



台州市中心医院（台州学院附属医院）
院级课题

申 请 书

课 题 名 称 lncRNA Neat1 介导光动力
疗法抑制肝癌进展的机制研究

申 请 者 王昆鹏

申 请 项 目 院级一般课题（B1）

申 请 科 室 肝胆胰脾血管外科

申 请 日 期 2019 年 11 月 15 日

联 系 方 式 15957686276

台州市中心医院（台州学院附属医院）

2019 年制

一、简表

研究项目	名称	lncRNA Neat1 介导光动力疗法抑制肝癌进展的机制研究									
	类别	A、国自然培育项目（A1 面上/A2 青年） B、院级一般课题（B1 临床医技类/B2 教学科研类/B3 管理类） C、护理专项课题							类别	B1	
	申请金额	1 万元		起止年月：2020 年 月至 2022 年 月				自筹资金	9 万元		
申请者	姓名	王昆鹏		性别	男		出生年月		1993 年 7 月		
	专业技术职务			医师			学历		硕士研究生		
项目组成单元	总人数	高级	中级	初级	辅助人员		博士后	博士生	硕士生	参加单位	
	5	1	1	3	0		0	0	4	1	
	主要成员（不含申请者）	姓名	性别	出生年月	专业技术职务	工作单位		参加年月数	项目中的分工		
		莫经刚	男	196308	主任医师	台州市中心医院		4	项目指导		
		江浩	男	198309	主治医师	台州市中心医院		6	协调安排		
		冯一浮	男	199005	医师	台州市中心医院		8	统计分析		
		王松	男	198908	医师	台州市中心医院		8	细胞实验		
		陈昕怡	女	199605	护士	台州市中心医院		8	数据收集		

二、立项依据

（包括国内外研究现状分析、当前需要解决的主要问题等）

肝癌是消化系统常见的恶性肿瘤，发病率居全球恶性肿瘤前 5 位[1]。2019 年我国最新发布的流行病学数据显示，肝癌是我国第 4 位常见的恶性肿瘤，在肿瘤致死病因中已由第 3 位上升至第 2 位[2]。以手术切除、肝移植、局部消融治疗、介入治疗、放射治疗、化学治疗、靶向治疗、免疫治疗等为主的综合治疗取得了一定的效果[3]。但肝癌起病隐匿，大多数患者被确诊时已进展至肿瘤晚期，无法获得根治性治疗[4]，且由于肝癌发病机制不明，部分患者即便可行根治性治疗，也存在一定的复发转移可能[5]，而进展期肝癌的放化疗抵抗也在很大程度上降低了肝癌的生存率[6]。因此寻找治疗肝癌的新技术，探索肝癌的发病机制，具有重要意义。

光动力疗法 (photodynamic therapy, PDT) 是通过生成活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 发挥治疗作用的新手段，自 1997 年被美国 FDA 列入肿瘤治疗的五大类基本方法之一以来，已被多种肿瘤的 NCCN 指南收录（皮肤癌、食道癌、肺癌、膀胱癌、卵巢癌、胆管癌、头颈部癌等）[7]，广泛应用于临床治疗[8]。PDT 包含三个要素：光敏剂 (Photosensitizer, PS)、光和氧。它的基本原理如图 1 所示[4]，PS 注射入体内，分布后被肿瘤组织特异性摄取浓聚，用特定波长的激光照射，激发组织内生成 ROS，产生细胞毒性作用，进而导致细胞受损乃至死亡，达到治疗肿瘤的目的。申请人也采用光动力疗法在结直肠癌体内外实验中取得良好的效果[9-11]。

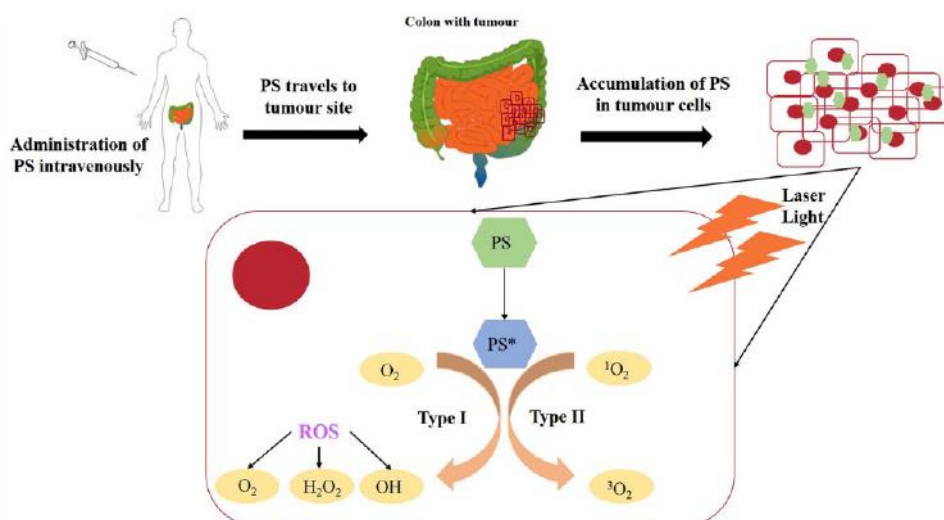


图 1 光动力治疗 (Photodynamic therapy, PDT) 的基本原理图 (参考相关文献)

新进报道发现 PDT 有望成为治疗肝癌的新手段[12-14]，但具体机制不清，可能与 PDT 生成的 ROS 通过诱导肿瘤细胞凋亡、自噬、坏死直接杀伤肿瘤细胞[15]，阻断肿瘤细胞氧供间接封闭肿瘤血管[16]，调控并激活肿瘤免疫有关[17]。PDT 与传统的肿瘤治疗手段相比，可利用光源的指向性，选择性地杀伤肿瘤组织，避免正常组织损伤；由于光敏剂的低毒副作用，它可以进行反复给药治疗，克服了化疗导致的全身不良反应、放疗引起的正常组织损伤等的缺陷。2013 年[12]上海交通大学普外科团队在肝癌小鼠模型中发现 PDT 具有极高的肿瘤组织富集性和良好的安全性；2017 年 Li 等[18]证实 PDT 可通过调控肿瘤微环境有效抑制肝癌进展，2018 年 Abo-Zeid[19]团队发现 PDT 可通过破坏肿瘤细胞 DNA 复制抑制肝癌细胞增殖。本团队前期也证实光敏剂 5-氨基酮戊酸 (5-Aminolevulinic acid, 5-ALA) 介导光动力治疗有效抑制肝癌细胞的增殖 (见基础条件 1, 图 4)

我们也尝试从新的角度来阐述 PDT 抑制肝癌细胞增殖的可能调控机制，以期为肝癌的研究提供新的思路。新进研究发现，长链非编码 RNA (Long non-coding RNA, lncRNA) [20]和微小 RNA (MicroRNA, miRNA) [21]在肝癌发生发展中发挥关键的调控作用，

已逐渐成为该领域研究的热点之一[22]。如 lncRNA HAND2-AS1 等与肝癌的转移高度相关[20]；与肝癌增殖、浸润进展高度相关的 lncRNA，如 lncRNA-H19、lncRNA-HOTAIR 等也不断被发现[23]；miRNA-122、miRNA-129-2 等与肝癌病理生理、诊断和治疗高度相关的 miRNA 也逐步得到证实[24]。

我们将 5-ALA 介导 PDT 治疗前后的肝癌细胞进行高通量测序，发现大量非编码 RNA 表达水平显著变化。通过对高通量筛查结果分析，我们挑选差异表达 TOP 分子（包括 lncRNA Neat1、miRNA 218-5p 等）作为重点研究对象。经 qPCR 验证，光动力治疗后 lncRNA Neat1 表达显著下调[21]，（基础条件 1，图 5、6）且 ROS 的产量与 lncRNA Neat1 的下调水平之间存在平行关系（基础条件 1，图 7A）。因此 lncRNA Neat1 可能在光动力治疗肝癌中发挥重要作用。

Neat1（nuclear paraspeckle assembly transcript 1，核富集转录体 1）是新近确证的 lncRNA，也是细胞核旁斑（哺乳动物细胞核中的 RNA-蛋白质复合物，发挥基因表达调控作用[25]）的重要组成部分之一，有 Neat1-1（3.7 kb）和 Neat1-2（23 kb）两个亚单位。关于 Neat1 的作用机制主要可分为两大类：（1）lncRNA Neat1 作为细胞核旁斑的重要组成部分，与旁斑的功能、数量、完整性相关联[25]，其与旁斑蛋白形成转运复合物，通过稳定核内 mRNA 调控基因表达[26]。（2）lncRNA Neat1 可在胞质内作为内源性 RNA 竞争性抑制结合 miRNA 从而影响 mRNA 的表达（即 ceRNA 机制）[27]。因此，Neat1 在许多疾病的发生发展中可通过上述两种机制发挥调控作用[28, 29]。已有研究证实 Neat1 高表达可诱导肝癌细胞中的 HIF-2 α 激活来促进肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭能力[30]，此外，NEAT1-2-SFPQ 轴参与肝癌细胞对顺铂的耐药机制[31]。我们对肝癌患者肝脏组织中的 lncRNA Neat1 的表达情况进行了 qPCR 验证，也发现患者 lncRNA Neat1 的表达上调（见基础条件 1. 图 7B），而进一步 Fish 证实 lncRNA Neat1 在细胞核和细胞质中都有表达（见基础条件 1. 图 7C），故 lncRNA Neat1 可能同时通过上述两种机制在肝癌的进展中发挥调控作用，但具体生物学效应机制仍然不清楚，有待进一步阐明。

（1）我们首先开展生物信息学研究，通过 starbase 软件预测发现 lncRNA Neat1 在细胞核内可能与旁斑蛋白 HNRNPA2（Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2，核内不均一核糖核蛋白 A2）直接结合（见基础条件 1，图 8）。进一步文献调研证实 lncRNA Neat1 是通过直接结合 U2AF65 进而调控旁斑蛋白 HNRNPA2 的表达[36]。而旁斑蛋白 HNRNPA2 与 HNRNPA1 之间存在密切联系[25]，且 HNRNPA1 可抑制靶基因 SMAD2 基因的表达，与肝脏疾病的发生发展密切相关[32]。预实验证实 PDT 后旁斑蛋白 HNRNPA2 表达上调、HNRNPA1 表达下调，AMAD2 表达上调（见基础条件 1，图 9）。因此，调控旁斑蛋白 HNRNPA2 抑制肝癌增殖可能是 lncRNA Neat1 发挥生物学效应的调控机制之一。

（2）HNRNPA1 在功能上作为 RNA 剪接因子动态地穿梭于细胞核和细胞质之间[33]，参与各种 RNA 的核内外转运过程，从而调控基因表达[25]，在肿瘤进展中发挥重要的调控作用[34]。前期研究证实，光动力治疗后 lncRNA Neat1 和 HNRNPA1 表达水平均下调，且 HNRNPA1 转运 lncRNA Neat1 出核减少，这导致 Neat1 在细胞质内的原有生物学效应减弱。生信分析预测 lncRNA Neat1 在细胞质内可能与下游 miRNA-218-5p 结合，双荧光素酶报告实验证实了这一预测（见基础条件 1，图 10A、B）。进一步，我们通过 qPCR 和 Western blot 分析证实了 miRNA-218-5p 下游靶标蛋白 AKT3 表达下调（见基础条件 1，图 10C、D），PI3K/AKT 信号通路被抑制，进而抑制肝癌细胞增殖。因此，lncRNA Neat1 下调，miRNA-218-5p 上调导致 PI3K-AKT 通路被抑制可能是 lncRNA Neat1 生物学效应的调控机制之二。

因此，基于前期研究，我们提出了本课题的中心假说（见图 2）：5-ALA 介导的光动力疗法在细胞核通过下调 lncRNA Neat1，调控 U2AF65，从而上调 HNRNPA2、下调 HNRNPA1，直接促进抑癌基因 SMAD2 的表达；另一方面，由于 lncRNA Neat1 表达水平下调，且核内 RNA 剪接因子 HNRNPA1 下调，导致转运出核的 lncRNA Neat1 减少，从而在胞质内上调 miRNA-218-5p，下调 AKT3，抑制 PI3K-AKT 信号传导通路的激活，

进而抑制肝癌细胞的增殖和转移，发挥治疗作用。

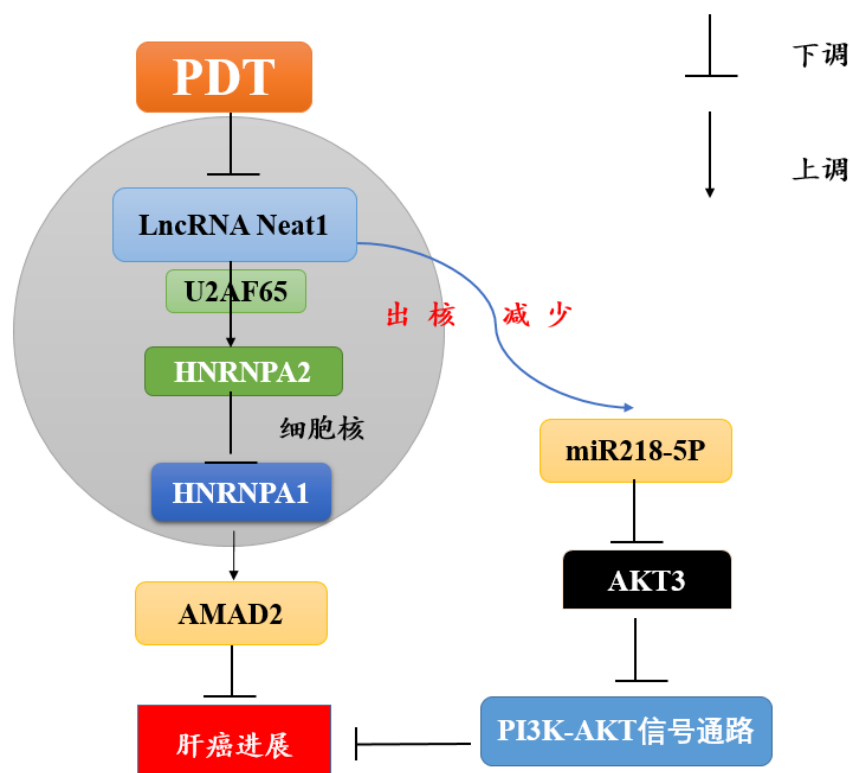


图2 中心假说图

我们拟在肝癌细胞水平、基因敲除小鼠模型水平进一步验证光动力疗法的有效性，探索 lncRNA Neat1 介导光动力疗法抑制肝癌进展的具体调控机制，促进其临床转化，为光动力治疗肝癌提供科学依据。

参考文献

- [1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2018[J]. CA Cancer J Clin, 2018,68(1):7-30.
- [2] 郑荣寿, 孙可欣, 张思维, 等. 2015年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2019.
- [3] 原发性肝癌诊疗规范(2017年版)[J]. 中国实用外科杂志, 2017,37(07):705-720.
- [4] Ren H, Camposnanez E, Yaniv Z, et al. Treatment Planning and Image Guidance for Radiofrequency Ablation of Large Tumors[J]. IEEE Journal of Biomedical & Health Informatics, 2014,18(3):920.
- [5] Nio K, Yamashita T, Kaneko S. The evolving concept of liver cancer stem cells[J]. Mol Cancer, 2017,16(1):4.
- [6] Marin J, Herraes E, Lozano E, et al. Models for Understanding Resistance to Chemotherapy in Liver Cancer[J]. Cancers (Basel), 2019,11(11).
- [7] van Straten D, Mashayekhi V, de Bruijn H S, et al. Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions[J]. Cancers (Basel), 2017,9(2).
- [8] 李黎波, 李文敏, 项蕾红, 等. 光动力疗法在中国的应用与临床研究[J]. 中国激光医学杂志, 2012,21(05):278-307.
- [9] 刘志鹏, 熊力, 欧阳国庆, 等. X射线激发Cu-Cy介导的光动力对人结肠癌细胞的杀伤作用研究[J]. 中国普通外科杂志, 2016,25(10):1431-1437.
- [10] Ouyang G, Xiong L, Liu Z, et al. Inhibition of autophagy potentiates the apoptosis-inducing effects of photodynamic therapy on human colon cancer cells[J]. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2017,16(1):1-10.

- 2018,21:396-403.
- [11] Liu Z, Xiong L, Ouyang G, et al. Investigation of Copper Cysteamine Nanoparticles as a New Type of Radiosensitizers for Colorectal Carcinoma Treatment[J]. *Sci Rep*, 2017,7(1):9290.
 - [12] Wang J D, Shen J, Zhou X P, et al. Optimal treatment opportunity for mTHPC-mediated photodynamic therapy of liver cancer[J]. *Lasers Med Sci*, 2013,28(6):1541-1548.
 - [13] Liu Z, Fu X, Huang W, et al. Photodynamic effect and mechanism study of selenium-enriched phycocyanin from *Spirulina platensis* against liver tumours[J]. *J Photochem Photobiol B*, 2018,180:89-97.
 - [14] Patel J, Rizk N, Kahaleh M. Role of photodynamic therapy and intraductal radiofrequency ablation in cholangiocarcinoma[J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2015,29(2):309-318.
 - [15] Chilakamarthi U, Giribabu L. Photodynamic Therapy: Past, Present and Future[J]. *Chem Rec*, 2017,17(8):775-802.
 - [16] Kataoka H, Nishie H, Hayashi N, et al. New photodynamic therapy with next-generation photosensitizers[J]. *Ann Transl Med*, 2017,5(8):183.
 - [17] 王凌翔, 吴正春, 文字, 等. 肿瘤干细胞的光动力治疗研究进展[J]. *激光生物学报*, 2017,26(01):1-8.
 - [18] Li S Y, Cheng H, Qiu W X, et al. Cancer cell membrane-coated biomimetic platform for tumor targeted photodynamic therapy and hypoxia-amplified bioreductive therapy[J]. *Biomaterials*, 2017,142:149-161.
 - [19] Abo-Zeid M, Abo-Elfadl M T, Mostafa S M. Photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid triggered DNA damage of adenocarcinoma breast cancer and hepatocellular carcinoma cell lines[J]. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2018,21:351-356.
 - [20] Yang Y, Chen L, Gu J, et al. Recurrently deregulated lncRNAs in hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Commun*, 2017,8:14421.
 - [21] Li Y, Di C, Li W, et al. Oncomirs miRNA-221/222 and Tumor Suppressors miRNA-199a/195 Are Crucial miRNAs in Liver Cancer: A Systematic Analysis[J]. *Dig Dis Sci*, 2016,61(8):2315-2327.
 - [22] Hao N B, He Y F, Li X Q, et al. The role of miRNA and lncRNA in gastric cancer[J]. *Oncotarget*, 2017,8(46):81572-81582.
 - [23] Yang Y, Chen L, Gu J, et al. Recurrently deregulated lncRNAs in hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Commun*, 2017,8:14421.
 - [24] Banaudha K K, Verma M. Epigenetic biomarkers in liver cancer[J]. *Methods Mol Biol*, 2015,1238:65-76.
 - [25] Yamazaki T, Hirose T. The building process of the functional paraspeckle with long non-coding RNAs[J]. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2015,7:1-41.
 - [26] Naganuma T, Hirose T. Paraspeckle formation during the biogenesis of long non-coding RNAs[J]. *RNA Biol*, 2013,10(3):456-461.
 - [27] Zhang X N, Zhou J, Lu X J. The long noncoding RNA NEAT1 contributes to hepatocellular carcinoma development by sponging miR-485 and enhancing the expression of the STAT3[J]. *J Cell Physiol*, 2018,233(9):6733-6741.
 - [28] Kong Y, Huang T, Zhang H, et al. The lncRNA NEAT1/miR-29b/Atg9a axis regulates IGFBP1-induced autophagy and activation of mouse hepatic stellate cells[J]. *Life Sci*, 2019,237:116902.
 - [29] Wang Y, Hu S B, Wang M R, et al. Genome-wide screening of NEAT1 regulators reveals cross-regulation between paraspeckles and mitochondria[J]. *Nat Cell Biol*, 2018,20(10):1145-1158.
 - [30] Zheng X, Zhang Y, Liu Y, et al. HIF-2alpha activated lncRNA NEAT1 promotes hepatocellular carcinoma cell invasion and metastasis by affecting the epithelial-mesenchymal transition[J]. *J Cell Biochem*, 2018,119(4):3247-3256.
 - [31] Ru Y, Chen X J, Guo W Z, et al. NEAT1_2-SFPQ axis mediates cisplatin resistance in liver cancer cells in vitro[J]. *Onco Targets Ther*, 2018,11:5695-5702.
 - [32] Koo J H, Lee H J, Kim W, et al. Endoplasmic Reticulum Stress in Hepatic Stellate Cells Promotes Liver Fibrosis via PERK-Mediated Degradation of HNRNPA1 and Up-regulation of SMAD2[J]. *Gastroenterology*, 2016,150(1):181-193.
 - [33] Espinosa S, Zhang L, Li X, et al. Understanding pre-mRNA splicing through crystallography[J]. *Methods*, 2017,125:55-62.
 - [34] Chen Y, Liu J, Wang W, et al. High expression of hnRNPA1 promotes cell invasion by inducing EMT in gastric cancer[J]. *Oncol Rep*, 2018,39(4):1693-1701.

三、研究内容

（研究目标、研究内容和拟解决的问题）

1. 研究内容

1.1 光动力疗法抑制肝癌细胞增殖、侵袭、迁移的疗效验证

在肝癌细胞株 HepG2 水平，用光敏剂 5-ALA 介导光动力治疗，MTT 实验、划痕试验、Transwell 小室实验等验证光动力疗法对肝癌的抑制情况，qPCR、Western blot 实验检测相关因子及蛋白表达情况（AMAD2、HNRNPA1、Neat1 等）；

1.2 lncRNA Neat1 影响 AMAD2 表达的核内机制研究

在肝癌小鼠模型中干扰 lncRNA Neat1 表达，qPCR 检测 lncRNA Neat1 和 AMAD2 的表达水平，Western blot 检测 HNRNPA2、HNRNPA1、AMAD2 的表达水平。然后干扰靶基因 AMAD2 表达，qPCR 检测 lncRNA Neat1 的表达水平；Western blot 检测 HNRNPA2、HNRNPA1 的表达水平。GST-pull down、免疫共沉淀及细胞内共定位实验进一步证实旁斑蛋白 HNRNPA2 与 HNRNPA1 之间的相互作用。双荧光素酶报告实验确认 lncRNA Neat1 对 AMAD2 启动子 HNRNPA1 的影响；

1.3 HNRNPA1 介导 lncRNA Neat1 出核参与细胞质内 ceRNA 机制研究

在肝癌细胞模型中，RNA-pulldown、qPCR 等实验确定 RNA 剪接因子 HNRNPA1 与 lncRNA Neat1 之间存在相互作用。然后干扰 HNRNPA1 的表达，qPCR 实验检测 miRNA-218-5p、的表达水平，Western blot 检测 HNRNPA2、HNRNPA1、AKT3 表达水平；干扰 HNRNPA1 的表达，MTT 实验、划痕试验、Transwell 小室实验检测其对肝癌细胞抑制情况，qPCR 实验检测 miRNA-218-5p 的表达水平，Western blot 检测 HNRNPA2、HNRNPA1、AKT3 表达水平；在肝癌小鼠模型中，干扰 lncRNA Neat1 的表达，监测荷瘤小鼠瘤体直径情况，Western blot 检测 AKT3 的表达水平。然后干扰 AKT3 的表达，监测荷瘤小鼠瘤体直径情况，qPCR 实验检测 lncRNA Neat1 表达水平。共转染 lncRNA Neat1 和 miRNA-218-5p，qPCR、Western blot 等实验确认 lncRNA Neat1 是否作为竞争性内源 RNA 抵消了 miRNA-218-5P 对 AKT3 的抑制作用。

2. 研究目标

2.2.1 体内外实验明确细胞核内 lncRNA Neat1 与 HNRNPA2 结合，从而上调 HNRNPA1 表达水平，促进 AMAD2 的表达，抑制肝癌增殖、侵袭、迁移；

2.2.2 体内外实验证实 HNRNPA1 作为 RNA 剪接因子转运 lncRNA Neat1 至细胞质内，从而竞争性抑制结合 miRNA-218-5p 影响 PI3K-AKT 信号通路，抑制肝癌进展。

1.3 拟解决的关键科学问题

1.3.1 非编码 RNA 参与调控 PDT 治疗肝癌的机制不明。我们基于前期工作，提出以 lncRNA Neat1 为核心的核内外调控分子机制是本课题拟解决的关键科学问题之一；

1.3.2 旁斑蛋白 HNRNPA2、HNRNPA1 在 Neat1 与 miRNA-218-5p 的结合、AMAD2 表达的促进和 PI3K-AKT 通路的抑制等过程中起到的作用，是本课题拟解决的第二个关键科学问题。

四、研究方法和技术路线

(采用的研究方法和技术路线及可行性分析)

1. 研究方法

1.1. 光动力疗法抑制肝癌的疗效验证

在肝癌细胞株 HepG2 水平, MTT 实验、划痕试验、Transwell 小室实验等验证 5-ALA 介导光动力治疗, 对肝癌抑制情况的影响。

1.2 细胞核内 lncRNA Neat1 与旁斑蛋白作用影响 AMAD2 表达的机制研究

1) 在肝癌细胞株 HepG2 水平, 用 siRNA 干扰 lncRNA Neat1 的表达, qPCR 检测 lncRNA Neat1 和 AMAD2 的表达水平, Western blot 检测 HNRNPA2、HNRNPA1、AMAD2 的表达水平;

2) 设计合成针对 AMAD2 的 siRNA, 在肝癌细胞株 HepG2 水平干扰 AMAD2 的表达, qPCR 检测 lncRNA Neat1 的表达水平; Western blot 检测 HNRNPA2、HNRNPA1 的表达水平;

3) GST-pull down、免疫共沉淀及细胞内共定位进一步证实 HNRNPA2 与 HNRNPA1 之间的相互作用, PCR 扩增获得 AMAD2 和 lncRNA Neat1 的全长, 琼脂糖凝胶电泳验证产物, 测序软件确认结果, 使用双荧光素酶报告系统检测 lncRNA Neat1 是否调控靶基因 AMAD2 的启动子 HNRNPA1。

1.3 HNRNPA1 介导 lncRNA Neat1 出核参与细胞质内 ceRNA 机制研究

1) 肝癌细胞株 HepG2 水平, RNA-pulldown、qPCR 等实验确定 RNA 剪接因子 HNRNPA1 与 lncRNA Neat1 之间存在相互作用;

2) 在肝癌细胞株 HepG2 水平, 干扰 HNRNPA1 的表达, qPCR 检测 miRNA-218-5p 表达水平, Western blot 检测 HNRNPA2、HNRNPA1、AKT3 表达水平;

3) 在 lncRNA Neat1 条件基因敲除小鼠中, 监测荷瘤小鼠生长情况; qPCR 检测 miRNA-218-5p 表达水平, Western blot 检测 HNRNPA2、HNRNPA1、AKT3 表达水平;

4) 在肝癌细胞株 HepG2 水平, 干扰 lncRNA Neat1 的表达, MTT 实验、划痕试验、Transwell 小室实验等验证对肝癌抑制情况的影响, qPCR 检测 miRNA-218-5p 表达水平, Western blot 检测 AKT3 的表达水平;

5) 在肝癌细胞株 HepG2 水平, 干扰 AKT3 的表达, MTT 实验、划痕试验、Transwell 小室实验等验证对肝癌抑制情况的影响, qPCR 检测 miRNA-218-5p 表达水平, Western blot 检测 AKT3 的表达水平;

6) 在肝癌细胞株 HepG2 水平, 共转染 lncRNA Neat1 和 miRNA-218-5p siRNA, qPCR、Western blot 等确认 lncRNA Neat1 是否作为竞争性内源 RNA 抵消了 miRNA-218-5P 对 AKT3 的抑制作用;

7) 在 lncRNA Neat1 条件基因敲除小鼠中 (Nakagawa S, et al. Development.

2014), 验证 lncRNA Neat1 条件基因敲除后小鼠是否不发生肝癌, lncRNA Neat1 表达水平正常后小鼠是否发生肝癌或者肝癌程度加重。

2. 技术路线



图 3：技术路线图

3 可行性分析

经过对项目研究意义的论述，国内外研究现状及发展动态的分析，研究目标和研究内容的设置，关键科学问题的提炼，研究内容和研究方案的规划，本项目切实可行，具体如下：

3.1 前期基础扎实，假说合理： 本研究项目是在充分分析国内外相关研究，以及本团队前期研究（光动力治疗肝癌的疗效验证、lncRNA Neat1 的部分功能实验、lncRNA Neat1 与 miRNA-218-5P 存在结合等）基础上凝练而出的，实验结果明确，立项依据充分，提出假说合理。

3.2 实验条件优越，为本项目实施提供硬件保障： 本项目拟在台州市中心医院精准实验室、台州学院医学院中心实验室开展，实验室已具备完整的生物化学、分子生物学和细胞生物学实验条件，例如：细胞培养房、免疫组化实验室、PCR 室、WB 室、流式细胞技术间、荧光显微镜等平台，并且拥有足够的实验技术人员，本项目涉及的实验均有熟练的操作人员，可以保障本项目的成功实施。

3.5.3 人员组成合理，具有完成本项目的能力： 本团队长期从事肝癌的相关研究，并获多项省部级及市级基金资助，申请人以第一作者发表光动力及肝癌相关 SCI 论文 2 篇，参与基础研究论文多篇，具备扎实的科研设计和写作能力。团队人员配备及梯队结构合理，其余成员均长期从事肝癌相关基础研究与临床研究，参与多项科研课题，具有严谨的科研思维、丰富的科研实践经历和娴熟的操作技术，为本课题奠定了坚实的研究基础。

五、预期结果

（科学价值、社会效益、经济效益分析）

本研究基于光动力与非编码 RNA 关系的研究，从细胞核、细胞质两个层面明确阐释光动力治疗肝癌过程中 lncRNA Neat1 的作用机制；并从 HNRNPA1（旁斑蛋白、RNA 剪接因子）的角度来阐明 lncRNA Neat1 的核内核外生物效应通路及其在肝癌发病机制中的作用，为光动力治疗肝癌提供理论依据。是肝癌治疗及发病机制研究领域的一次创新；

课题研究期间，拟发表论文 2-3 篇，其中 IF>3 的 SCI 论文 1 篇；协助培养硕士研究生 1-2 名；并将研究成果作为前期基础进一步申报省部级课题，如能有效完成预期目标，将对肝癌的治疗及发病机制研究产生重大的意义，无论是从社会效益还是经济效益的角度都具有深远影响，可有效减轻肝癌患者的经济负担，提高其生活治疗。

六、基础条件

1. 已做的工作基础

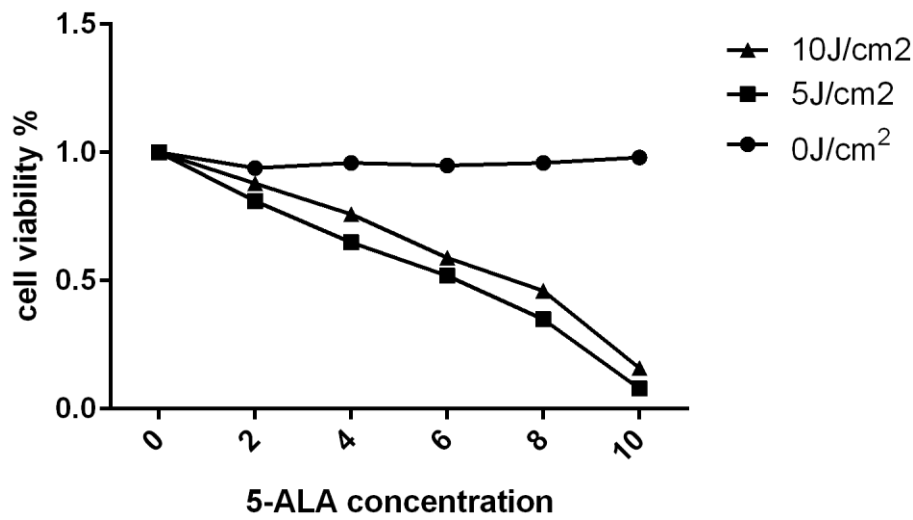


图 4：5-ALA 介导 PDT 有效抑制肝癌细胞 HepG2 增殖

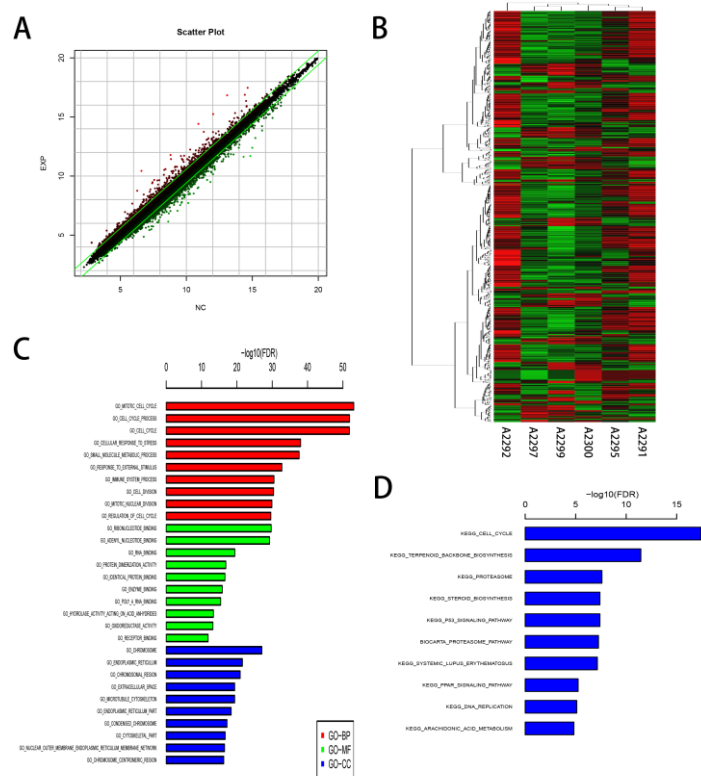


图 5：5-ALA 介导 PDT 治疗前后肝癌细胞高通量测序情况

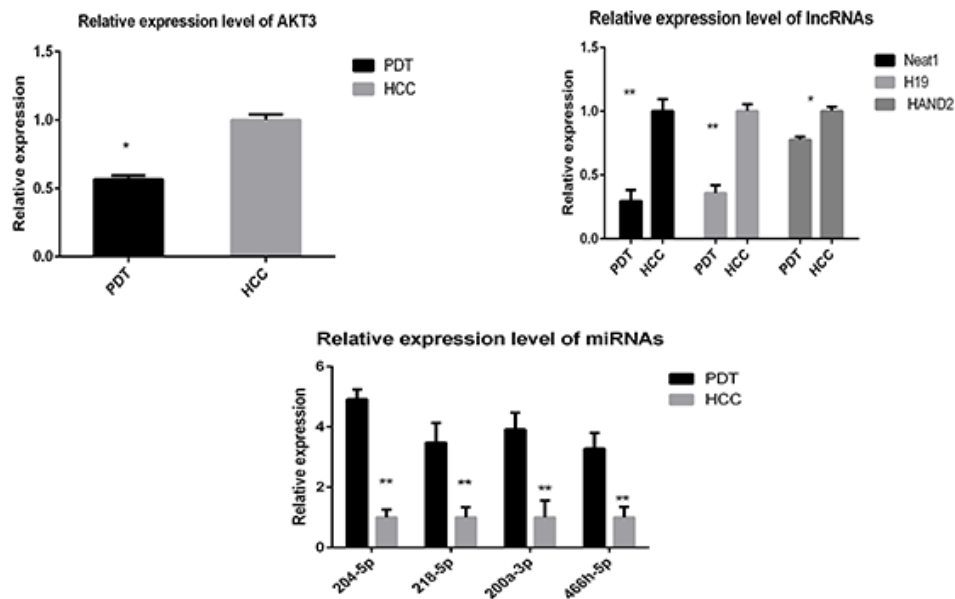


图 6: qPCR 验证芯片预测结果 (PDT 处理后 lncRNA Neat1 表达水平下调, miRNA 218-5P 表达水平上调, AKT3 表达水平下调)

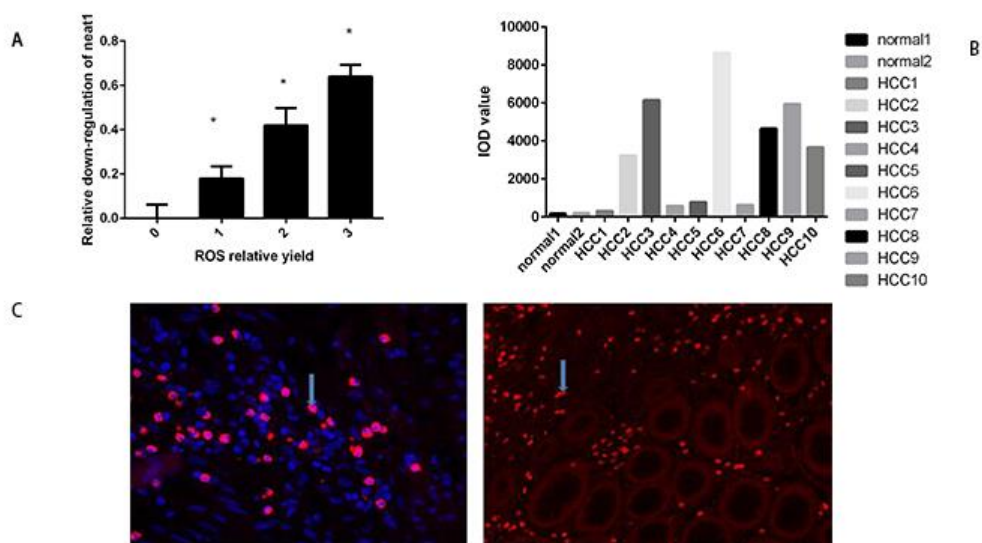


图 7: (A) ROS 产量与 lncRNA Neat1 的下调水平存在平行关系; (B) 纵坐标为肝癌组织中 lncRNA Neat1 的表达量, 相对于正常人、肝癌患者 lncRNA Neat1 表达上调; (C) Fish 实验发现 lncRNA Neat1 在细胞核和细胞质均有表达, 左图为细胞核, 右图为细胞质、箭头所示为 lncRNA Neat1 探针 (400X)

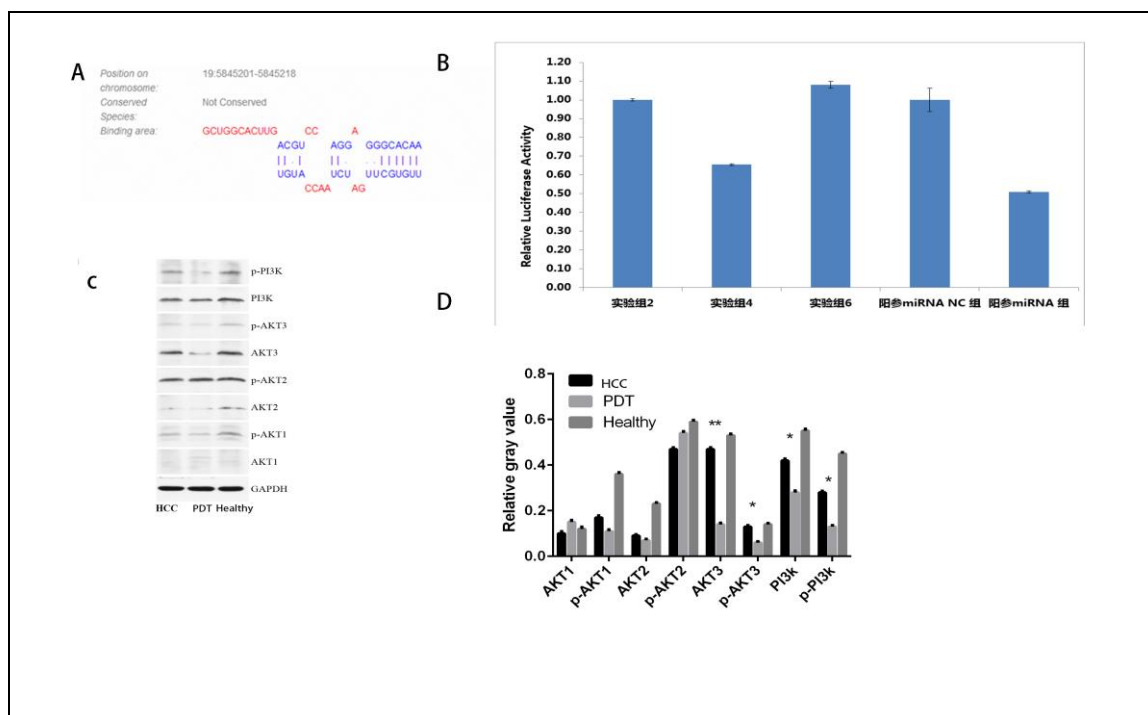


图 10: (A) 预测软件提示 lncRNA Neat1 与 miRNA-218-5p 之间存在结合位点; (B) 双荧光素酶报告实验证实 lncRNA Neat1 与 miRNA-218-5p 之间存在结合位点; (C) Western blot 实验验证 PI3K-AKT 通路表达水平不同处理组 AKT1, p-AKT1, AKT2, p-AKT2, AKT3, p-AKT3, PI3K, p-PI3K 蛋白质组的水平的 Western 印迹分析; (D) 以 GAPDH 的灰度值为标准。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

2. 主要研究成果 (包括承担的课题, 取得的成果, 发表的论文等)

团队承担的课题: “经皮冷循环微波治疗肝脏血管病的临床研究”, “重组人课题 P53 腺病毒注射液经胰腺血管灌注治疗中晚期胰腺癌的临床研究”, “肝脏缺血肝脏缺血-再灌注损伤中 GADD45 β 动态表达变化及启动子调控机制的研究”, “门静脉高压断流术应用透明质酸钠对抗血管再生的临床研究”, “原位肝移植的动物实验”, “肝癌患者骨髓微转移的基因研究”, “p53PIK 肝癌侵袭与转移中的作用及机制研究”, “GPC3 基因在肝癌诊断中的意义研究”, “恶性胆道梗阻的序贯介入治疗”和“CT 测量肝脏体积预测肝癌术后肝功能损害的临床研究”。“肝癌微波消融激发机体 NK 细胞抗肿瘤免疫应答的研究”

团队取得的成果: 1. 前列腺素 E1 静滴+逆向体外反搏治疗末梢动脉闭塞临床康复研究”获 2010 年度浙江省医药卫生科技奖二等奖 2. 2010 年台州市科技进步二等奖 3. 浙江省自然科学论文二等奖

发表的论文:

1. Zheng Y W, Wang K P, Zhou J J, ZeQun Zhang, Li Xiong, Yu Wen, Heng Zou. Portal hypertension predicts short-term and long-term outcomes after hepatectomy in hepatocellular carcinoma patients[J]. Scand J Gastroenterol, 2018, 53(12):1562-1568.
2. Liu Z, Xiong L, Ouyang G, et al. Investigation of Copper Cysteamine Nanoparticles as a New Type of Radiosensitizers for Colorectal Carcinoma Treatment[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1):9290.
3. Yang X, Liu L, Zou H, et al. circZFR promotes cell proliferation and migration by regulating miR-511/AKT1 axis in hepatocellular carcinoma[J]. Dig Liver Dis, 2019, 51(10):1446-1455.
4. Ouyang G, Xiong L, Liu Z, et al. Inhibition of autophagy potentiates the apoptosis-inducing effects of photodynamic therapy on human colon cancer cells[J]. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2018, 21:396-403

3. 主要的设备、试剂、实验动物（注明获得实验动物及动物实验合格的情况）以及自筹经费情况

设备：细胞培养室、流式细胞仪、定量 PCR 仪、超速离心机、高速冷冻离心机、电泳槽及电泳仪、转膜槽、图象分析系统、全自动细胞计数仪、二维电泳系统、紫外/可见光分光光度仪、超低温冰箱、激光共聚焦显微镜、凝胶成像分析系统、PCR 基因扩增仪、蛋白层析系统、实验动物房等；

试剂：细胞培养基及血清、MTT 监测试剂盒、qPCR 相关试剂、WB 相关试剂、划痕实验相关试剂、Transwell 实验相关试剂、转染相关试剂、干扰 RNA、各类型试剂耗材等

实验动物：本实验涉及相关实验动物及动物实验均于台州学院医学院动物房进行，台州学院医学院动物房具有 SPF 级认证资格，实验动物来源可靠，动物培养规范。

自筹经费：本研究确定自筹经费为 10 万元，拟来自于个人科研经历、所在科室重点学科支持、相关实验室赞助等，若经费不足可从团队其他相关课题经费补充。

七、考核指标

（年度计划进展及具体考核指标）

1. 年度计划进展

2020. 1-2020. 12

- 1) 完成光动力治疗肝癌疗效的细胞水平实验；
- 2) 确认细胞核内 lncRNA Neat1 作用的靶基因；
- 3) 确定 HNRNPA2 与 HNRNPA1 之间的相互作用；

2021. 1-2021. 12

- 1) 验证 lncRNA Neat1、AKT3 的功能；
- 2) 确认 lncRNA Neat1 对 AMAD2 启动子 HNRNPA1 的影响。
- 3) 对数据进行分析统计，撰写论文；
- 4) 全面分析、整理和总结课题，并根据实验结果制定下一步研究计划

2 考核指标：

- 2.1 拟发表论文 2-3 篇，其中 IF>3 的 SCI 论文 1 篇；
- 2.2 协助培养硕士研究生 1-2 名，
- 2.3 并将研究结果作为研究基础申报省部级课题 1 项。

八、申请者正在承担的其它研究课题

（科研任务的名称、任务来源、起止年月、负责或参加等情况）
无

九、经费概算

支出科目	金 额 (万元)	计 算 根 据 及 理 由
1、设备费	0	
2、实验材料费	7.5	光动力治疗肝癌的细胞学、动物学实验研究
3、测试化验加工费	1.3	用于 lncRNA Neat1 的功能学实验研究

4、燃料动力费	0	
5、差旅费	0	
6、会议费	0	
7、合作、协作研究与交流费	0	
8、出版/文献/信息传播/知识产权事务费	1	
9、人员劳务费	0	
10、专家咨询费	0.2	用于专家咨询
11、管理费	0	
12、其他开支	0	
总计	10	

注：预算支出科目按下列顺序填写： 1.科研业务 2.实验材料费 3.仪器设备费 4. 实验室改装费 5. 协作费 6.项目组织实施费。

十、管理部门审核意见

申请者所在科研管理部门和审查意见（包括：对课题的意义、特色和创新之处、申请者的素质与水平及科研条件等签署具体意见）

（签字）

盖 章

年 月 日

十一、学术委员会意见

主任（签字）：

盖 章

年 月 日

台州学院科研项目申报书

(理工类)

课题类别	培育基金
学科分类	肝胆外科
课题名称	肝癌微波消融激发机体 NK 细 胞 抗 肿 瘤 免 疫应答的研究
成果形式	论文及研究报告
负责人	江 浩
所在部门	台州市中心医院肝胆外科
联系电话	13666827682

2018 年 09 月

申请者的承诺:

我对本人填写的本表各项内容的真实性负责, 保证没有知识产权的争议。如获立项, 我承诺以本表为有约束力的协议, 遵守台州学院科研管理的有关规定, 按计划认真开展研究工作, 取得预期研究成果。

申请者 (签章):

年 月 日

所在部门承诺:

本部门对申请者填写的各项内容的真实性负责, 保证没有知识产权的争议。如获立项, 承诺以本表为有约束力的协议, 遵守学校的有关规定, 为本课题研究提供必要的支持, 并做好课题研究的协调和管理工作, 对本课题的完成提供信誉保证。

单位 (盖章):

年 月 日

填表说明:

1. 本表从网上下载后, 要求一律用计算机填写, A4 纸打印。
2. 封面上的“课题类别”、“学科分类”以及“成果形式”等栏目的填写应与数据表选择的内容一致。
3. 数据表中“学科分类”栏目的填写, 请直接在选中的分类编号上打√。

一、数据表

课题名称	肝癌微波消融激发机体 NK 细胞抗肿瘤免疫应答的研究						
课题类别	1. 培育基金 <input checked="" type="checkbox"/> 2. 优秀青年基金 3. 杰出青年基金						
科研机构或学科名称	台州市中心医院（台州学院附属医院）肝胆外科/台州市普外科重点实验室						
学科分类	理工类						
负 责 人	江浩	性别	男	民族	汉	出生日期	1983. 09. 23
行政职务	无	专业职称		主治医师		研究专长	肝脏肿瘤
最后学历	硕士	最后学位		硕士		所在部门	肝胆外科
联系电话	13666827682			E-mail: jiangh@tzzxyy.com			
主 要 参 加 者（同期成员参与项目次数符合规定）							
姓 名	性别	出生日期	职称	所在部门	项目分工		
莫经刚	男	1963. 8. 27	主任医师	肝胆外科	实验设计及病例收集		
金冲	男	1975. 4. 05	副主任医师	肝胆外科	实验设计及病例收集		
张亚琼	女	1979. 3. 05	副主任技师	检验科	标本采集及结果分析		
冯一浮	男	1990. 5. 19	住院医师	肝胆外科	标本采集及临床资料随访		
王宏飞	男	1978. 11. 2	助理研究员	精准实验室	数据总结分析		
研究年限	2 年		预计完成时间		2021 年		
预期成果（包括论文、专利、专著、转入的省部级以上项目、省部级以上成果奖励、人才培养、为政府部门提供决策参考、经济社会效益，500 汉字以内）							

- (1) 明确 NK 细胞在肝癌抗肿瘤免疫中的重要作用，为肝癌的免疫治疗提供依据。
- (2) 明确肝癌微波消融使 NK 细胞激活的证据，阐明肝癌微波消融在肝癌治疗过程中的免疫相关作用机制。
- (3) NK 细胞数量及功能作为肝癌微波消融术后复发的判断指标，为肝癌预后判断提供参考。
- (4) 发表论文 1-2 篇。

二、课题正文（培育项目限 8000 字以内，优秀青年、杰出青年项目限 15000 字以内，可加页）

培育项目正文

1. 项目名称：肝癌微波消融激发机体 NK 细胞抗肿瘤免疫应答的研究

2. 研究工作的科学意义（研究意义、国内外研究现状及发展动态分析，需结合科学研究发展趋势来论述科学意义；或结合经济和社会发展中迫切需要解决的关键科技问题来论述其应用前景）

原发性肝癌（HCC）是全球第 5 位、中国第 3 位最常见的癌症[1]。据国际癌症研究中心(IARC)估计，2012 年全球肝癌发病数为 78.2 万人，其中约 55%发生在中国，即中国肝癌发病 43 万人， 统计显示 2012 年中国成年人中 17.4%的癌症死亡病例来自肝癌。台州市疾控中心发布了 2017 年肿瘤监测数据，全市癌症新发病例数为 24556 例，相当于平均每天有 67 人被新确诊为癌症；全市癌症死亡数 11181 例，相当于平均每天约有 31 人死于癌症，自 2009 年起，癌症始终位居台州市民死因的首位，其中肝癌死亡率居第二位，肝癌根治性治疗手段主要包括手术切除，肝移植及局部消融治疗，因为肝癌起病隐匿，发现时往往都是中晚期，而且很多肝癌患者肿瘤多发或合并有严重的肝硬化，仅有少部分患者适合做肝切除或移植[2]，大量文献报道[3、4、5]表明对直径 ≤ 5 cm 的肝脏肿瘤局部消融治疗其治疗远期生存率可与手术切除相媲美，但局部消融治疗相较传统手术的具有微创、安全、经济、痛苦小等优势，尤其适合那些无法耐受手术及复发和转移的肝癌患者。

微波消融是肝癌局部消融的常用形式，微波消融将特制的微波针穿刺到肿瘤中心区域，释放微波磁场使周围的分子高速旋转运动并摩擦升温，从而使肿瘤组织凝固、脱水坏死。微波消融治疗可以使肝脏肿瘤组织发生不可逆

性凝固性坏死并残留在体内而不必取出，且周围正常肝组织极少或不受损伤，这就充分显示了微创治疗的目的，减少患者的治疗痛苦，明显改善患者预后，提高术后生活质量，目前部分研究还发现热消融通过多种免疫调节机制激发了机体的特异性抗肿瘤免疫作用，这意味着热消融技术不仅是一种肿瘤局部控制手段，消融还可以激发系统免疫，潜力巨大。因此微波消融的免疫调节机制正成为热消融领域的研究新热点。

自然杀伤细胞（natural killer cell, NK）是天然免疫系统的重要组成部分，在宿主防御肿瘤发生中发挥关键作用，NK 细胞是一类独立的淋巴细胞亚群，与 T 细胞和 B 细胞不同的是 NK 细胞不需要特异性的抗原刺激就可以杀伤靶细胞，具有免疫清除和免疫监视等功能。癌细胞发生受到 NK 细胞和免疫系统其他成员的密切监视。除了直接杀死肿瘤细胞的能力外，NK 细胞还能够释放免疫调节细胞因子，这些细胞因子可激活先天免疫系统和适应性免疫系统的白细胞[6]。肝脏作为天然免疫优势器官，含有数量庞大的 NK 细胞。不幸的是，肝癌患者 NK 细胞数量下降，而且其细胞毒性受到显著抑制[7]，NK 细胞的功能缺陷以及数量的减少可能是抗肿瘤免疫反应失败的原因。理论上讲，肝癌患者可以从 NK 细胞的再激活及数量上升中受益。近年来，肿瘤的免疫疗法在临床研究等方面取得了巨大的进展，但主要的研究都是针对特异性免疫系统中 T 细胞等展开的。然而，随着对属于固有免疫系统的 NK 细胞研究的深入，其在肿瘤免疫中的作用越来越受到重视。最近，一项研究表明，射频消融（RFA）可以激活 HCC 患者的外周血循环 NK 细胞[8]。两项正在进行的临床试验正在尝试评估 NK 细胞治疗联合肝切除术（NCT02008929）或肝移植治疗原发性肝癌（NCT01147380）。尽管有大量确凿的证据表明 NK 细胞在抗肿

瘤反应中的作用，但是关于肝癌微波消融激发机体 NK 细胞抗肿瘤免疫应答的国内外研究较少，而且热消融对 NK 细胞的影响的信息都是初步的。本研究通过对肝癌患者与健康群体的 NK 细胞数量及功能对比，以及肝癌患者微波消融前后 NK 细胞数量及功能对比，探寻肝癌微波消融激发机体 NK 细胞抗肿瘤免疫应答的机制，为肝癌的免疫治疗提供新的思路。

参考文献：

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A (2012) Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 62(1): 10-29.
2. Ren H, Enrique Campos-Nanez, Ziv Yaniv, Filip Banovac, Nobuhiko Hata, et al. Treatment Planning and Image Guidance for Radiofrequency Ablation of Large Tumors. *IEEE Journal of Biomedical and Health Informatics* 18(3): 920-928.
3. Huang J, Yan L, Cheng Z et al. A randomized trial comparing radiofrequency ablation and surgical resection for HCC conforming to the Milan criteria. *Ann Surg* 2010;252(6):903–912.
4. Lee H, Suh K, Kim H et al. A prospective randomized study comparing radiofrequency ablation and hepatic resection for hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2014;60:855A–856A.
5. Kayvan Mohkam ,Paul-Noël Dumont ,Anne-Frédérique Manichon et al. No-touch multibipolar radiofrequency ablation vs. surgical resection for solitary hepatocellular carcinoma ranging from 2 to 5 cm. *Hepatology*. 2018;68: 1172-1180.
6. Subleski JJ, Hall VL, Back TC, Ortaldo JR, Wiltout RH. Enhanced antitumor response by divergent modulation of natural killer and natural killer T cells in the liver. *Cancer Res*. 2006;66:11005-11012.
7. L. Cai, Z. Zhang, L. Zhou et al., Functional impairment in circulating and intrahepatic NK cells and relative mechanism in hepatocellular carcinoma patients. *Clinical Immunology*, 2008;129;3: 428–437.
8. A. Zerbini, M. Pilli, D. Laccabue, G. Pelosi, A. Molinari, E. Negri, et al. Radiofrequency thermal ablation for hepatocellular carcinoma stimulates autologous NK-cell response. *Gastroenterology*. 2010; 138: 1931-1942.

3. 本项目研究目标，及其与申请者研究工作长期目标的关系

3.1 研究目标

(1) 分析肝癌微波消融在激发机体抗肿瘤免疫的作用，特别是研究 NK 细胞在其中扮演的重要角色，为肝癌的临床治疗，特别是肝癌的免疫治疗提供新的思路。

(2) 对比正常人和肝癌微波消融病人外周血的 NK 细胞的数量及功能，并数据进行分析，找到肝癌微波消融使 NK 细胞激活的证据，进一步丰富肝癌微波消融在肝癌治疗过程中的免疫相关作用机制。

(3) 通过临床资料的随访，深入探索 NK 细胞在肝癌细胞免疫的作用，了解 NK 细胞数量及功能是否可以作为肝癌微波消融术后复发的判断指标，为肝癌预后判断提供重要临床指导价值。

3.2 与研究工作长期目标的关系

(1) 通过全方位的深入研究，阐明肝癌微波消融激发机体 NK 细胞抗肿瘤免疫的机制。

(2) 结合肝癌微波消融存在激发机体 NK 细胞抗肿瘤免疫的特征，扩大样本和人群探索，探索 NK 细胞作为肝癌免疫治疗的可行性及其临床应用价值。

(3) 通过扩大样本和人群探索，明确 NK 细胞数量及功能是否可以作为肝癌发生及术后复发的判断指标。

(4) 通过本课题对肝癌微波消融激发机体 NK 细胞抗肿瘤免疫应答机制研究和探索，培育省市级课题。

4. 项目研究内容、研究方案和进度安排 (包括有关方法、技术路线、实验手段、关键技术等说明，年度研究计划)

4.1 项目研究内容：

(1) 对比肝癌与健康人群外周血 NK 细胞数量及功能的差异。

(2) 对比微波消融治疗肝癌患者术前与术后外周血 NK 细胞数量及功能的差异。

(3) 随访观察肝癌微波消融术后复发转移患者其外周血 NK 细胞数量及功能的变化。

4.2 项目研究方案：

(1) 收集有乙肝病史的行微波消融治疗的肝癌患者 30 例，对照组选取与肝癌患者的年龄、性别相匹配的健康个体，本研究取血样获得伦理委员会批准，并签署知情同意书。

(2) 肝癌微波消融，局部消融治疗在腹腔镜直视下或 B 超引导下经皮或者经穿刺孔在微波消融的瘤体内插入微波固化针。输出功率为 50-60 瓦。治疗时间 5-15 分钟，对于小于 3cm 的病灶行单针单点穿刺，一次消融完成，对于大于 3cm, 小于 5cm 的病灶行多针多点穿刺，并根据 B 超实时评价治疗效果，消融后病灶回声消失变为片状强回声伴声影且强回声逐渐退去，最后根据 B 超确认病灶完全消融后消融针道拔针。临床评估患者并在消融后 1 个月用对比增强 CT 评估 HCC 结节是否完全坏死，然后分别通过对比增强超声和 CT 扫描每 3 和 6 个月评估一次。

(3) 外周血淋巴细胞计数，肝癌微波消融患者术前前一天，术后第一周，术后第四周，健康人群及肿瘤复发患者进行外周血淋巴细胞亚群（CD4⁺，CD8⁺ T 细胞，B 细胞和 NK 细胞）的绝对计数。将血液吸入 4.5mL EDTA 管中。使用以下单克隆抗体组合：CD3-异硫氰酸荧光素（FITC）/ CD8-藻红蛋白（PE）

/ CD45-peridinin 叶绿素蛋白 (PerCP) / CD4-别藻蓝蛋白 (APC), CD3-FITC / CD19-PE / CD45- PerCP 和 CD3-FITC / CD16 / 56-PE / CD45-PerCP (BD Biosciences, San Jose, CA)。将 50m 血液加入 20 μ L 每种抗体组合中, 并在 Trucount 管 (BD Biosciences) 中在室温下避光孵育 15 分钟。孵育后, 用 450 μ L FACS 裂解溶液裂解红细胞。再孵育 15 分钟后, 在 BD Biosciences 流式细胞仪上获得样品。用软件测定绝对细胞计数。

(4) 外周血单个核细胞 (PBMC) 的分离和 NK 细胞的分离, 采集入选患者与健康人外周静脉血, 用肝素钠抗凝, 全血离心去除血浆; 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 稀释 1 倍, 加至淋巴细胞分离液 (购自上海匿信化学试剂公司) 上层, 2500 r / min 离心 25 min, 取中间白膜层 (即单核细胞和淋巴细胞富集层), PBS 洗涤 2 遍, 得到 PBMC。将 PBMC 在室温下在黑暗中与以下抗体的组合孵育 15 分钟: CD56-FITC, CD56-APC, CD16-FITC, CD3-PerCP (BD Biosciences-Pharminogen), NKG2D-PE, NKG2A-PE (R&D Systems), Inc., Minneapolis, MN) 和 NKp46-PE, NKp30-APC, CD158a-FITC, CD158b-PE, CD158e-FITC (Miltenyi Biotec), 固定和透化的细胞用 Ki67-FITC (BD) 染色, 用磷酸盐缓冲盐水, 0.1% 胎牛血清洗涤细胞, 并立即在 BD Biosciences 流式细胞仪 (FACSCalibur) 上使用 CellQuest 软件进行分析。

(5) NK 细胞脱颗粒和干扰素 (IFN) γ 分泌水平的检测, PBMC 在分别含佛波酯 (PMA, 25 ng / ml) 和离子霉素 (1 pg / ml) 或 K562 细胞的 RPMI 1640 (含体积分数 10% 胎牛血清) 培养液中活化 5 h, 同时加入 FITC 标记的 CD107a 抗体细胞再进行表面抗体染色, 破膜和胞内 IFN γ 染色, 通过 FACSCalibur 流式细胞仪和 CellQuest 软件进行检测和分析。

(6) NK 细胞杀伤活性检测，靶细胞选用 NK 细胞的效应细胞 K562。PBMC 经过白细胞介素 (IL)-2 (200 U / ml) 过夜活化，与 CFSE 标记的 K562 细胞以不同的效靶比 (30: 1、10: 1、3: 1) 混合共培养，单独的 K562 细胞作为对照以检测自发的凋亡情况。培养 4 h，细胞通过放线菌素 D (7-AAD) 染色 (1 g / m. 1)，再进行 FACSCalibur 流式细胞仪检测。

4.3 进度安排：

2019 年度 (2019. 1-2019. 12) 工作：

收集临床微波消融治疗的肝癌患者及健康人群的血液样本，通过实验，分析健康人群和肝癌患者术前其 NK 细胞数量及功能上的差别。分析肝癌患者术前及术后其 NK 细胞数量及功能上的差别。

2020 年度 (2020. 1-2020. 12) 工作：

继续收集临床微波消融治疗的肝癌患者及健康人群的血液样本，并对这些临床样本进行随访，整理相关的随访资料，建立样本与患者生存之间的对应关系。在血液样本样本中验证 NK 细胞数量及功能作为肝癌微波消融术后复发因素判断指标的可能性。

整理实验数据，并写成科研论文进行发表；整理相关的实验数据和分析数据，准备课题的结题报告。

5. 项目创新之处

(1) 本课题提出的肝癌微波消融激发机体 NK 细胞抗肿瘤免疫应答的研究鲜有报道，通过深入分析能发现肝癌微波消融在激发机体抗肿瘤免疫的作用，特别是 NK 细胞在其中扮演的重要角色，为肝癌的临床治疗，特别是肝癌的免疫治疗提供新的思路。

(2) 本课题通过对比正常人和肝癌微波消融病人外周血的 NK 细胞的数量及功能，并数据进行分析，找到肝癌微波消融使 NK 细胞激活的证据，进一步丰富肝癌微波消融在肝癌治疗过程中的免疫相关作用机制。

6. 工作基础与工作条件（与本项目相关的研究工作积累，已具备的研究支撑条件）

6.1 工作基础：本课题组研究团队长期从事肝癌的临床及基础研究，肝癌的微波消融是我们自 2002 年开始率先在台州地区使用，到目前为止积累了大量的临床经验，每年有各类肝肿瘤消融病人 80 多例次，满足本课题研究需要，课题组成员还有大量的肝癌相关的基础研究，作为第一或重要参与者申请的多个国家级或省市级课题，如：国家自然科学基金面目项目（内吞复合体蛋白 HCRP1 对肝癌的影响及作用机理）；卫生厅科技计划 A 类课题（GPC3 基因在肝癌诊断中的意义研究）；省卫计委科技计划（环状 RNA 通过调控 miR-214 表达对肝癌恶性进展作用机制及临床应用研究）等等，也发表了多篇相关论著，其中包括 SCI 文章 10 余篇。

6.2 工作条件：团队平台为台州市普外科重点实验室，其具备基本实验的设备平台：包括离心、冷冻、搅拌、振荡、PCR 扩增、电泳、细胞培养、分子杂交等。其它设备有：多台低温冰箱、液氮灌、Eppendorf 定量 real-time PCR 仪、电泳仪、电泳槽、Olympus 生物显微镜、NIKON 倒置显微镜、BeckmanDU800 紫外分光光度计、微波炉、电热恒温水浴锅、恒温箱、摇床等。医院的实验室平台还配备了无菌室及暗室。这些基本的实验室配置能够满足常规的分子、细胞的相关实验。

此外，项目团队成员在上海的实验室还建立相关的实验平台和计算平台

可以为本项目的顺利开展和实施过程提供技术保障。实验平台：已配有 BD 流式细胞仪、进口超净工作台，拥有称量、恒温、干燥、细胞细菌培养、灭菌、离心、冷冻、搅拌、振荡、PCR 扩增、电泳、高速冷冻离心机、冰箱、恒温冷冻摇床等基本设备，平台涵盖细胞生物学、分子生物学、免疫学和动物实验四大技术体系。此外还配备倒置荧光显微镜、CO₂ 培养箱、超低温冰箱、液氮存储系统、低温高速离心机、全自动组织处理器、免疫磁珠分选器、细胞存活率分析仪，以及凝胶成像仪和核酸分析仪等设备仪器，为本项目的顺利开展及实施提供技术保障。

7. 预期研究结果、利用研究结果计划和今后发展思路（阐述研究结果的形式，如何充分利用可能得到的研究结果，拟通过何种资助渠道继续开展研究工作，预期发表的主要相关论文应与简表填写内容一致）

（1）明确 NK 细胞在肝癌抗肿瘤免疫中的重要作用，为肝癌的免疫治疗提供依据。

（2）明确肝癌微波消融使 NK 细胞激活的证据，阐明肝癌微波消融在肝癌治疗过程中的免疫相关作用机制。

（3）NK 细胞数量及功能作为肝癌微波消融术后复发的判断指标，为肝癌预后判断提供参考。

（4）发表论文 1-2 篇。

三、 经费预算（单位：万元）

科目名称	合计	备注
经费支出（合计）	1.0	
（一）科研业务费	1.0	
1、设备费	0	
2、材料费	0.6	
3、测试化验加工费	0.2	
4、燃料动力费	0.1	
5、差旅费	0	
6、会议费	0	
7、合作协作研究与交流费	0	
8、出版/文献/信息传播/知识产权事务费	0.1	
9、其他支出	0	
（二）劳务费	0	

备注：培育项目不可开支劳务费类别，差旅费、会议费、合作协作研究与交流费等三类预算科目在不突破三类支出的预算总额的前提下可调剂使用。备注栏里对该类别支出科目作简单说明。

四、项目负责人所在科研机构意见

<p>所填内容属实，同意申报。</p> <p>所在科研机构负责人（签章）： 公 章 年 月 日</p>
--

五、所在二级学院（部门）意见

<p>评审 意见</p>	<p>学术委员会（签章）： 年 月 日</p>
------------------	----------------------------------

六、科研处意见

<p>同意立项</p> <p>签 章： 年 月 日</p>
--

台州市科学技术局

合 同 书

合同项目编号：1701KY36

项 目 名 称：LncRNA- HEIH和HULC在肝癌增殖、侵袭中机制研究

计 划 类 别：社会发展类一般项目

项目委托单位（甲方）：台州市科学技术局

项目承担单位（乙方）：恩泽医疗中心（集团）台州市中心医院

起 止 年 月：2017年01月01日至2019年12月31日

台州市科学技术局
二零一八年制

一、项目情况

项目名称	LncRNA- HEIH和HULC在肝癌增殖、侵袭中机制研究					
项目主管处室及项目主管					代码	
项目计划类别	社会发展类一般项目				代码	A33
项目行业分类	卫生				代码	Q85
项目学科领域	临床医学				代码	320
项目技术来源	自主开发				代码	1
技术创新方式	自主创新				代码	1
项目开始日期	2017/1/1		项目完成日期	2019/12/31		
经济效益目标	年增产值（万元）	年增利润（万元）	年增税金（万元）	年创汇（万美元）	年节汇（万美元）	
项目成果	论文数		专利		其中发明专利	
			申请数	授权数	申请数	授权数
	3				0	
人才引进和培养	研究生培养	1	中级及以下	3	副高级及以上	6
人才引进和培养	研究生培养	1	中级及以下	3	副高级及以上	6
人才引进和培养	研究生培养	1	中级及以下	3	副高级及以上	6

二、项目承担单位

承担单位	单位名称	台州市中心医院（台州学院附属医院）				
	单位简称	台州市中心医院	法人代码	79649060-6		
	所在地代码	01	单位类型	事业单位	代码	5
	详细地址	台州市椒江区东海大道999号	邮政编码	318000		
	申请人	金冲	E-MAIL	kjc6060@126.com		
	电话/传真	13757689065 / 0576-88526012	手机			
	开户银行	中国工商银行台州市分行	银行账号	120702129200097109		
合作单位	单位名称		法人代码	职责*		
	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
	6					
	7					
	8					
合作单位总数	0	承担单位数		参加单位数		
		0		0		

注：职责分为：0-承担，1-参加；合作单位总数：包含第一承担单位

三、项目负责人及项目组成员情况

项目负责人	姓 名	金 冲			身份证号码	332603197504050055		
	工作单位	台州市中心医院			法人代码	79649060-6		
	详细地址				邮政编码			
	移动电话				E-Mail	417906779@qq.com		
	学 历	大学	代码	3	学位	硕士	代码	2
	职 称	副高	代码	2	现从事专业	普通外科（肝胆外科）		

项目组成员	姓名	身份证号码	所在单位	职称	从事专业	在本项目中分工	年参加项目工作时间(月)
	李波	422801197801230634	台州市立医院	副主任医师	超声	数据统计分析	6
	张亚琼	422802197903053946	台州市中心医院	副主任技师	临床检验	标本检测	6
	莫经刚		台州市中心医院	主任医师	普通外科（肝胆外科）	临床标本采集	6
	江浩	331081198309236639	台州市中心医院	主治医师	普通外科（肝胆外科）	临床标本收集、数据分析	8
	潘学峰		台州市中心医院	主任医师	普通外科（肝胆外科）	临床标本收集	6
	林为东	330102197510071519	台州市中心医院	副主任医师	普通外科	临床标本收集	6
	冯一浮	330382199005192813	台州市中心医院	医师	普通外科（肝胆外科）	标本检测、数据分析	8

	汪列智			医师	普通外科（肝胆外科）	临床标本采集	6
	潘澄一	331081199008318512	台州市中心医院	医师	普通外科（肝胆外科）	临床标本收集、数据分析	8
	马磊	142625198808301519	台州市中心医院	医师	普通外科（肝胆外科）	标本检测	6

四、项目研发主要任务和关键技术经济指标

一、主要研究内容

体内试验中, 本研究通过收集30例首治的HCC(肝细胞癌) 和30例健康志愿者的外周血样本, 比较分析外周血单个核细胞Lnc RNA-HEIH和Lnc RNA-HULC表达水平与HCC(肝细胞癌) 发病风险的关系; 分析肝癌病人与健康人外周血单个核细胞Lnc RNA-HEIH和Lnc RNA-HULC表达与患者临床病理特征间的关系, 绘制研究对象工作特征曲线(ROC)。 体外细胞试验中, 荧光实时定量PCR分别检测出人类肝癌细胞系 MHCC97-H、HepG2及人类非肿瘤肝细胞系 HL-7702的Lnc RNA-HEIH和Lnc RNA-HULC表达量。

二、创新点

寻找一种或者几种有望成为早期诊断、判断肝癌预后的可行性指标, 验证本研究的肝癌目的LncRNA在肝癌早期诊断上有重要价值, 并与肝癌不同临床、病理等指标相关。为肝癌的治疗提供新的靶基因。 成功建立肝癌组织和外周血单个核细胞lncRNA检测前处理的标准化程序。 经查新以上内容未见报道。

三、主要技术、经济指标

1、寻找一种或者几种有望成为早期诊断、判断肝癌预后的可行性指标, 验证本研究的肝癌目的LncRNA在肝癌早期诊断上有重要价值, 并与肝癌不同临床、病理等指标相关。为肝癌的治疗提供新的靶基因。 2、成功建立肝癌组织和外周血单个核细胞lncRNA检测前处理的标准化程序。 3、本研究也为研究其它肿瘤lncRNA表达谱和临床应用研究提供新的技术平台和研究思路。 4、在国内外优秀期刊发表论文3-4篇, 其中SCI收录期刊1-2篇; 参加国内外专业学术交流1次以上。 5、培养研究生一名, 中级、初级职称人员晋升职称各1-2人。

五、项目成果提供形式

在国内外优秀期刊发表论文3-4篇，其中SCI收录期刊1-2篇；培养研究生一名

六、项目分年度（阶段）进度安排

起始年月	计划进度	投入经费(万元)
2017/1/1 至 2017/12/31	收集足够的病例资料并进行收集标本资料	1.00
2018/1/1 至 2018/6/30	荧光定量分析LNCRNAHULC和HEIH在肝癌组织和外周血单个核细胞中及癌旁组织中的相对含量	2.00
2018/7/1 至 2018/12/31	MTT法检测RNA HULC和HEIH水平与人肝癌细胞株细胞增殖侵袭之间的关联性	1.50
2019/1/1 至 2019/6/30	汇总调查数据，采用SPSS17.0进行统计学分析	0.50
2019/7/1 至 2019/12/31	发表论文2-3篇 结题 评奖 推广研究成果	1.00
		0.00
		0.00

七、项目经费来源

1、本项目开发总经费 3.00 万元，其中：甲方补助 2.00 万元，乙方自筹 0.00 万元，区、部门配套 0.00 万元。

2、甲方经费拨付计划：

拨款时间	合计	年 月	年 月	年 月	年 月
金额（万元）	2.00				

甲方首期拨款后，其余经费根据项目执行情况，分期拨给乙方。

3、乙方自筹和市县、部门配套经费到位计划：

	总金额 (万元)	年 月	年 月	年 月
乙方自筹	0.00			
区、部门配套	0.00			

八、项目经费支出预算

经费支出科目	预算经费总额(万元)	其中市科技局经费(万元)
1. 设备费	0.00	0.00
2. 材料费	2.49	1.54
3. 测试化验加工费	0.26	0.26
4. 燃料动力费	0.00	0.00
5. 差旅费	0.00	0.00
6. 会议费	0.00	0.00
7. 合作、协作研究与交流费	0.00	0.00
8. 出版/文献/信息传播/知识产权 事务费	0.10	0.10
9. 人员劳务费	0.00	0.00
10. 专家咨询费	0.00	0.00

11. 管理费	0.15	0.10
12. 验收检查费	0.00	0.00
13. 其他费用	0.00	0.00

九、需增添的仪器及用途

名称及规格型号	数量	单价	金额	资金来源	用途说明
无	0.0000	0.0000	0.0000	自筹或其他	

甲方（项目委托单位）：
（盖章）

单位负责人（签字）：

年 月 日

乙方（项目承担单位）：
（盖章）

项目（课题）负责人（签字）：

单位负责人（签字）：

财务负责人（签字）：

开户银行及账号：

年 月 日

丙方（项目归口管理职责部门）：
（盖章）

单位负责人（签字）：

单位地址：

联系电话：

年 月 日