

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：

黑色素瘤的优先表达抗原和肝细胞肝癌的相关性及其
机制研究

申 请 者：

朱含章

申请单位：

杭州市第一人民医院

联系手机：

15824429298

申请日期：

2017-08-01

浙江省卫计委

二〇一二年制

一、项目情况

项目名称		黑色素瘤的优先表达抗原和肝细胞肝癌的相关性及其机制研究			
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----普通外科学			
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		0.85

试验化验加工费	0.0	试验化验加工费	1.35
燃料动力费	0.0	燃料动力费	0.2
差旅费	0.0	差旅费	0.0
人员劳务费	0.0	人员劳务费	0.3
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	0.3
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	0	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	建立稳定的PRAME过表达和敲低的肝癌细胞株，进行细胞实验明确PRAME和肝癌的增殖及凋亡的关系		
预期目标2	确定PRAME的干扰和过表达在动物模型中对肝癌发生发展的影响		
预期目标3	明确PRAME表达及其与HCC患者临床病理特征及预后的关系		
预期目标4	根据芯片结果分析PRAME下游的增殖凋亡及转移侵袭相关信号通路并行WB验证，找到和PRAME可能结合的蛋白，CoIP验证并行该蛋白的过表达或者干扰检验PRAME下游信号通路变化及肝癌增殖凋亡的变化		
预期目标5	完成相应的课题内容，严格按执行期限结题，发表一篇以上且唯一标注“浙江省省医药卫生科技计划资助”的主持人署名第一作者学术论文，期刊源包括我省本科高校学报、国家中文核心期刊（以北京大学图书馆目录为准）、中		

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	浙江省杭州市上城区浣纱路261号	邮编	310006	
联系电话	56007405	联系人	廖娟	
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		朱含章		身份证号	321181198101180414
出身年月		1981-01-18		手机	15824429298
职务		主治医师		专业	普通外科学
学历		博士		学位	博士
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	朱含章	1981-01-18	主治医师	杭州市第一人民医院	课题整体设计，完成及质控
2	贾长库	1969-05-20	主任医师	杭州市第一人民医院	技术指导及质控
3	周卫江	1975-11-06	副主任医师	杭州市第一人民医院	技术难点重点指导及参与具体解决
4	沈伟敏	1951-11-06	主任医师	杭州市第一人民医院	技术难点重点指导及参与具体解决
5	刘凌	1985-05-15	主治医师	杭州市第一人民医院	实验具体实施

四、 计划进度

进度安排

2018. 1. 1-2018. 06. 30 建立裸鼠肝癌皮下移植瘤模型, 绘制裸鼠皮下瘤生长曲线, 测量瘤体体积并称瘤重, 分析PRAME的干扰和过表达对裸鼠肝癌皮下瘤生长速度及体积的影响。

2018. 6. 30-2018. 12. 31 行PRAME干扰组及其对照组肝癌细胞系的RNA芯片及蛋白芯片分析, 根据芯片结果分析PRAME下游的增殖凋亡及转移侵袭相关信号通路。

2019. 1. 1-2019. 6. 30 行Western-blot蛋白分析实验验证芯片分析所得的PRAME下游的增殖凋亡及转移侵袭相关信号通路

2019. 6. 30-2019. 12. 31 行蛋白免疫共沉淀的方法加以验证, 通过生物信息学的方法预测和PRAME可能结合的蛋白, 行该蛋白的过表达或者干扰, 检验PRAME下游信号通路变化及肝癌增殖凋亡的变化。

2020. 1. 1-2020. 12. 31 整理实验数据, 撰写文章并发表, 作出结题报告。

五、项目基本情况

研究内容:

研究内容

1. 组织中PRAME表达及其与HCC患者临床病理特征及预后的关系

1.1 96对肝癌及癌旁组织总RNA提取, 逆转录, 设计PRAME的引物, 行荧光定量PCR, 比较肝癌及癌旁组织PRAME在RNA水平表达的差异。

1.2 肝癌及癌旁组织总蛋白的提取及Western-blot蛋白分析肝癌及癌旁组织PRAME的蛋白表达水平差异。

1.3 行肝癌及癌旁组织行PRAME免疫组化, 分析PRAME的蛋白表达水平差异。

1.4 分析PRAME表达与肝癌患者临床病理特征之间的关系。

1.5 PRAME和Ki-67表达水平之间Spearman相关系数分析

1.5 Kaplan-Meier分析PRAME与肝癌病人增殖指标Ki67的关系。

1.6 单变量分析评估患者的PRAME与生存期之间的关联。

1.7 多变量COX分析HCC患者的PRAME表达水平是否可独立评价HCC的预后。

2. 建立稳定的PRAME过表达和敲低的肝癌细胞株, 进行细胞及动物实验确定PRAME和肝癌的相关性。

2.1 采用五个肝细胞癌细胞系 (Hep3B, HepG2, MHCC-97H, SMMC-7721 和 Huh7) 和 293T 细胞及肝细胞L02 行细胞实验。

2.2 采用荧光定量PCR和Western-blot蛋白分析筛选出PRAME表达最高的肝癌细胞系和PRAME表达最低的肝癌细胞系, 分别行PRAME干扰和过表达。

2.3 合成PRAME的干扰质粒G248-sh1-PRAME-GFP, G248-sh2- PRAME-GFP和PRAME的过表达质粒pLV- PRAME - GFP。

2.4 PRAME的干扰质粒和过表达质粒和用于包装慢病毒的8.91、VSVG质粒一起在293T细胞中包装成慢病毒并分别转染PRAME表达最高的肝癌细胞系和PRAME表达最低的肝癌细胞系。

2.5 采用Western-blot蛋白分析慢病毒转染后PRAME干扰和过表达的效果。

2.6 建立稳定转染的PRAME的干扰质粒和过表达的肝癌细胞系。

3. 确定PRAME的干扰和过表达在体外对肝癌细胞系增殖、凋亡、细胞周期的影响

3.1 对稳定转染的PRAME的干扰质粒和过表达的肝癌细胞系行CCK-8实验、EDU实验和平板克隆实验, 评估PRAME对肝癌细胞的增殖活力的影响

3.2 对稳定转染的PRAME的干扰质粒和过表达的肝癌细胞系行流式细胞仪检测分析对肝癌细胞的凋亡的影响

3.3 对稳定转染的PRAME的干扰质粒和过表达的肝癌细胞系行流式细胞仪检测分析对肝癌细胞的生长周期的影响

4. 确定PRAME的干扰和过表达在动物模型中对肝癌发生发展的影响

4.1 建立裸鼠肝癌皮下移植瘤模型: 向雄性BALB /c裸鼠 (6周龄) 右侧腋下皮下接种G248-sh1-PRAME-GFP和用于对照的G248-GFP慢病毒稳定转染的对数期生长的肝癌细胞, 向雄性BALB /c裸鼠 (6周龄) 右侧腋下皮下接种pLV-PRAME-GFP和用于对照的pLV-GFP慢病毒稳定转染的对数期生长的肝癌细胞, 建立裸鼠肝癌皮下移植瘤模型。

4.2 绘制裸鼠皮下瘤生长曲线, 分析PRAME的干扰和过表达对裸鼠肝癌皮下瘤生长速度的影响。

4.3 40天后, 以颈椎脱臼法处死裸鼠, 完整剥离瘤体并拍照, 然后测量瘤体体积并称瘤重。分析PRAME的干扰和过表达对裸鼠肝癌皮下瘤体积的影响。

5. 体外实验阐明PRAME下游的增殖凋亡及转移侵袭相关信号通路机制。

5.1 行PRAME干扰组及其对照组肝癌细胞系的RNA芯片及蛋白芯片分析, 根据芯片结果分析PRAME下游的增殖凋亡及转移侵袭相关信号通路。

5.2行Western-blot蛋白分析实验验证芯片分析所得的PRAME下游的增殖凋亡及转移侵袭相关信号通路。

6. 体外实验阐明PRAME上游的调控机制

6.1 通过生物信息学的方法预测和PRAME可能结合的蛋白

6.2 行蛋白免疫共沉淀的方法加以验证。

6.3 行该蛋白的过表达或者干扰，检验PRAME下游信号通路变化及肝癌增殖凋亡的变化。

研究方法:

1 组织总RNA提取, 逆转录及荧光定量PCR

1.1 组织总RNA提取:

1.2 逆转录

1.3 实时定量多聚酶链反应 (qRT-PCR)

2 蛋白免疫印迹 (Western blotting)

2.1 蛋白样品制备

2.2 采用BCA蛋白定量试剂盒对提取的蛋白样品的浓度进行定量检测。

2.3 蛋白变性

2.4 SDS-PAGE 电泳

2.5 转膜 (湿转)

2.6 免疫反应

2.7 ECL化学发光显影

3 免疫组织化学染色和结果判定方法

对肝癌患者的肝癌标本和癌旁组织标本行免疫组化染色, 切片均取已用甲醛固定的石蜡包埋切片。

3.1 染色标记:

3.2 免疫组织化学染色结果的结果判定

使用 Image-Pro Plus v. 5.0 软件分析图片, 并求得其平均IOD值。

4. PRAME与肝癌相关性及其与肝癌临床病理特征关系的统计学分析

所有数据由SPSS19.0软件进行分析, 结果显示为平均值 \pm SD。使用Student-t检验分析HCC癌组织与相应癌旁组织表达差异性。使用版本为5.0的GraphPad Prism软件评估所有直方图。P < 0.05表示差异有统计学意义。

Spearman等级相关分析用于分析HCC患者组织中PRAME的表达与Ki-67表达的相关性。 χ^2 检验用于分析PRAME及Ki-67表达水平和临床病理变量之间关联。Kaplan - Meier生存曲线分析PRAME及Ki-67的表达与HCC患者预后之间的关系。Cox比例风险回归多因素生存分析用于分析 PRAME是否为HCC总生存的独立预后因素。P<0.05 被认为有显著性差异。记录每个变量的风险比和其95%置信度。P<0.05被认为具有统计学意义。

5 质粒抽提

6 细胞复苏及培养

7 慢病毒包装及感染

7.1 慢病毒包装

7.2 慢病毒转染

8. 细胞增殖分析

8.1 CCK-8检测

8.2 平板克隆实验

8.3 EDU实验

使用Cell-Light TM EdU DNA细胞增殖试剂盒

9 细胞凋亡检测

使用Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒处理各组细胞后进行流式细胞术分析。10. 细胞生长周期检测

使用联科生物公司的细胞周期染色试剂盒。

11. 裸鼠移植瘤模型建立

向雄性BALB /c裸鼠 (6周龄) 右侧腋下皮下接种, 每种细胞注射6只裸鼠, 测定瘤

创新点:

1. 本项目旨在明确PRAME是肝癌治疗的新靶点阐明PRAME后下游的信号通路机制并进行动物实验评价PRAME在动物水平对肝癌发生发展的影响，为肝癌的治疗提供新的靶点及思路，对于提高肝癌患者的生存率和生活质量有非常重要的意义，通过文献检索，我们没有发现任何相关报道，课题立意本身具有很好的创新性。
2. 行PRAME干扰组及其对照组肝癌细胞系的RNA芯片及蛋白芯片分析，根据芯片结果分析PRAME下游的增殖凋亡及转移侵袭相关信号通路，可能不同于目前发现的任何信号通路而“独辟蹊径”，从而避免了针对常规信号通路靶向治疗肝癌的耐药性，负面副作用和脱靶效应，因此，基于PRAME下游信号通路转导机制的阐明更有利于说明PRAME靶向治疗的优势。
3. 通过生物信息学的方法预测和PRAME可能结合的蛋白并行蛋白免疫共沉淀的方法加以验证，明确了PRAME的上游和下游作用机制，从而使针对PRAME而对肝癌的发生发展进行的干预更加有效和彻底。

六、 前期工作说明

1 已明确肝癌组织中PRAME表达及其与HCC患者临床病理特征及预后的关系

1.1 明确96对肝癌及癌旁组织中肝癌组织PRAME在RNA水平表达的高表达。

1.2 肝癌及癌旁组织总蛋白的提取及Western-blot蛋白分析肝癌及癌旁组织PRAME的蛋白表达水平差异。

1.3 行肝癌及癌旁组织行PRAME免疫组化，结果可见PRAME在肝癌组织中蛋白高表达

1.4 分析PRAME表达与肝癌患者临床病理特征之间的关系。

通过卡方检验来统计， * $P < 0.05$ 认为有显著的统计学差异，** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

结果证实PRAME表达与肝癌患者的AFP, 肿瘤的大小, AJCC临床分期, 肿瘤的转移侵袭以及和肿瘤的增殖指标Ki67均明显正相关。(如下页临床表格所示)

1.5 PRAME和Ki-67表达水平之间Spearman相关系数分析, PRAME和肿瘤的增殖指标Ki67呈明显正相关

1.6 Kaplan-Meier分析结果显示患者的PRAME与生存期之间呈负关联, PRAME高表达的肝癌患者者生存期短。

1.7 单变量分析评估患者的PRAME与肝癌患者生存期之间的关联, 显示PRAME与肝癌患者生存期呈负相关, PRAME高表达的肝癌患者者生存期短。(如可行性报告中临床表格所示)

通过卡方检验来统计, * $P < 0.05$ 认为有显著的统计学差异, ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

1.8 多变量COX分析HCC患者的PRAME表达水平是否可独立评价HCC的预后。

采用log-rank 检验行统计学分析* $P < 0.05$ 认为有显著的统计学差异, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

2. 建立稳定的PRAME过表达和敲低的肝癌细胞株, 进行细胞及动物实验确定PRAME和肝癌的相关性。

2.1 采用五个肝细胞癌细胞系 (Hep3B, HepG2, MHCC-97H, SMMC-7721 和 Huh7) 和 293T 细胞及肝细胞LO2 行细胞实验。

2.2 采用荧光定量PCR和Western-blot蛋白分析筛选出PRAME表达最高的肝癌细胞系和PRAME表达最低的肝癌细胞系, 分别行PRAME干扰和过表达。如下图所示, PRAME在7721中表达最高, HepG2中表达最低。

2.3 合成PRAME的干扰质粒G248-sh1-PRAME-GFP, G248-sh2- PRAME-GFP和PRAME的过表达质粒pLV- PRAME - GFP。

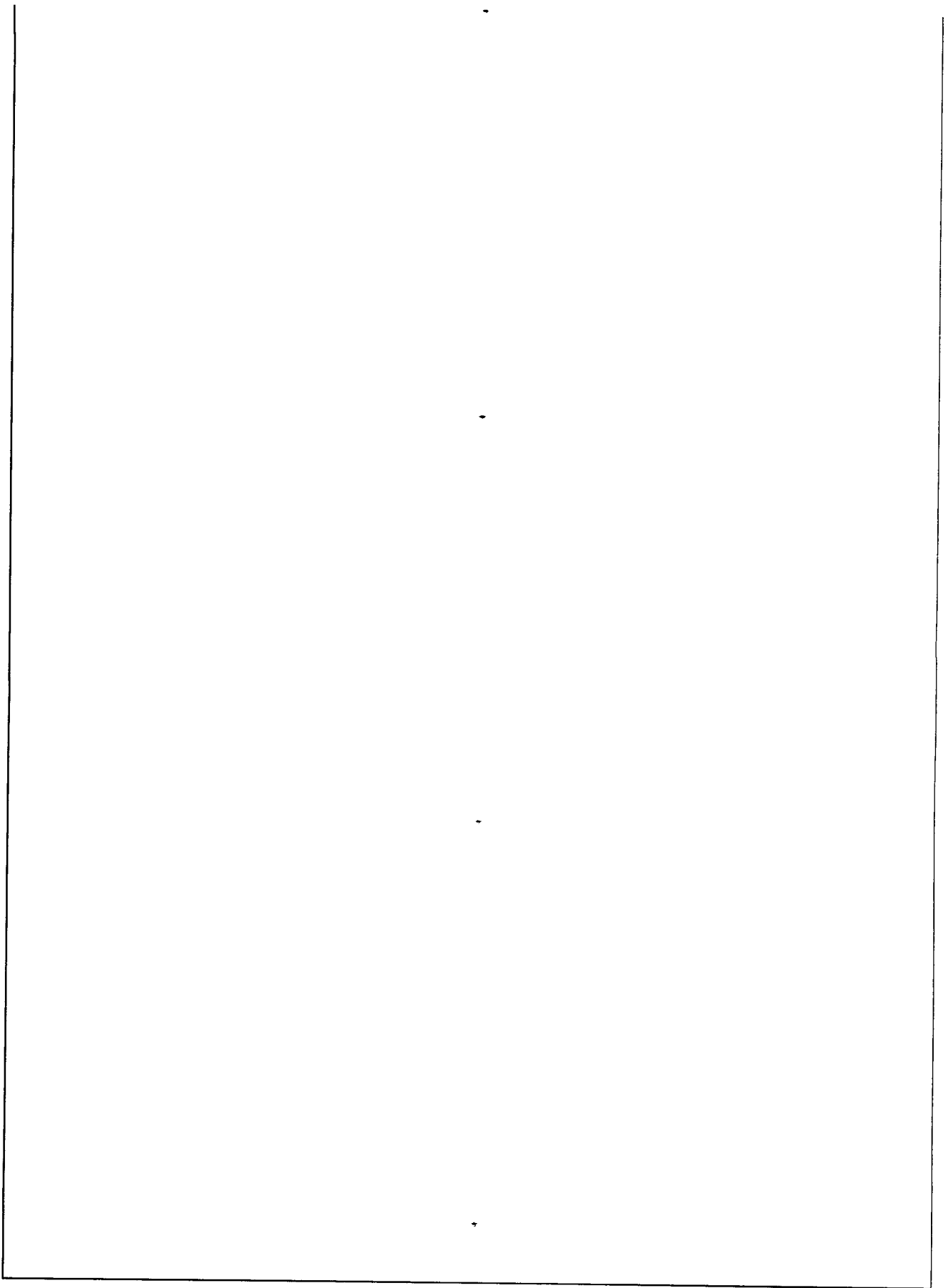
2.4 PRAME的干扰质粒和过表达质粒和用于包装慢病毒的8.91、VSVG质粒一起在293T细胞中包装成慢病毒并分别转染PRAME表达最高的肝癌细胞系和PRAME表达最低的肝癌细胞系。采用Western-blot蛋白分析慢病毒转染后PRAME干扰和过表达的效果。建立稳定转染的PRAME的干扰质粒和过表达的肝癌细胞系。

3. PRAME的干扰和过表达在体外对肝癌细胞系增殖、凋亡、细胞周期的影响

3.1 对稳定转染的PRAME的干扰质粒和过表达的肝癌细胞系行CCK-8实验、EDU实验和平板克隆实验, 评估PRAME对肝癌细胞的增殖活力的影响, 结果均证实PRAME过表达可促进肝癌细胞增殖, 而PRAME干扰则抑制肝癌细胞增殖。

3.2 对稳定转染的PRAME的干扰质粒和过表达的肝癌细胞系行流式细胞仪检测分析对肝癌细胞的凋亡的影响, 结果证实PRAME干扰可促进肝癌细胞凋亡, 而PRAME过表达则抑制肝癌细胞凋亡

3.3 对稳定转染的PRAME的干扰质粒和过表达的肝癌细胞系行流式细胞仪检测分析对肝癌细胞的生长周期的影响, 结果证实PRAME干扰可促进肝癌细胞细胞停滞在G1期, 而PRAME过表达则使G1期肝癌细胞减少。



七、 本课题相关内容的已有研究成果情况

无

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 checked="" type="checkbox"/> 是 <input 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 checked="" type="checkbox"/> 是 <input 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：

年 月 日



朱金章

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



林马印胜

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）：

