备费	1.5	1.5
2	材料费	5.5	3
3	测试化验加工费	4	3
4	燃料动力费	0	0
5	差旅/会议/国际合作交流费	2	1
6	合作协作研究与交流费 (国内合作)	0	0
7	出版/文献/信息传播/知识产权事务费	4	1
8	人员劳务费	1.5	0
9	专家咨询费	1	0
二	间接费用	0.5	0.5
10	间接费用(包含管理费与激励费)	0.5	0.5
合计		20	10



七、需增添的仪器设备

单位：万元

名称及规格型号	数量	单价	省科技厅拨款	自筹或其他	用途说明
摄像（摄影）系统	1	1.5	1.5	0	用于手术及实验过程中图像（视频）的摄取与保存



甲方(项目委托单位): 浙江省科学技术厅(盖章)



单位负责人(签字):

2017年4月11日

乙方(项目承担单位): 杭州市第一人民医院(盖章)

项目负责人(签字):



单位负责人(签字):



年 月 日



杭州市科技发展规划

项目合同书

计划编号: 20131813A08

项目名称: 分化型甲状腺癌的基础研究及多学科诊治

计划类别: 重大科技创新专项

委托单位(甲方): 杭州市科学技术委员会

承担单位(乙方): 杭州市肿瘤医院

主管单位(丙方): 杭州市卫生局

项目执行期: 2012年01月01日至2017年01月01日

杭州市科学技术委员会

二〇一二年制

填 写 说 明

一、本合同文本适用于列入杭州市科技发展计划体系中各级计划项目，如科技攻关计划、高新技术研究计划、科技产业化计划、创新条件与环境建设计划的各类项目等。

二、本合同所列各项内容应实事求是地逐条认真填写，表达要明确、严谨。填写合同时请仔细阅读合同条款，并严格按合同条款执行。

三、本合同填写内容应与项目申请书和可行性报告中的内容相符。本合同与项目申请材料构成一套立项的原始资料，承担单位承担任务以合同内容为依据。

四、合同中“一、项目基本情况”“经济效益”、“成果产出指标”应与“五、关键技术突破与创新点、经济指标”一致，是项目验收时考核的指标。

五、合同中“项目开支预算”应按〈浙江省财政厅、浙江省科技厅关于印发浙江省省级科技研发和成果转化项目经费管理暂行办法的通知〉（浙财教〔2010〕382号）规定的分期拨款项目的经费开支范围填写。

六、合同中“主要任务、关键技术突破与创新点、经济指标”不同计划类别的项目要求不同。如高新技术研究计划主要填写要解决的关键技术、研究的创新点和内容；其他各类计划项目应根据有关管理办法的规定填写。目标包括：（1）主要技术指标：如知识产权获得情况、新技术、新产品、论文专著、研究报告等数量、指标及水平；（2）经济指标：如技术及成果应用所形成的（小试、中试、生产线）生产规模、市场容量、经济效益、示范基地等；软科学项目应填写最终完成的报告、资料目录。

七、对于项目中有多家承担单位和主管单位的请在签订合同各方相应栏目中具体填写。

八、合同中丙方系指区、县（市）科技局、高新区管委会（滨江）、经济技术开发区管委会或市级行业主管部门。

九、本合同由市科委与主要承担单位签订，如承担单位为两个或两个以上，需另附承担单位之间明确相互责任的协议。

十、本合同一式六份，一律采用A4纸打印，分存甲方、乙方、丙方。

一、项目基本情况

项目名称	分化型甲状腺癌的基础研究及多学科诊治									
项目计划类别	重大科技创新专项									
项目技术领域	医疗卫生									
技术来源	自有技术									
市科委职能处室	农社处			项目主管人			林霄			
完成年度的项目实现经济效益目标	年销售收入（万元）		年净利润	年税金（万元）			年创汇（万美元）			
成果产出指标数量（是指项目完成时已授权、批复、登记或出版）	专利			标准			品牌、商标	版权	其它	
	发明专利	实用新型专利	外观专利	国际	国家	行业				
发表论文	10			人才引进与培养			3			

二、项目经费

总经费 (万元)	自筹 (万元)	市科委拨款 (万元)	区、县(市) 或归口单位配 套拨款(万 元)	备注
500	350	150.00		

拨款计划	日期	2013-12-18	2014-12-18	2017-06-30	合计
	金额(万 元)	78	27	45	150

经费开支预算	预算经费总额 (万元)	其中市科委经 费预算(万 元)	其中区、县 (市)或归口 单位配套经费 预算(万元)
1.人员费	20	0	
2.设备费	120	10	
3.材料费	130	60	
4.测试化验加工费	40	15	
5.燃料动力费	10	0	
6.差旅费	30	1	
7.会议费	15	4	
8.合作协作研究和交流 费	50	50	
9.出版/信息传播/知识产 权事务费	25	4	
10.劳务费	30	1	
11.专家咨询费	5	2	
12.间接费用	20	2	
13.其它费用	5	1	

三、承担单位

第一承担单位	单位名称	杭州市肿瘤医院		
	法人代码	47011661-4		
	详细地址	杭州市上城区中山南路严官巷34号(万松岭隧道东侧)	邮政编码	310002
	单位E-mail	qiantry@163.com	市民邮箱	
	单位负责人	吴式琇	联系电话手机	0571-56006013
	单位联系人	钱慧珍	联系电话手机	18205812711
	开户银行	杭州银行股份有限公司湖墅支行	银行帐号	75718100507132
	归口管理部门	杭州市卫生局		
第二承担单位	单位名称	杭州市第一人民医院		
	详细地址	杭州市浣纱路261号	邮政编码	310006
	单位E-mail	kejiaoke126@126.com	市民邮箱	
	单位负责人	马胜林	联系电话手机	13588799118
合作单位	单位名称	法人代码	职责	
	浙江大学医学院附属第一医院	47000322-2	负责甲状腺癌的基础研究及协助临床研究	

四、项目负责人及项目组成员

项目负责人	姓名	罗定存						
	身份证号码	330302196510170839						
	联系电话、手机	0571-56006013 13732225858						
	E-mail	ldc65@163.com						
	学历	本科		学位	学士			
	职称、职务	主任医师、副院长		专业	肿瘤外科			
	在本项目中的分工	项目总体规划与实施						
	工作单位	杭州市肿瘤医院						
	单位法人代码	47011661-4						
项目组成员	姓名	出生年月日	专业技术职务	专业	工作单位	在本项目中分工		
	滕理送	1965-12-07	主任医师	肿瘤外科	浙一医院	课题组织、实施、监督及指导		
	丁金旺	1983-03-13	主治医师	肿瘤外科	杭州市第一医院	miRNA/LncRNA在DTC及其侵袭性生物学行为中的研究		
	王伟斌	1981-08-17	主治医师	肿瘤外科	浙一医院	BRAFV599Ins在难治性甲状腺癌发生发展中的分子机制研究		
	韩志江	1976-10-04	副主任医师	放射科	杭州市第一医院	超声联合CT对颈部转移性淋巴结的评估价值		

		医师			
雷志铠	1978-11-23	副主任 医师	超声科	杭州市肿瘤医院	超声细针穿刺活检结合分子标记物对DTC的早期诊断价值
张卧	1982-06-13	主治 医师	肿瘤外科	杭州市第一医院	碘营养状态与甲状腺癌的分子发病机理研究
俞灵莺	1976-04-12	副主任 医师	内分泌科	杭州市第一医院	DTC长期TSH抑制治疗的疗效评估及骨代谢风险干预研究
赵春雷	1972-04-14	副主任 医师	核医学科	杭州市肿瘤医院	高危特征分子标记物与DTC术后I131治疗预后相关性研究
周健	1961-11-02	主任 医师	放射科	杭州市肿瘤医院	核磁共振弥散成像在甲状腺癌淋巴结转移中的临床研究
周荣璟	1973-03-12	主治 医师	病理科	杭州市肿瘤医院	负责所有标本的病理解断、协助分子检测
王浩浩	1981-11-03	主治 医师	肿瘤外科	浙一医院	临床资料库的日常管理和随访，撰写论文，申请专利
刘友忠	1986-08-22	住院 医师	肿瘤外科	杭州市肿瘤医院	协作对碘营养状态与甲状腺癌的分子发病机理研究
王克义	1976-09-14	副主任 医师	检验科	杭州市第一医院	负责各种标本的保存、管理及血清样本的检测
彭友	1980-07-05	主治 医师	肿瘤外科	杭州市第一医院	负责所有手术相关研究

潘钢	1983-02-28	主治医师	肿瘤外科	杭州市第一人民医院	不同手术方式对DTC的预后影响
徐益平	1986-11-21	技师	病理科	杭州市肿瘤医院	负责所有组织标本的病理科制片，协助分子检测
王海勇	1980-01-22	主治医师	肿瘤外科	浙一医院	负责标本库的日常管理
俞雄飞	1975-03-07	主治医师	肿瘤外科	浙一医院	负责各合作单位之间的沟通协调
李中琦	1975-04-26	副主任医师	肿瘤外科	浙一医院	负责项目所有文档资料的保存、管理，负责所有子课题伦理学的追踪和监督
张煜	1989-12-13	研究生	肿瘤外科	杭州市第一人民医院	标本收集、随访跟踪
徐骁诚	1989-08-07	研究生	肿瘤外科	杭州市第一人民医院	标本收集、数据统计

五、项目研发主要任务、关键技术突破与创新点、经济指标

项目研发主要任务:

在分化型甲状腺癌的发病机理、早期诊断及多学科综合治疗等方面开展一系列的研究,包括过量碘摄入与甲状腺乳头状癌的相关性及分子机制,肿瘤分子标记物在分化型甲状腺癌的早期诊断价值,优化的影像学技术方案对甲状腺癌淋巴结转移等评估价值,不同术式对甲状腺癌的预后价值,TSH抑制的预后及风险干预,基于分子标记物指导的I131对低危分化型甲状腺癌的预后评估等。如上述研究能取得成功,将会对现今的诊疗决策和思路带来新的理论支持,为病人的个体化治疗提供依据,并有可能影响甲状腺癌的治疗手段的选择模式,最终给病人提供最好的疗效,并最大限度的减低治疗带来的副作用。此外,通过本项目的开展,可以建立相当规模的标本库,并将建立大样本的国人甲状腺癌资料库,拥有国内自己的随访资料,不仅可以为今后更长期更广泛领域的研究打好基础,也可以为卫生行政部门进行甲状腺癌的防控提供依据。

项目关键技术突破与创新点

该项目的技术关键是:

- 1、利用芯片技术从目前已知和未知的海量标记物中筛选出与甲状腺癌及其生物学行为相关的分子标记是本项目的一大技术关键,该技术具有高通量、高集成、微型化、连续化和自动化的特点。
- 2、循环血中分子标记物如血清microRNA表达量较低,寻找一种灵敏度高、操作简便且成本低廉的检测方法是本项目拟解决的另一技术关键。BioPlex 200液相芯片技术是目前唯一得到权威机构和FDA共同认可用于临床诊断应用的生物芯片平台。
- 3、如何制定良好的工作机制和研究模式来确保科研的顺利进行也是本项目十分重要的关键问题,本项目依托甲状腺疾病诊治中心可以解决多学科研究所面临的一些复杂问题。
- 4、构建稳定表达的野生型及突变型BRAF的甲状腺癌细胞系和致瘤模型是本项目研究难治性甲状腺发病机制的基础和关键,本项目已经成功建模,经过检测,基因表达稳定。

该项目的创新之处:

- 1、通过DNA、RNA和蛋白质水平探索甲状腺癌的发生、发展及侵袭性的分子机制。
- 2、通过外科、内分泌科、影像科和核医学科等临床多学科的综合研究,为甲状腺癌的个体化诊治提供理论依据。

项目预期目标(主要技术经济指标;自主知识产权设想):

- 1、建立国内相当规模的甲状腺癌组织和血清标本库,建立国内资料完整的大样本甲状腺癌随访信息库;
- 2、筛选出与甲状腺癌生物学行为相关的生物标记物,通过大量临床病例验证,以期最终获得1-2种能够用于早期诊断或甄别恶性程度的DTC生物标记物组合,并争取申请国家专利;
- 3、遴选DTC早期诊断的影像学综合评估技术和方案,并逐渐优化,争取推广;
- 4、明确多学科综合治疗手段对DTC的预后价值;

- 5、发表高质量的研究论文10-15篇，其中争取SCI收录5篇；
- 6、培养一批在甲状腺癌交叉学科领域具有综合知识和科研能力的人才，培养学科带头人3-4名，硕士研究生5名。

六、项目成果提供形式

- 1、甲状腺癌的临床信息库和随访资料库；
- 2、早期诊断或甄别甲状腺癌及恶性程度的生物标记物组合；
- 3、甲状腺结节和颈部转移性淋巴结的影像学评估方案；
- 4、高质量的科学研究论文10-15篇，其中争取SCI论文5篇；
- 5、培养研究生的毕业材料（包括毕业论文）。

七、计划进度目标

起始年月 (例: 2005-01 ~ 2005-12)	进度目标要求 (按季度或半年安排项目计划进度)
2012-1 ~ 2012-12	1. 查阅文献, 确定研究方向及重点; 2. 筛选以往研究病例及生物学标本, 有针对性的收集所需标本; 3. 开始建立甲状腺癌患者随访跟踪记录; 4. 积累甲状腺癌影像学资料; 5. 启动甲状腺癌分子机制的研究, 挖掘有潜力的分子标记物。
2013-1 ~ 2013-12	1. 继续收集所需各种标本及积累影像学资料; 2. 启动甲状腺癌分子标记物的筛选并初步验证其价值; 3. 纳入接受多学科治疗的DTC患者并进入随访程序。
2014-1 ~ 2014-12	1. 对前期验证中有研究前景的分子标记物进行大样本盲样检测; 2. 遴选影像学综合评估的优化方案; 3. 继续收集临床病例进入观察和随访程序。
2015-1 ~ 2015-12	1. 对有临床价值的分子标记物进行优化组合; 2. 推广DTC早期诊断的影像学综合评估技术和方案; 3. 继续完善临床病例随访及辅助治疗的风险监控。
2016-1 ~ 2016-12	1. 进行项目总结, 汇总数据, 分析实验结果, 发表论文; 2. 评估获得的生物标记物组合的早期诊断价值, 争取申请国家专利; 3. 组织申报国家级奖励。

八、需增添的仪器设备及用途

名称及规格型号	数量	单价	金额	资金来源	用途说明
三洋超低温冰箱	1	9.00 (万元)	9.00 (万元)	资助经费	保存标本
联想电脑	2	0.50	1.00	资助经费	数据统计, 病例随访
双开门冰箱	1	0.46	0.46	自筹经费	药物及生物制品储存
不锈钢小鼠笼架	1	0.45	0.45	自筹经费	药物及生物制品储存
聚砜小鼠笼	30	0.06	1.80	自筹经费	实验动物的饲养与保存
净化工作台	1	0.70	0.70	自筹经费	提供洁净的实验工作平台
PH计	1	0.32	0.32	自筹经费	用于试剂、溶液等液体的pH分析
贝克曼·库尔特流式细胞仪	1	79.00	79.00	自筹经费	测定细胞周期及衡量细胞增殖分裂状况
海尔冰箱	1	0.20	0.20	自筹经费	用于标本的暂时性保存、实验试剂及药物的短期保存
制冰机	1	2.97	2.97	自筹经费	制作碎冰用于实验需要
微量台式冷冻离心机	1	3.30	3.30	自筹经费	进行混合物质分离提纯
核酸蛋白分光光度计	1	3.30	3.30	自筹经费	用于核酸, 蛋白定量的定量
单道可调移液器	4	0.17	0.68	自筹经费	用于少量或微量标本、试剂的精确移取
电泳仪(美国Bio-Rad)	1	1.50	1.50	自筹经费	对不同物质进行定性或定量分析
IKA漩涡混匀器(MS3 basic)	1	0.29	0.29	自筹经费	各种样品振荡培养
药品保存箱(HYC)	1	1.10	1.10	自筹经费	药物及生物制品储存
中继模块(YDHz)	2	0.25	0.50	自筹经费	用于连接两种不同设备的模块
日本TaKaRa TP600型梯度PCR仪	1	5.50	5.50	自筹经费	通过DNA聚合酶对特定基因做体外或试管内In Vitro的大量合成
特制通风柜	1	2.1	2.1	自筹经费	通风、净化实验室
激光条码扫描器(Honey well)	1	0.28	0.28	自筹经费	用于样本信息记录及分类

半干转印槽(美国伯乐 Trans-Blot SD型 1703940)	1	1.68	1.68	自筹 经费	Western 转印杂交, 转印 DNA 和 RNA
普通双目显微镜(日本 奥林巴斯CX21型)	1	0.55	0.55	自筹 经费	双目观察细胞或物质等微观 形态
三用恒温水箱(DK- 420S)	1	0.12	0.12	自筹 经费	蒸馏、干燥、浓缩及恒温加 热化学药物及生物制品等
生物显微镜(日本奥林 巴斯CX31-12C04型)	1	2.55	2.55	自筹 经费	用于细胞或物质等微观观察
离心机(微型7K)	1	0.15	0.15	自筹 经费	进行混合物质分离提纯
自动纯水蒸馏器(SZ- 93-1)	1	0.25	0.25	自筹 经费	制备蒸馏水
(BIO-RAD) 伯乐550酶 标仪	1	0.25	0.25	自筹 经费	测定吸光度, 计算物质浓度

九、签订合同各方

委托单位（甲方）： 杭州市科学技术委员会 （盖章）

单位负责人： （签章）

承担单位（乙方）： 杭州市肿瘤医院 （盖章）

单位负责人（签字）： 吴式琇 （签章）

项目负责人： 罗定存

财务负责人： 方建芬

1
罗定存
方建芬



项目主管单位（丙方）： 杭州市卫生局

单位负责人： （签章）

（盖章）



合 同 条 款

签约各方，共同同意：

一、合同签订后至项目完成，乙方每年年中和年末应向甲方提交项目执行情况，并抄送丙方，逾期不报，甲方有权暂停拨款。

二、合同签订后，除不可抗拒的原因外，原则上不予修改。如确需修改某项条款，由签订合同各方共同商定修改。未经签约各方同意，不得单方更改。

三、项目经费中需甲方、乙方、丙方共同筹措的，各方资金应及时到位，甲方资金将在丙方配套资金落实到位后下拨。

四、项目经费，应专款专用，单独列帐，专项管理。并应按国家科技经费开支范围和现行财务制度开支标准掌握使用，不合乎规定的，甲方有权拒付和追回经费，情节严重应追究责任。甲方根据合同检查经费的中期使用情况和决算。

五、根据国民经济和科技发展的需要和趋势，甲方有权会同乙方和丙方协商中止合同执行，共同研究中止项目的处理事宜。

六、乙方无故不履行合同时，甲方有权终止项目并收回所拨经费。

七、丙方在项目执行过程中负有管理和监督的职责，以保证项目按合同执行，并协调合同执行过程中出现的问题，有权根据项目进展情况向甲方提出暂时中止或撤消合同的建议。

八、项目完成后，乙方按《杭州市科技计划与项目管理暂行办法》的有关规定及本合同的条款，向甲方申请验收、鉴定或结题等，并抄送丙方。

九、项目验收、鉴定或结题后，乙方必须在三个月内向甲方提供完整的验收、鉴定或结题资料，并抄送丙方。

十、本合同签订各方对资料等负有保密责任，对外发表论文不得引用未经批准的数据、科研成果或其他有关材料。未经甲方同意，乙方不得擅自转让科研成果。对于在本项目实施中形成的公益性科研成果，甲方有权与乙方、丙方协商后进行推广。

十一、本合同一经签订，签订各方均应负合同的法律责任。

浙江省医药卫生科技计划项目

合 同 书

计划类别：☐ 省部共建项目

☐ 科技平台项目

☒ 面上项目

☐ 技术成果项目

课题名称：

miR-146b-5p靶向调控LncRNA MALAT1影响甲状腺乳头
状癌侵袭性的作用机制

申 请 者：

彭友

申请单位：

杭州市第一人民医院

联系手机：

13666600944

申请日期：

2017-07-31

浙江省卫计委

二〇一二年制

一、项目情况

项目名称		miR-146b-5p靶向调控LncRNA MALAT1影响甲状腺乳头状癌侵袭性的作用机制			
研究类别	基础 研 究	已有 课题 名称			
		已有 课题 级别		已有 课 题 年 份	
申报学科		临床医学----肿瘤学			
开始日期	2018-01	完成日期	2020-12		
项目经费预算 （万元）					
总计	向 省 卫 生 计 生 委 申 请	市卫 生局 配套	县卫生局配套	单 位 配 套	其他
3.0	0.0	0.0	0.0	3.0	0.0
专项项目经费开支预算（万元）			项目配套经费开支预算（万元）		
设备费		0.0	设备费		0.0
材料费		0.0	材料费		2.0

试验化验加工费	0.0	试验化验加工费	1.0
燃料动力费	0.0	燃料动力费	0.0
差旅费	0.0	差旅费	0.0
人员劳务费	0.0	人员劳务费	0.0
外拨费用	0.0	外拨费用	0.0
合作、协作研究与交流费	0.0	合作、协作研究与交流费	0.0
出版/文献/信息传播知识产权事务费	0.0	出版/文献/信息传播知识产权事务费	0.0
会议费	0.0	会议费	0.0
管理费	0.0	管理费	0.0
专家咨询费	0.0	专家咨询费	0.0
其他开支	0.0	其他开支	0.0
合计	0.0	合计	3.0

预计成果			
定量指标			
论文数	其中SCI数	其中发明专利	著作数
1	1	0	0
新产品	技术标准	培养硕士数	培养博士数
0	0	0	0
定性指标			
预期目标1	在细胞水平阐明miR-146b-5p调控MALAT1在PTC中的作用，阐明两者在PTC侵袭转移中的作用关系。		
预期目标2	全面揭示miR-146b-5p与MALAT1在PTC侵袭和转移中的可能分子机制，为miR-146b-5p的临床应用和PTC的临床治疗研究提供新思路和新靶点。		
预期目标3	探讨miR-146b-5p与MALAT1在人类PTC中的表达，初步揭示两者与PTC侵袭转移的关系。		
预期目标4			
预期目标5			

二、承担单位

第一申请单位				
单位名称	杭州市第一人民医院			
通讯地址	杭州市浣纱路261号	邮编	310006	
联系电话	057156007405	联系人	陈文通	
合作单位				
序号	单位名称	联系人	联系电话	职责
1				
2				
3				
4				
5				

三、项目组成员

负责人					
姓名		彭友		身份证号	230121198004012612
出身年月		1980-04-01		手机	13666600944
职务		副主任医师		专业	普通外科学
学历		硕士		学位	硕士
工作单位		杭州市第一人民医院			
其他成员					
序号	姓名	出生年月	职称	工作单位	项目分工
1	彭友	1980-04-01	副主任医师	杭州市第一人民医院	全面负责课题设计及实施，数据整理与分析。
2	姚红丽	1982-01-22	主治医师	杭州市第一人民医院	免疫印迹法检测蛋白表达
3	方翔	1981-01-20	主管技师	杭州市第一人民医院	RT-PCR 检测与流式细胞分析
4	张卧	1981-06-13	主治医师	杭州市第一人民医院	质粒构建与细胞转染
5	潘钢	1983-02-13	主治医师	杭州市第一人民医院	细胞培养与细胞侵袭实验
6	罗定存	1965-10-17	主任医师	杭州市第一人民医院	实验顾问及技术指导

7	沈杰	1992-06-18	研究生	杭州市第一人民医院	标本采集与处 理
---	----	------------	-----	-----------	-------------

四、 计划进度

(1) 第一年度：2018年1月—2018年12月

细胞培养及标本采集与保存。荧光定量RT-PCR定量检测miR-146b-5p和MALAT1各细胞株和组织中表达。构建抑制及过表达miR-146b-5p和MALAT1细胞株模型，验证并筛选。

(2) 第二年度：2019年1月—2019年12月

分别用流式细胞仪观察miR-146b-5p和MALAT1对各实验组肿瘤细胞增殖和凋亡的改变。免疫印迹法检测各组处理细胞中下游蛋白表达改变。RNA pulldown实验检测miR-146b-5p和MALAT1相互作用机制。

(3) 第三年度：2020年1月—2020年12月

完成荧光素酶实验验证miR-146b-5p与MALAT1的结合作用。并根据整体实验完成补充实验。进行项目总结，数据汇总分析，分析实验结果。发表论文，完成课题验收工作。

五、 项目基本情况

研究内容:

(1) 通过构建sh-MALAT1的敲低细胞模型, 验证其在PTC中的分子功能; 探究MALAT1对PTC侵袭力的影响作用。

(2) 在PTC细胞株水平通过萤光素酶实验和RNA Pulldown实验, 证实miR-146b-5p调控lncRNA MALAT1的分子作用机制, 证实两者对PTC侵袭转移的作用。

(3) 进一步在临床样本中验证两者的关系, 明确其与临床表型的关联性, 为今后PTC侵袭转移的防治提供实验依据。

研究方法:

(1) 细胞培养: 本研究使用甲状腺乳头状癌细胞株。(2) 病人及标本: 本研究收集了2017年3月--2018年2月期间手术的PTC组织标本、癌旁组织和转移的淋巴结样本。(3) 总RNA提取、逆转录和qPCR: 采用Trizol试剂 (Invitrogen, CA) 法提取组织和细胞的总RNA。将核酸定量和纯度检测合格的标本, 采用Primer-Script[®] 一步法RT-PCR试剂盒 (Takara, 大连, 中国) 将总RNA逆转转录成cDNA。以合成的cDNA作为模板, 采用SYBR[®] Premix Dimmer Eraser kit (TaKaRa, Dalian, China) 试剂盒进行实时定量RT-PCR检测, 反应在ABI7500系统 (Applied Biosystems, CA) 仪上完成。(4) 质粒构建: MALAT1表达质粒或其miRNA-146-5p种子区的结合位点突变质粒, 均采用人基因组DNA为模板通过PCR法进行扩增克隆获得。克隆使用引物序列具体见附件。(5) 细胞转染: MALAT1 siRNA和阴性对照siRNA均购自Qiagen公司 (Hilden, Germany)。Hsa-miRNA-146b-5p mimic/阴性对照 (negative control mimic) 和 hsa miRNA-146b-5p inhibitor/ 阴性对照 (negative control mimic) 均购置于吉玛公司 (Genechem)。(6) 荧光素酶实验: MALAT1启动子, 启动子/萤光素酶报告空白质粒采用脂质体介导共转染到培养的HEK-293T细胞系 (本实验室保存) 细胞。每个样本均共转染Renilla荧光素酶的pRL-TK质粒来监测转染效率 (Promega, Madison, WI, USA)。最后海肾萤光素酶活性进行归一化处理, 计算相对萤光素酶活性并进行统计分析。(7) Northern blot分析 (8) RNA pulldown实验: 为确定MALAT1是否与RNA诱导的沉默复合物 (RISC) 有关, 我们使用进行RNA pulldown实验进行验证。(9) Western blot分析。(10) 细胞侵袭实验与流式细胞分析: (11) 所有统计均采用SPSS19.0 (SPSS, Chicago, USA) 进行分析。

创新点:

本研究在前期研究及追踪科学进展的基础上,采用分子生物学和细胞生物学技术相结合,通过构建sh-MALAT1敲低细胞模型、萤光素酶实验和RNA Pulldown实验,首次探讨miR-146b-5p对lncRNA MALAT1表达的影响,以及其对PTC侵袭转移的作用,拓展了PTC侵袭性的分子机制研究,为今后PTC侵袭转移的防治提供实验依据。

六、 前期工作说明

【前期基础详见可行性报告】

1、本项目申请人长期从事甲状腺癌的临床与基础研究，主要研究高侵袭性PTC发生的分子机制，围绕非编码RNA与PTC侵袭转移相关性研究，寻找具有重要意义的非编码RNA，以转录调控机制为研究方向。近3年通过对miRNAs的研究，积累了大量的实验数据资料，进行了PTC相关的非编码RNA的筛查，发现了其与PTC侵袭转移相关的miRNAs，研究结果表明 miR-146b-5p 与 PTC 侵袭性呈正相关（见表1-2，图1）。其研究成果已发表在《Molecules》（影响因子2.861）、《中华内分泌外科杂志》、《中华普通外科杂志》等杂志上。

2、并已对miR-146b-5p靶基因的预测与生物信息学分析

（1）利用在线靶基因预测软件对与miR-146b-5p相关的lncRNA进行预测，结果显示预测靶基因有6个（已完成，见附图2）。对所得靶基因集分别进行分析以及初步的基因功能分析以了解其生物学功能，选择可能与PTC侵袭性相关的靶基因作为研究重点。通过筛选，我们选择lncRNA MALAT1作为靶基因进行研究。

（2）应用miR-146b-5p瞬时转染人PTC细胞株，同时设立对照组，采用RT-PCR技术和western blot等实验技术，分析转染后靶基因表达水平，进一步筛选和验证miR-146b-5p的靶基因。初步探索miR-146b-5p通过调控lncRNA MALAT1表达，进而参与PTC侵袭的作用机制，拓展了PTC侵袭性的分子机制研究。

（3）我们先期利用RT-PCR技术检测MALAT1在PTC和良性甲状腺组织中的不同表达情况（见下图）。

（4）我们利用原位杂交实验（ISH）检测miR-146b-5p和MALAT-1在正常甲状腺组织和PTC中的表达情况。我们发现miR-146b-5p在正常的甲状腺组织中呈现阴性（图A），而在PTC的组织细胞质中呈现阳性染色（紫色，图B）。同时发现MALAT-1在正常的甲状腺组织细胞核中呈现弱阳性表达（图C），而相比在PTC的组织细胞核中呈现强阳性表达染色（棕色，图D）。

3、同时，本项目申请人参与多项非编码RNA的相关性研究，主要参与1项省自然科学基金项目“自噬相关的长链非编码RNA在胶质瘤中的表达筛选及其作用机制研究（LY16H160044）”与省卫生科技计划项目1项“miR-183和miR-203通过调控Bmi-1在高侵袭性甲状腺乳头状癌中的作用及机制研究（2016KYA155）”。总之，寻找与发现新的与PTC侵袭转移相关的非编码RNA及其分子机制是我们研究的重要课题，一直是我们研究工作的长期目标。

七、 本课题相关内容的已有研究成果情况

一、论文发表情况

1. You Peng, Chen Li, Ding-Cun Luo, et al.Expression Profile and Clinical Significance of MicroRNAs in Papillary Thyroid Carcinoma[J]. Molecules, 2014, 19(8): 11586-11599. 【IF: 2.861】.
2. 彭友, 李琛, 罗定存, 等.微小RNA-199b-5p在甲状腺乳头状癌中的表达及意义 [J].中华内分泌外科杂志, 2014, 8(4): 268-281.
3. 李琛, 彭友, 罗定存, 等.甲状腺乳头状癌 microRNAs表达谱与临床相关性研究 [J].中华普通外科杂志, 2013, 28(9): 696-700.

二、参与的主要科研项目:

1. 自噬相关的长链非编码RNA在胶质瘤中的表达筛选及其作用机制研究。排名3; 2016浙江省自然科学基金项目 (LY16H160044) ;项目进行中。
2. miR-183和miR-203通过调控Bmi-1在高侵袭性甲状腺乳头状癌中的作用。排名2; 2016浙江省医药卫生科技计划项目 (2016KYA155) ;项目进行中。
3. LncRNA在桥本氏病合并甲状腺乳头状癌中的表达研究。排名2; 2013年杭州市卫生科技计划 (重点) 项目 (2013Z04) ;已结题。

八、 附件信息

是否有查新检索报告：	<input type="checkbox"/> 是 <input checked="" type="checkbox"/> 否
是否使用实验动物：	<input type="checkbox"/> 是 <input checked="" type="checkbox"/> 否
是否涉及伦理问题：	<input checked="" type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否
是否涉及实验室生物安全：	<input type="checkbox"/> 是 <input checked="" type="checkbox"/> 否
是否涉及干细胞：	<input type="checkbox"/> 是 <input checked="" type="checkbox"/> 否
是否是临床前新技术研究：	<input type="checkbox"/> 是 <input checked="" type="checkbox"/> 否
是否涉及病毒研究	<input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否

九、 承诺书

本单位（或个人）承诺：

本申请书中所填写的内容和资料真实、有效，如存在弄虚作假和与事实相违背的内容，由本单位（个人）承担全部责任。

申报单位（盖章）：

项目负责人签字：

2017年11月6日

十、 单位审核意见

申报单位意见：

单位（盖章）：

负责人签字：

年 月 日

上级主管部门意见：

同意

单位（盖章）：

负责人签字：

年 月 日

十一、 省卫计委终审意见

省卫计委审核意见：

同意列入省医药卫生科研面上项目，
请单位予以经费配套。

省卫计委（盖章）：

2017年11月20日