



项目批准号	81772642
申请代码	H1617
归口管理部门	
依托单位代码	10002112B0077-2762



# 国家自然科学基金委员会 资助项目计划书

资助类别：面上项目

亚类说明：

附注说明：常规面上项目

项目名称：蛋白酶活化受体-2（PAR2）参与残胃癌发生的机制研究

直接费用：52万元 执行年限：2018.01-2021.12

负责人：田艳涛

通讯地址：北京市朝阳区潘家园南里17号

邮政编码：100021 电 话：01087787120

电子邮件：tyt67@163.com

依托单位：中国医学科学院肿瘤医院

联系人：杜君 电 话：87788223

填表日期：2017年09月02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. 国家自然科学基金基础科学中心项目：须选择“根据研究方案修改意见更改”，应当根据评审委员会和现场考察专家组的意见和建议，进一步完善并细化研究计划，作为评估和验收的依据。按下列提纲撰写：
  - (1) 五年拟开展的研究工作（包括主要研究方向、关键科学问题与研究内容）；
  - (2) 研究方案（包括骨干成员之间的分工及合作方式、学科交叉融合研究计划等）；
  - (3) 年度研究计划；
  - (4) 五年预期目标和可能取得的重大突破等；
  - (5) 研究队伍的组成情况。
5. 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	田艳涛	性 别	男	出生年月	1967年03月	民 族	汉族
	学 位	博士			职称	主任医师		
	电 话	01087787120		电子邮件	tyt67@163.com			
	传 真	010-67730386		个人网页				
	工 作 单 位	中国医学科学院肿瘤医院						
	所 在 院 系 所	胰胃外科						
依托单位信息	名 称	中国医学科学院肿瘤医院					代码	10002112B0077
	联 系 人	杜君		电子邮件	dujun@cicams.ac.cn			
	电 话	87788223		网站地址	http://www.cicams.ac.cn/			
合作单位信息	单 位 名 称							代 码
项目基本信息	项 目 名 称	蛋白酶活化受体-2 (PAR2) 参与残胃癌发生的机制研究						
	资 助 类 别	面上项目			亚 类 说 明			
	附 注 说 明	常规面上项目						
	申 请 代 码	H1617:消化系统肿瘤			H1602:肿瘤发生			
	基 地 类 别							
	执 行 年 限	2018.01-2021.12						
	直 接 费 用	52万元						



## 项目摘要

### 中文摘要(500字以内):

残胃癌切除率低,预后差,严重威胁患者生命健康。肠胃返流是残胃癌发生的重要影响因素,研究表明返流液中的胰蛋白酶是主要致病因素。胰蛋白酶是蛋白酶活化受体-2(PAR2)的特异性激活剂,参与炎症和多种肿瘤的发生发展过程。我们前期工作发现PAR2在残胃癌组织中高表达,因此我们推测PAR2与残胃癌的发生密切相关。目前动态监测残胃癌发生及获取不同阶段临床样本极其困难,亟需建立成熟、稳定的动物模型。小鼠是基因功能研究的最佳模式动物,但小鼠肠胃吻合需精细手术操作,建立难度大。本课题组率先建立了该小鼠模型,对研究返流相关残胃癌意义重大。本课题将依托该模型,通过不同手段阻断胰蛋白酶-PAR2信号通路的活化,研究该通路在残胃癌发生中的作用,同时引入PAR2特异性抑制剂GB88,探讨其预防残胃癌中的应用价值。本项目研究有望初步阐明返流诱导残胃癌发生的机制,将对残胃癌的发病机、预防及精准治疗具有重要意义。

**关键词:** 蛋白酶活化受体-2; 残胃癌; 肠胃返流

### Abstract(limited to 4000 words):

Gastric stump carcinoma (GSC) threatens the health of the patients due to low resectability rates and poor prognosis. Enterogastric reflux is an important factor contributing to the carcinogenesis in the gastric stump. Many experiments have implicated trypsin, the component of the reflux juice, in gastric carcinogenesis. Trypsin is a specific activator of protease activated receptor-2 (PAR2), which is widely expressed in the digestive tract mucosa and involved in inflammation regulation and the pathological process of tumor formation. In our previous work, we found that PAR2 was highly expressed in tissues of remnant stomach, so we hypothesized that PAR2 was closely related to the process of carcinogenesis in GSC. At present, it is extremely difficult to dynamically monitor the occurrence and development of GSC and to obtain clinical samples at different stages. The mouse is the optimum model animal for functional genomic studies, but it is difficult to establish the operation of gastrointestinal anastomosis in mice. Our group is the first to establish the mouse model, which is of great significance in the study of GSC associated with enterogastric reflux. On the basis of the mouse model, we will explore the role of trypsin/PAR2 signaling pathway in GSC by blocking trypsin/PAR2 signaling pathway in different means and using PAR2 specific inhibitor GB88, to explore its application in the prevention of GSC. This project is expected to initially clarify the mechanism of GSC induced by enterogastric reflux, which will be of great significance to the pathogenesis, prevention and precision therapy of GSC.

**Keywords:** Protease-activated receptor-2; Gastric stump carcinoma; Enterogastric reflux



## 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	田艳涛	1967. 03	男	主任医师	博士	中国医学科学院肿瘤医院	01087787120	130102196703291516	项目负责人	8			
2	马怡茗	1983. 04	女	助理研究员	博士	中国医学科学院肿瘤医院	01087787384	37068219830427042X	指导实验实施	8			
3	徐泉	1977. 08	男	主治医师	博士	中国医学科学院肿瘤医院	13683237345	330602197708010014	指导模型建立	8			
4	赵新华	1962. 07	男	主管技师	其他	中国医学科学院肿瘤医院	01087787384	110105196207202153	实验管理	8			
5	杜强	1979. 04	男	主治医师	硕士	中国医学科学院肿瘤医院	13681534655	110104197904152532	病理组织诊断	2			
6	王杰	1990. 07	女	博士生	硕士	中国医学科学院肿瘤医院	13021092033	131082199007075845	小鼠动物模型建立，基础实验操作，撰写论文	4			
7	李伟伟	1989. 04	男	博士生	硕士	中国医学科学院肿瘤医院	87787384	340822198904061110	动物实验实施，基础实验操作	4			
8	马福海	1990. 08	男	硕士生	学士	中国医学科学院肿瘤医院	15810848967	620524199008256030	小鼠管理，实验实施，撰写论文	4			
9	李洋	1992. 02	男	硕士生	学士	中国医学科学院肿瘤医院	15901587366	140106199202080631	小鼠管理，实验实施，撰写论文	4			
总人数		高级		中级		初级		博士后		博士生		硕士生	
9		1		4		0		0		2		2	



## 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：81772642

项目负责人：田艳涛

金额单位：万元

序号	科目名称	金额
1	一、项目直接费用	52.0000
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	41.8800
7	3、测试化验加工费	0.0000
8	4、燃料动力费	0.0000
9	5、差旅/会议/国际合作与交流费	2.0000
10	6、出版/文献/信息传播/知识产权事务费	3.0000
11	7、劳务费	5.1200
12	8、专家咨询费	0.00
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≥10万元的设备费等内容进行详细说明，可根据需要另加附页。）

### 一、材料费：共计 41.88 万元

#### 1 生化与分子生物学试剂：合计 1.70 万元

- a. 琼脂糖：西班牙进口产品，300 元/瓶×5 瓶（用于核酸电泳）
- d. 抗体： beta-actin（Sigma）： 3400 元/支×1 支  
PAR2（Santa Cruz）： 2200 元/支×1 支  
tryptase（abcam）： 4400 元/支×1 支  
anti-mouse IgG， HRP-linked antibody（CST）： 2000 元/×1 支  
anti-rabbit IgG， HRP-linked antibody（CST）： 2000 元/×1 支  
anti-goat IgG， HRP-linked antibody（Santa Cruz）： 1500 元/支×1 支

#### 2 DNA、RNA 提取纯化试剂及试剂盒：合计 2.60 万元

- a. RNAlater： 4000 元/瓶×3 瓶
- b. RNA 提取试剂（Trizol）： 1200 元/100ml×5 瓶
- c. 基因组 DNA 纯化试剂盒： 300 元/盒×3 盒
- d. 质粒小提试剂盒(Axygen)： 120 元/盒×10 个
- e. 柱式 DNA 胶回收试剂盒（Axygen）： 300 元/Kit×3Kit
- f. DEPC-treated water（amresco） 1000 元/1000ml/瓶×5 瓶

#### 3 逆转录试剂盒：合计 1.935 万元

- a. RNA 纯化试剂盒（thermo fisher）： 850 元/kit×5 个 kit
- b. mRNA 逆转录试剂盒（Thermo science）： 8700 元/kit×1 个 kit
- c. microRNA 逆转录试剂盒（Takara）： 6400 元/kit×1 个 kit

#### 4 Real-time PCR 试剂及耗材：合计 2.60 万元

- a. SYBR Premix Ex Taq II（2×）（Takara）： 500 元/支/板×20 板
- b. Real-time PCR 用 8 联排管/盖（Bio-Rad）： 200 元/板×40 板
- c. miRNA real time PCR 引物： 400 元/200ul/基因×20 个 miRNA





## 5 细胞转染相关试剂：合计 2.744 万元

- a. lipofectamine 2000: 2775 元/0.75ml/支 1 支
- b. G418 (life science): 3085 元/5g/支×1 支
- c. 嘌呤霉素: 3095 元/10ml×1 支
- d. siRNA (苏州吉玛): 1600 元/基因×5 个基因
- e. Gab2/MET 等基因的过表达质粒: 5000 元/基因×1 个基因
- f. miRNA mimic (广州锐博): 600 元/5nmol/支/基因×5 个基因
- g. miRNA inhibitor (广州锐博): 497 元/5nmol/支/基因×5 个基因

## 6 细胞培养液及相关试剂：合计 3.272 万元

- a. 进口胎牛血清 6000 元/瓶 (GEMINI), 约需 2 瓶。
- b. 细胞培养液和 PBS, 60 元/500ml/瓶, 约需 50 瓶。
- c. 胰酶和青链霉素: 200 元/100ml 约需 20 瓶。
- d. B-27 Serum-Free Supplement (thermo fisher) 1303 元/10ml/支×5 支
- e. 体外成球用甲基纤维素 (sigma) 1600 元/250g/瓶×1 瓶
- f. 细胞冻存用 DMSO (sigma) 1580 元/50ml/瓶×2 瓶
- g. enzyme-free 细胞消化液 (thermo fisher) 489 元/100ml/瓶×5 瓶

## 7 蛋白质提取及 WB 相关试剂：1.80 万元

- a. 丽春红膜可逆染色液 (普利莱): 150 元/100ml/瓶×4 瓶
- b. RIPA 裂解液: 300 元/100ml/瓶×5 瓶
- c. 蛋白酶抑制剂 (Roche, 在 CO-IP 实验中用量大): 3100 元/盒×1 盒
- d. ECL 化学发光显色试剂盒 (Pierce): 564 元/50ml×5 盒
- e. NC 膜 (Millipore): 2000 元/30 米/卷×1 卷
- f. watman 滤纸: 600 元/盒×3 盒
- g. 蛋白 marker (Bio-Rad) 950 元/0.5ml/支×2 支
- h. 40% 聚丙烯酰胺 (上海生工) 250 元/500ml/瓶×3 瓶
- i. 过硫酸铵 (sigma) 940 元/100g/瓶×2 瓶
- j. BCA 蛋白定量试剂盒 (普利莱): 330 元/500 次反应/kit×5 个 kit

## 8 免疫组化相关试剂：合计 1.71 万元

- a. 超敏免疫组化试剂盒 (Dako): 1200 元/kit/50 次×5 个 kit



- b. 抗体稀释液（中杉金桥）150 元/20ml/瓶×5 瓶
- c. 兔鼠通用型二抗（中杉金桥）：3800 元/55ml/瓶×2 瓶
- d. DAB 显色液（中杉金桥）：90 元/1ml/kit×10 个 kit
- e. 苏木素染液（中杉金桥）150 元/100ml/瓶×10 瓶
- f. 中心树胶（中杉金桥）：70 元/100ml/瓶×5 瓶

#### 9 实验用小鼠的购买和饲养：合计 16.15 万元

a. C57 小鼠购于北京维通利华实验动物技术有限公司，18-20g，100 元/只×90 只。PAR-2 敲降小鼠 10000 元每对，购买 15 对繁殖，共需 90 只。

b. 动物饲养费：2 元/5 只/笼/天，合计 2520 元

5 只/笼，平均实验周期为 5 周，180 只分成 36 笼，2 元/5 只/笼/天×36 笼×5×7 天

#### 10 实验基本耗材：合计 4.869 万元

用于购置离心管（国产），吸头（Axygen），PCR 管（Axygen），一次性 0.22μm 针头滤器，手套，移液管，培养瓶，培养皿，孔板，冻存管等。

0.5ml 离心管（国产）：1000 元/10000 个/箱×1 箱

RNase free 10 μl 吸头（Axygen）：30 元/96 个/盒×20 盒

RNase free 200 μl 吸头（Axygen）：30 元/96 个/盒×20 盒

RNase free 1000 μl 吸头（Axygen）：40 元/96 个/盒×22 盒

RNase free 1.5ml 离心管（Axygen）：100 元/500 个/盒×5 盒

0.2ml PCR 管（Axygen）：250 元/1000 个/盒×4 盒

一次性针头滤器，0.22 μm (Sartorius)：250 元/50 个/包×4 包

一次性橡胶检查手套：600 元/1000 对/20 盒/箱×2 箱

一次性塑料薄膜手套：20 元/100 只/包×45 包

白色吸头（sorenson）：0.1-10ul，5000 个/箱，600 元/箱×2 箱

黄色吸头（sorenson）：2-200ul，5000 个/箱，600 元/箱×2 箱

蓝色吸头（sorenson）：100-1000ul，5000 个/箱，800 元/箱×2 箱

载玻片（国产）：50 片/盒，30 元/盒×100 盒

BD Falcon 5ml 移液管，600 元/箱，约需 3 箱

BD Falcon 10ml 移液管，600 元/箱，约需 5 箱

Corning 25cm<sup>2</sup> 培养瓶，100 个/箱、900 元/箱，约需 2 箱



Epplondorf 75cm2 培养瓶, 80 个/箱、900 元/箱, 约需 3 箱

TPP 60mm 培养皿, 500 个/箱, 900 元/箱, 约需 2 箱

BD Falcon 100mm 培养皿, 200 个/箱, 600 元/箱, 约需 5 箱

BD Falcon 50ml 离心管, 500 个/箱, 845 元/箱, 约需 5 箱

BD Falcon 15ml 离心管, 500 个/箱, 845 元/箱, 约需 5 箱

Corning 6 孔板, 50 个/箱, 550 元/箱, 约需 5 箱

NEST 24 孔板, 50 个/箱, 550 元/箱, 约需 3 箱

NEST 96 孔板, 50 个/箱, 620 元/箱, 约需 3 箱

1.5ml 冻存管 (国产, 存放临床样本及动物样本): 200 元/500 个/包×10 包

细胞刮刀 (TPP) 150 个/箱, 3200 元/箱, 约需 1 箱

#### **11 定量 PCR 仪检测: 50 元/次×200 次 合计 1.00 万元**

实时定量荧光 PCR 仪为本单位中心实验室仪器, 由于荧光光源存在正常损耗, 每次使用需缴纳 50 元使用费, 由于本项目中有大量样本需要验证, 5 年预计使用 200 次, 每月平均 4 次。

#### **12 免疫组化染色结果扫描: 100 元/次×150 张片子 合计 1.50 万元**

病理工作站为本单位中心实验室仪器, 扫描一张病理切片使用需缴纳 100 元使用费, 由于有大量样本需要验证, 5 年预计扫描切片 150 张。

### **二、差旅/会议/国际合作与交流费: 合计 2.00 万元**

### **三、出版/文献/信息传播/知识产权事务费: 合计 3.00 万元**

**1** 国际 SCI 收录期刊论文发表: 每篇版面费约 8000 元, 发表 3 篇论文, 共 24000 元

**2** 中文核心期刊论文发表: 每篇版面费月 3000 元, 发表 2 篇论文, 共 6000 元

### **四、劳务费: 合计 5.12 万元**

#### **在校研究生的生活补助**

博士研究生: 1000 元/人/月×32 月 共 32000 元

无工资收入博士研究生 2 人, 在课题中主要承担动物实验模型的建立, RNA、蛋白质的提取及小鼠标本中相关基因的检测 (免疫组化及荧光定量 PCR) 等机制研究及文章撰写等工作, 每人每年的全时工作时间为 4 个月, 课题时间为 4 年, 共 32 个月, 按每月 1000 元发放。



硕士研究生：600 元/人/月×32 月 共 19200 元

无工资收入硕士研究生 2 人，负责标本的收取、管理并协助 RNA、蛋白质提取及文献检索、文章撰写等工作。每人每年的全时工作时间为 4 个月，课题时间为 4 年，共 32 个月，按每月 600 元发放。

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：81772642），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>						