

四川大学华西医院

学科卓越发展 1·3·5 工程项目任务书

(交叉学科创新项目)

项目名称：基于基因工程 ctDNA 检测的体液活检应用于胰腺癌早期诊断、预后评价及综合治疗的基础与临床研究

申报类别：☐ 重大项目 ☐ 重点项目 ☒ 一般项目

申报层级：☐ 全国第一 ☒ 全国前三 ☐ 全国前五

申报科室：胰腺外科

项目负责人：李昂

批准经费：150 (万元)

项目起止年限：2019 年 3 月—2022 年 3 月

联系电话：18980606692

四川大学华西医院
“双一流”建设办制

一、项目基本信息

项目基本信息	项目名称	基于基因工程 ctDNA 检测的体液活检在胰腺癌早期诊断及预后评价的基础与临床研究					
	申报类别	<input type="checkbox"/> 重大项目 <input type="checkbox"/> 重点项目 <input checked="" type="checkbox"/> 一般项目					
	申报层级	<input type="checkbox"/> 全国第一 <input checked="" type="checkbox"/> 全国前三 <input type="checkbox"/> 全国前五					
	申报科室	胰腺外科					
	起止时间	2019 年 3 月—2022 年 3 月					
项目负责人	姓名	李昂	科室	胰腺外科	任职	副教授	
项目研究小组成员（人员总数不少于 10 人，跨学科高级职称人员占 20%以上）							
姓名	单位	科室	学历	职称	项目分工	每年工作时间(月)	签字
魏瑗琳	四川大学	胰腺外科/移植免疫研究室	博士	博士后（助理研究员）	项目实施设计及指导协调，样本数据质控	6	
张文庚	四川大学华西医院	精准医学中心	博士	研究员	样本测序流程总体设计和指导	2	
谢丹	四川大学华西医院	精准医学中心	博士	研究员	数据分析指导	2	
王成世	四川大学	移植免疫研究室	博士	博士后（助理研究员）	测序实验及数据分析	6	
曹丹	四川大学华西医院	肿瘤科	博士	副教授	肿瘤治疗临床方案制定	2	
陈拥华	四川大学华西医院	胰腺外科	博士	助理研究员	临床工作实施协调	4	
郭子恒	四川大学华西医院	胰腺外科	博士	讲师	数据分析及处理	4	
黄子星	四川大学华西医院	放射科	博士	主治医师	影像学数据建模和	4	

					数据分析		
何度	四川 大学 华西医院	病理科	硕士	主治医师	病 理 结 果 质 控 及 分 析	4	
李懋	四川 大学 华西医院	胰腺外科	硕士	博士在读	临 床 样 本 采 集	8	
李柯宇	四川 大学 华 西 临 床 医学院	胰腺外科	硕士	博士在读	临 床 数 据 统 计 分 析	8	
杜冰清	四川 大学 华 西 临 床 医学院	胰腺外科	硕士	博士在读	临 床 样 本 采 集	8	
陈阳	四川 大学 华 西 临 床 医学院	胰腺外科	硕士	博士在读	临 床 样 本 采 集	8	
杨都江	四川 大学 华 西 临 床 医学院	胰腺外科	学士	硕士在读	患 者 数 据 采 集 及 随 访	8	
叶俊	四川 大学 华 西 临 床 医学院	胰腺外科	学士	硕士在读	患 者 数 据 采 集 及 随 访	8	
总人数		高级	中级	初级	博士后	博士	硕士
16		4	4	0	2	4	2

二、项目建设方案及具体内容

1. 胰腺癌患者血液中ctDNA的基因突变情况与胰腺癌病理组织中的情况一致性

1.1患者纳入与排除标准

纳入标准：于四川大学胰腺外科就诊的、可行根治性或姑息性手术治疗的胰腺癌患者。

排除标准：胰腺肿瘤非胰腺原发灶或包括胰腺癌等两种肿瘤同时并存的患者，非胰腺癌恶性肿瘤病史的患者。患者均留有术中冰冻及术后明确的病理诊断，并行病理分级与疾病分期。

1.2目标基因的选择

胰腺癌中存在许多基因突变。在这一部分实验中我们将着重于以下基因为研究目标：我们选择KRAS2, CDKN2A, TP53, TGFB2, SMAD4, PCDH15, MLL3, SPARC, hENT1, and DPC4, USP9X等数十种胰腺癌和

消化道恶性肿瘤突变率较高的基因（允许情况下行全基因组测序）。这些基因在胰腺癌基因突变中均有涉及（表1）。这些通路相关的基因活性和表达的改变和肿瘤生长侵袭都有直接的关系。对于胰腺癌患者，这些基因将作为检测ctDNA的重点目标基因。

表1胰腺癌致病主要突变基因（部分）

Gene	nucleotide (genomic)	nucleotide (cDNA)	amino acid	mutaton type	expression
KRAS2	g.chr12:25271542A>C (homozygous)	c.183A>C	p.Q61H	Missense	Exp
	g.chr12:25289551G>A	c.35G>A	p.G12D	Missense	Exp
	g.chr12:25289551G>T	c.35G>T	p.G12V	Missense	Exp
	g.chr12:25289552G>C	c.34G>C	p.G12R	Missense	Exp
CDKN2A	g.chr9:21961171C>G	c.187C>G	p.L63V	Missense	Exp
	g.chr9:21961065A>C (homozygous)	c.293A>C	p.H98P	Missense	Exp
TP53	g.chr17:7514721T>C (homozygous)	c.1031T>C	p.L344P	Missense	Exp
	g.chr17:7517819C>T (homozygous)	c.844C>T	p.R282W	Missense	Exp
	g.chr17:7517839G>A (homozygous)	c.824G>A	p.C275Y	Missense	Exp
	g.chr17:7517866G>T (homozygous)	c.797G>T	p.G266V	Missense	Exp
	g.chr17:7518236T>C (homozygous)	c.770T>C	p.L257P	Missense	Exp
	g.chr17:7518242T>A (homozygous)	c.764T>A	p.L255N	Missense	Exp
	g.chr17:7518264C>T (homozygous)	c.742C>T	p.R248W	Missense	Exp
	g.chr17:7518284C>G (homozygous)	c.722C>T	p.S241F	Missense	Exp
	g.chr17:7518305A>G (homozygous)	c.701A>G	p.Y234C	Missense	Exp
	g.chr17:7518924T>G (homozygous)	c.650T>G	p.V217G	Missense	Exp
	g.chr17:7518951A>T (homozygous)	c.623A>T	p.D208V	Missense	Exp
	g.chr17:7518972delT (homozygous)	c.602delT	frameshift	INDEL	Exp
	g.chr17:7519119A>G (homozygous)	c.536A>G	p.H179R	Missense	Exp
	g.chr17:7519131G>A (homozygous)	c.524G>A	p.R175H	Missense	Exp
	g.chr17:7519165delA (homozygous)	c.490delA	frameshift	INDEL	Exp
	g.chr17:7519192A>C (homozygous)	c.463A>C	p.T155P	Missense	Exp
	g.chr17:7520037_7520027delGGTCAG	c.375_IVS3+10delGGTCAGTTGCC	frameshift	INDEL	Exp
	g.chr17:7520053A>G (homozygous)	c.359A>G	p.K120R	Missense	Exp
TGFR2	g.chr3:30688745dupC	c.1066dupC	frameshift	INDEL	Exp
	g.chr3:30704933_30704943delGTCGAA	c.1450_1460delGTCGAAAGCAT	frameshift	INDEL	Exp
SMAD4	g.chr3:32688143_32688144insA (homozygous)	c.464_465insA	frameshift	INDEL	Exp
	g.chr18:46829088A>C (homozygous)	c.284A>C	p.Y95S	Missense	Exp
	g.chr18:46829118_46829121delACAA	c.314_317delACAA	frameshift	INDEL	Exp
	g.chr18:46829170dupA (homozygous)	c.366dupA	frameshift	INDEL	Exp
	g.chr18:46838724delG (homozygous)	c.804delG	frameshift	INDEL	Exp
	g.chr18:46845922T>C (homozygous)	c.1087T>C	p.C363R	Missense	Exp
	g.chr18:46845931C>T (homozygous)	c.1096C>T	p.Q366X	Nonsense	Exp
	g.chr18:46857030C>T (homozygous)	c.1333C>T	p.R445X	Nonsense	Exp
	g.chr18:46858684dupT (homozygous)	c.1508dupT	frameshift	INDEL	Exp
PCDH15	g.chr10:55808661C>T	c.205C>T	p.P69S	Missense	N.L.
	g.chr10:55666676G>T	c.898G>T	p.V300F	Missense	N.L.
	g.chr10:55666642G>A	c.932G>A	p.R311Q	Missense	N.L.
	g.chr10:55391604C>A	c.2923C>A	p.P975T	Missense	N.L.
MLL3	g.chr7:151329239C>T	c.4441C>T	p.R1481X	Nonsense	Exp
	g.chr7:151316674G>T	c.5919G>T	p.V1973V	Synonymous	Exp
	g.chr7:151316588G>A	c.6005G>A	p.G2002E	Missense	Exp
	g.chr7:151316523G>C	c.6070G>C	p.D2024H	Missense	Exp
	g.chr7:151315992G>C	c.6601G>C	p.D2201H	Missense	Exp
	g.chr7:151283589G>A (homozygous)	c.13071G>A	p.W4357X	Nonsense	Exp
	g.chr7:151283363G>A	c.13297G>A	p.A4433T	Missense	Exp
N.L.: not informative					
INDEL: insertion or deletion					
EXP: expressed in the tumor					

1.3血ctDNA及胰腺癌病理组织的搜集与检测

患者术前搜集其血液标本及术中搜集组织样本分别行DNA分离萃取。健康人群和患者标本送至实验室后由实验室与课题无关专业工作人员进行实验检测。

1.3.1血液样本处理

采集胰腺癌患者和健康对照组的的全血10ml装入EDTA管中。室温保存采集的血液并在血液采集后的1h内进行实验操作，尽可能立即操作避免血液凝固和EDTA高盐抗凝剂对血液细胞的影响。取收集的血液10ml，室温下以1600xg离心10分钟，吸取上层清液约5-6ml装入15ml管中，上清液于4℃、16000xg旋转15分钟后吸取上清装入2ml单位管中，上清液血浆可以用来DNA萃取或者-80℃冻存。两步骤的离心是去除血

细胞和血小板的标准方法。DNA仍遗留在提纯后的上清液中。且在-80℃的情况下，DNA仍可重复测量时使用。

1.3.2血游离DNA萃取

我们常规使用DNA提取试剂盒并遵循其说明书操作：

1. 2ml血浆样本中加入蛋白酶K（10mg/ml，Invitrogen）和 ACL buffer（Qiagen 19075）释放DNA。裂解血浆释放cfDNA，因cfDNA是由坏死、凋亡或激活的外泌体释放，周围被微粒膜型包裹，仍需被裂解掉才能释放裸DNA。
- 2.加入含有丙醇的ACB缓冲液进行裂解
- 3.将DNA置入QIAamp盒中
- 4.用含有乙醇的ACW缓冲液冲洗盒子来移除剩余的蛋白和盐分
- 5.用水洗涤DNA，总量要超过30ng。
- 6.提取中层白细胞的gDNA检测作为对照，以区分胚系突变和体细胞突变。

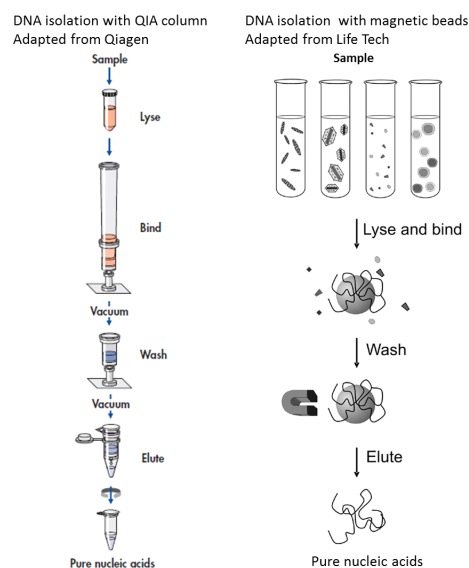


图2 DNA分离模式图（改良自试剂盒说明书）

因此，我们计划使用已经成熟建立的DNA分离技术作为起点。然而从长远考虑，我们需要从以下两方面提高DNA提取效率：（1）目标基因的数量，即从获得的有限血液中丢失最少的DNA；（2）我们也可使用磁珠法作为备选方案提高DNA提取效率。

磁珠法提取DNA

为了提高 DNA 提取的数量与质量，我们使用磁珠法提取 DNA。

2ml 样本中加入 1ml 蛋白酶 K（10mg/ml，Invitrogen）和 3ml AL buffer（Qiagen 19075）在 50℃中消化 2-4 小时。消化后，加入 3ml100%IPA 和 150ul SSBs（Promega Magnesil KF - MD1471）。溶解过程在室温

孵化 10min 使 DNA 沉淀且绑定在 SSBs 表面。加入 10ul 载体 RNA (1ug/ul) 通过共沉淀促进 DNA 绑定，后在室温孵化 5min。

SSBs 和 DNA 复合物通过磁倾析分离和纯化剩余血清。在磁场范围内，小心吸除上层血清，切勿影响分离的 SSBs。移除上清后，操作平台移出磁场，加入 800ul AW1 缓冲液 (Qiagen19081)，缓慢搅匀并转移至 1.5ml 微量离心管中。这一过程重复 2 此即可纯化 DNA 绑定 SSBs 复合物。置入 70℃ 加热器中 10min 使残余上清液蒸发。

于 SSBs 中加入 45ul 水和 5ul M-Dilution 缓冲液 (ZymoD5001-2) 为盐转化做准备。溶液在 37℃ 下孵化 15min，然后加入 100ul CT 转化试剂盒 (Zymo D5001-1, 按照说明书加入 750ul 水和 250ul M-Dilution 缓冲液)，溶液暗箱中孵化 12-14h。样本在冰上冷却 10min。 然后加入 400ul M-绑定缓冲液 (Zymo D5001-3) 室温孵化 10min。接下来加入 5ul 载体 RNA (Qiagen1017647) 室温下静置 5min。接下来将管子放入磁场中，当 SSB 贴附于管壁后移除剩余的水。加入 200ul M-脱磺化缓冲液 (ZymoD5001-5) 并室温孵化 13min。孵化结束后立即加入 5ul 载体 RNA 样本继续孵化 3min。孵化结束后，将试管放入磁场中，同样方式吸除残余水分。加入 M-水洗缓冲液水洗，并放入磁场去除水分，操作重复 2 次。结束后将试管自旋向下让 SSB 移至管底并且再次放入磁场移除剩余水分。然后将试管置于 90℃ 加热板中让缓冲液中的乙醇蒸发。等待 SSB 晾干后，加入 62ul M-洗涤缓冲液 (D5001-6) 在 90℃ 下孵化 10min。磁场下将液体转移至一个新的试管中，加 50ul 洗涤液于 SSB 中 90℃ 孵化 10min，将液体转移至先前的新试管中。由于液体蒸发和被 SSB 吸收，最终的产量可以到达~100ul。

1.3.3 DNA 浓度测定及质量检测

分离出的 DNA 浓度及质量检测通过分光光度计、凝胶电泳分析，并用标准 DNA 标志物比对实施。用 Nanodrop2000 测 OD 值及浓度记录数据，提取的 DNA 总浓度 >50ng/ul 则视为满足实验浓度需求，所提取的 DNA 置于 -20℃ 保存备用。A260/A280 的理想比值为 1.6-1.8，大于 1.8 时为 RNA 污染，可用 RNA 酶进行处理，小于 1.6 时为蛋白污染。A260/A230 比值应在 1.8-2.0 之间，小于 1.8 为盐浓度较高。我们使用 Qubit2.0 荧光定量仪和 Qubit dsDNA BR 分析试剂盒精确定量 DNA 浓度。为了检测所提取的 DNA 的质量，对所提取 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳成像，主带清晰副带少则表明提取 DNA 质量较高，污染少。

1.3.4 全外显子测序及 ctDNA 俘获与分析：

将血浆中提取出的游离 DNA 上机测序，与 DNA 数据库中的序列进行比对确定 ctDNA，并对其丰度进行定量。

① 采用 DNA 建库试剂盒进行 DNA 建库，用 Illumina NS500 高通量测序平台进行测序。平均测序深度在第一批检测过程中我们进行实验摸索，尽可能找出最适合的有效平均测序深度，防止检测结果错失和应用的浪费。我们将对同一血样本 ctDNA 检测 panel 进行平均深度 2000×, 5000×, 10000× 的检测；同一组织样本全

外显子检测进行平均深度200×, 300×, 500×的检测。对检测结果进行分析一致性, 找出最适宜的检测平均深度, 用于后续实验。

②对测序原始数据预处理: Fastq 格式文件生成, 序列比对, 冗余片段去重;

③自动化分析流程: 基本QC信息生成, 样本配对准确性检查, 样本交叉污染检查;

④ctDNA变异检测和定量分析: 体细胞点突变、短插入/缺失片段, 突变丰度=变异拷贝数/ml; 胚系细胞点突变、短插入/缺失片段, 突变丰度=变异拷贝数/ml; 拷贝数变异; 基因融合。

2) 手术干预前后外周血ctDNA总量变化及与CA199诊断敏感度的差异

2.1纳入对象

可行根治性手术或姑息性手术的胰腺癌患者。胰腺癌患者根据临床血清学指标和影像学上腹部增强CT和MRI可初步诊断。术中取胰腺病理组织明确诊断。

2.2血ctDNA和CA199检测

患者于术前及术后第三天抽取清晨空腹血5ml各两管, 共计四管血液标本。选择应用DNA提取试剂盒提取DNA并测量其浓度(如前1.3.4所述)。CA199检测送至检验科常规定量检测血CA199。

2.3ctDNA诊断阈值和诊断敏感度与特异度

根据胰腺癌患者术前的ctDNA及CA199 水平且通过ROC曲线计算ctDNA的诊断阈值, 诊断敏感度和特异度, 对比ctDNA和CA199的诊断效率。用Youden指数(=敏感度+特异度-1)来绘制, 敏感度和特异度的最高值作为诊断阈值。ctDNA值明显高于或等于阈值的即为阳性诊断, 小于阈值的为阴性诊断。

2.4ctDNA用于评估治疗效果

通过比较术前和术后胰腺癌患者血浆ctDNA的数值变化差异, 观察ctDNA用于评估手术治疗效果的可能性。

3) 胰腺癌疾病不同分期与ctDNA总量的关系

3.1纳入对象

可行根治性手术或姑息性手术的胰腺癌患者。胰腺癌患者根据临床血清学指标和影像学上腹部增强CT和MRI可初步诊断。术中取胰腺病理组织明确诊断。根据术后淋巴结病理结果及术中探查转移情况, 对患者进行全面的TNM分期。具体分期系统见表2。

表2TNM及病理分期系统（AJCC第7版）

T-原发肿瘤	M-远处转移
Tx 原发肿瘤无法评估 T0 无原发肿瘤的证据 Tis 原位癌(包括 PanIN-3) T1 肿瘤局限于胰腺内,最大径≤2 cm T2 肿瘤局限于胰腺内,最大径>2 cm T3 肿瘤浸润至胰腺外 T4 肿瘤累及腹腔干或肠系膜上动脉	M0 无远处转移 M1 远处转移
N-区域淋巴结	分期
Nx 区域淋巴结无法评估	0 期 Tis N0 M0
N0 无区域淋巴结转移	IA期 T1 N0 M0
N1 有区域淋巴结转移	IB期 T2 N0 M0
	IIA期 T3 N0 M0
	IIB期 T1,T2,T3 N1 M0
	III期 T4 任何N M0
	IV期任何T 任何N M1

3.2 ctDNA总量检测及基因测序

通过DNA试剂盒提取患者术前空腹血中的肿瘤DNA, 上机测序后测定ctDNA总量（方法如前述1.3.4）。

3.3ctDNA总量及阳性突变基因与胰腺癌高危指标、临床资料、疾病分期之间的关系

记录搜集胰腺癌患者的年龄（>60岁或<60岁）、性别（男性或女性）、肿瘤大小（>3cm或<3cm）、肿瘤位置（胰头、胰体、胰尾）、病理分化程度（高分化、中分化、低分化）、肿瘤分期、淋巴结转移（有、无）等临床信息。连续性变量采用SPSS软件中Mann-Whiney U检验，非连续性变量采用卡方检验。P<0.05即为统计学差异。该部分实验结果可以说明ctDNA总量与疾病恶性程度（早期、晚期）之间的关系，ctDNA联合宏观指标作为预测疾病发生风险和恶性程度的标志物的可行性。

4）ctDNA与胰腺癌无病生存期及总生存时间的关系。

4.1纳入对象

可行根治性手术或姑息性手术的胰腺癌患者。胰腺癌患者根据临床血清学指标和影像学上腹部增强CT和MRI可初步诊断。术中取胰腺病理组织明确诊断。

4.2 随访

所有胰腺癌患者行手术切除后行定期动态随访直至出现**临床复发转移阳性表征**和**患者死亡**。患者

术后至发现阳性复发转移的时间为**无病生存期**。患者术后至胰腺癌疾病相关性死亡的时间为**总生存期**。具体随访时间点为术后1周、每三个月一次至两年，如患者出现死亡，详细记录死亡时间及情况。术后随访中ctDNA阳性水平发生时间和临床阳性肿瘤复发转移及影像学检查发生时间差即为ctDNA诊断获取**肿瘤复发转移提前期，即ctDNA诊断获益时间**。

4.3ctDNA和CA199检测

ctDNA提取和总量检测、CA199检测技术同前所述（1.3.4和2.2）。术前和术后每个随访时间点均采集血液两管分别用于ctDNA检测和CA199检测。

4.4ctDNA用于预测疾病生存的预测效能

运用SPSS软件中的Kaplan-Meier生存分析，术前ctDNA阳性诊断用于评估胰腺癌患者总生存期和无病生存期长短，得出ctDNA用于评估疾病预后的标志物的可行性。

4.5比较ctDNA、CA199、影像学阳性诊断预测疾病预后的差异

记录每个纳入的患者每个随访时间点的ctDNA、CA199和影像学阳性诊断结果出现时间，即无病生存期的时间，比较各手段用于阳性复发评估的差异和优劣性。

5. 论证在ctDNA的体液活检具有与传统组织病理活检同等的对胰腺癌的确诊效力的基础上，用非创伤性体液活检代替穿刺活检的临床试验研究

5.1患者纳入排除标准

纳入标准：于四川大学胰腺外科就诊的、无法行根治性手术的进展期胰腺癌患者，包含局部晚期无法切除和转移性无法切除的患者。胰腺癌的初步诊断依赖患者的症状、影像学检查结果（CT、PET-CT）及传统的血肿瘤标记物检查结果。体力状况ECOG评分 ≤ 2 分。主要器官状态正常：肝脏、肾脏、血液造血系统功能正常。

排除标准：胰腺肿瘤非胰腺原发灶或包括胰腺癌等两种肿瘤同时并存的患者，非胰腺癌恶性肿瘤病史的患者。患者有化疗史。

5.2纳入患者分组及试验流程

5.2.1分组

按照纳入标准进入试验的患者随机分入血ctDNA检测无创组（后简称无创组）和CT引导下肿瘤穿刺组（后简称穿刺组）。随机分组采用随机数字表的方法。

5.2.2试验流程

无创组在入组后抽取清晨空腹血10ml，按照之前的方式提取DNA并用panel模块进行基因检测。穿刺组

在入组后在CT引导下从后腰部进行肿瘤穿刺，穿刺组织行病理学分析（金标准）。

两组患者在操作后均进行化疗，化疗方案为：详细记录药物干预开始时间、具体药物选择，化疗疗程。化疗方式采用FOLFIRINOX 方案（oxaliplatin奥沙利铂, irinotecan伊立替康, fluorouracil氟尿嘧啶, and leucovorin亚叶酸）。

5.2.3 结果及效果评估

5.2.3.1 实体肿瘤疗效评估标准

疗效评估才用《实体肿瘤疗效评估标准》(The Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, RECIST)1.1版本。完全缓解（complete response, CR）是所有靶病灶消失，全部病理淋巴结（包括靶淋巴结和非靶淋巴结）短直径必须减少至 10mm 以下。部分缓解（partial response, PR）是指靶病灶直径之和比基线水平减少至少 30%。疾病进展（progressive disease, PD）是指以整个实验研究过程中所有测量的靶病灶直径之和的最小值为参考，直径和相对增加至少 20%；除此之外必须满足直径和的绝对值增加至少 5mm，出现一个或多个新病灶也视为疾病进展。疾病稳定（stable disease, SD）是指靶病灶减小的程度没达到 PR，增加的程度也没达到 PD 水平，介于两者之间，研究时可以直径之和的最小值作为参考。每个治疗周期前后采集患者血液进行分析。

5.2.3.2 药物不良反应评估

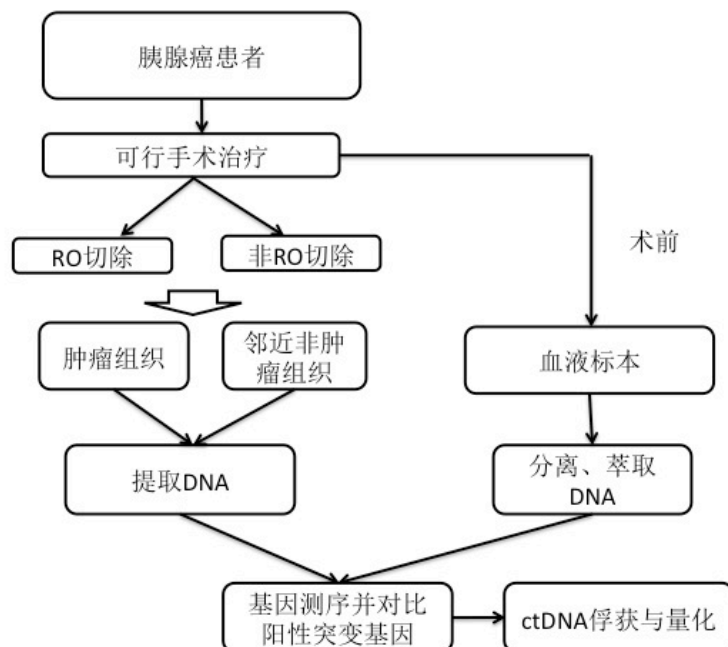
患者化疗过程中记录药物毒性反应不良事件，并根据《国际肿瘤化疗药物不良反应评价系统》（international evaluation system for adverse enents of chemotherapeutic drugs in cancer treatment）—通用不良反应术语标准 4.0 版（common terminology criteria adverse events, CTCAE）对化疗药物的不良反应进行评价分级。记录包括腹泻、恶心呕吐、口腔黏膜炎、中性粒细胞减少症、血小板减少症、面肌痉挛等不良反应症状。若存在超过 30%的 3-5 级非血液系统性副作用时，考虑暂停化疗治疗。详细记录患者出现不良反应的时间、症状、持续时间，处理手段及效果。

5.2.3.3预后效果评估

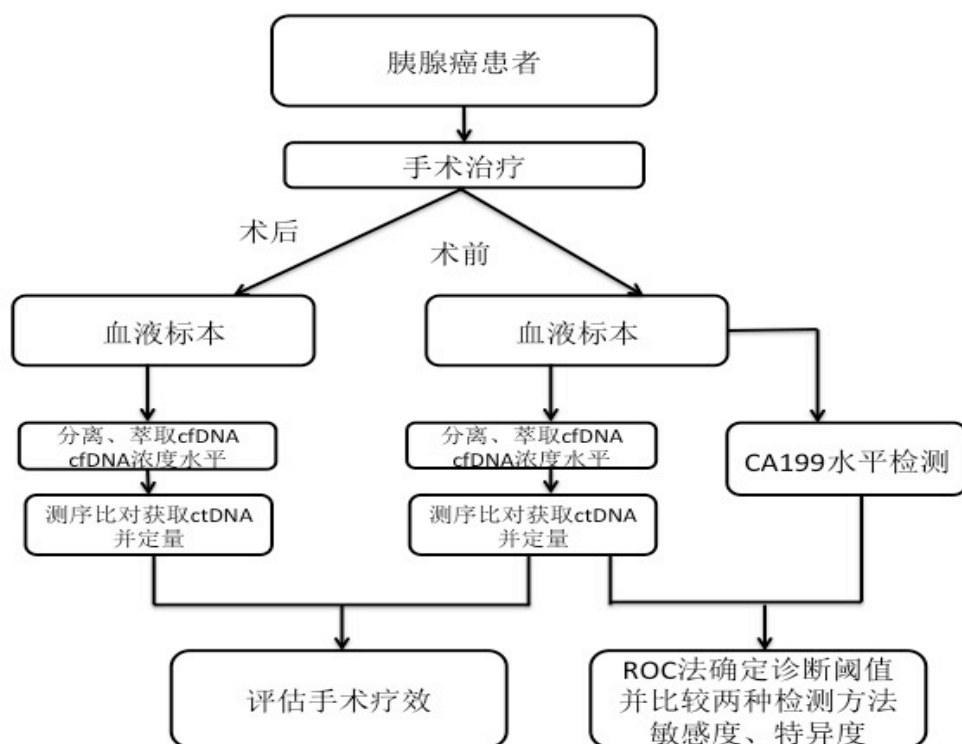
随访从患者最后一次化疗疗程结束开始，随访周期为每三个月一次直至1年，1年后每半年一次直至患者死亡。计算无进展生存期（progression-free survival, PFS）、反应率（response rate, RR）和总生存期（overall survival, OS）等生存指标。

6、技术路线

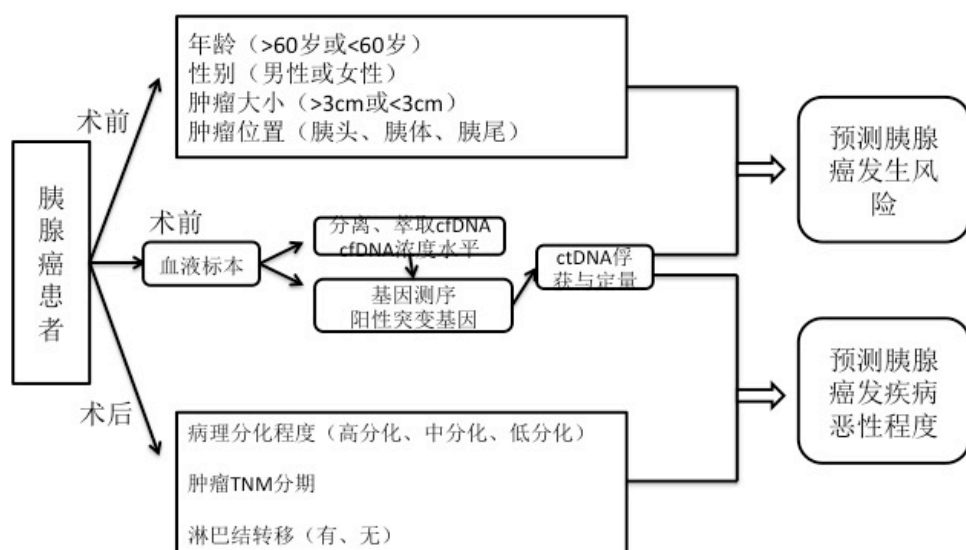
1) 外周血ctDNA与胰腺癌病理组织阳性基因突变率及一致性



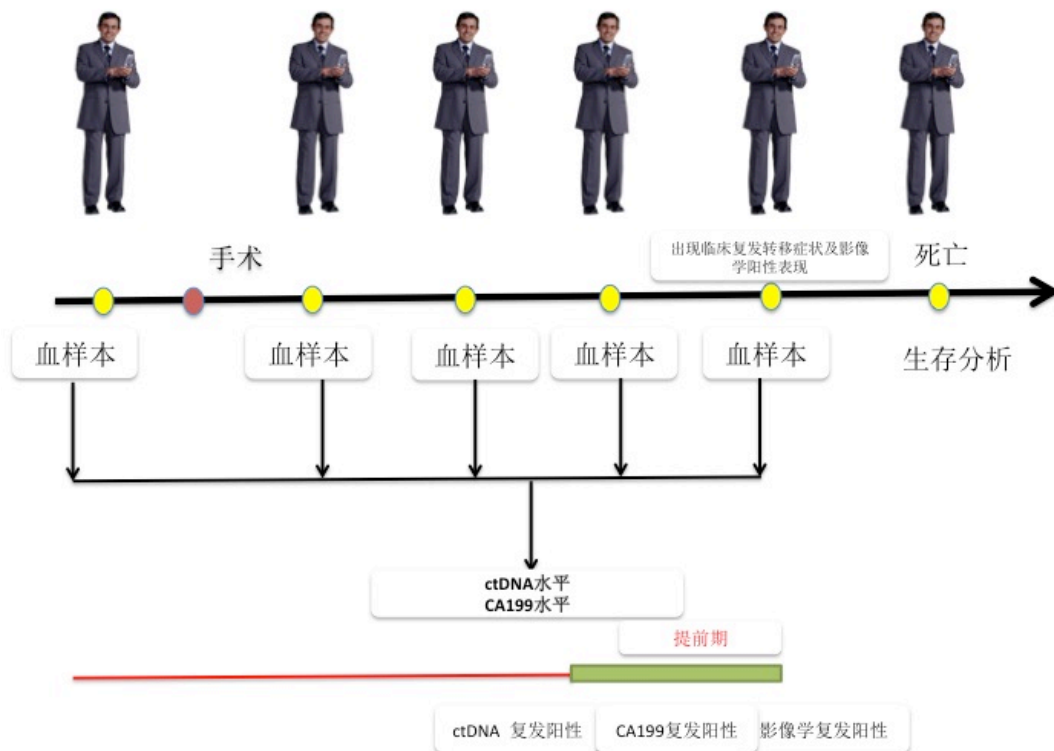
2) 手术干预前后外周血ctDNA和CTC总量的变化及与CA199诊断敏感度差异



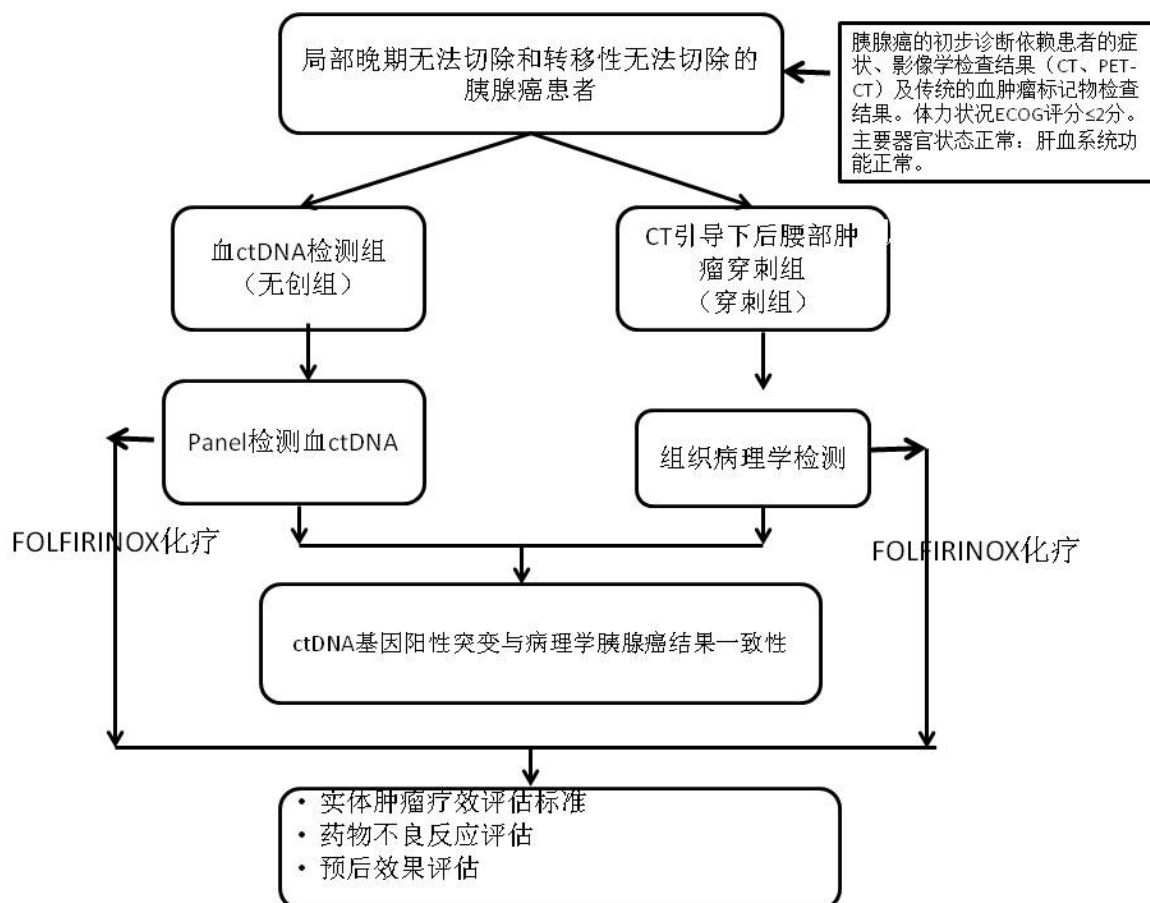
3) ctDNA总量用于评估胰腺癌疾病发生风险和疾病严重程度



4) ctDNA与胰腺癌无病生存期及总生存时间的关系



5) 血ctDNA基因检测替代组织穿刺病理活检提供化疗依据



三、项目总体目标、按年度阶段性目标

3.1 项目总体目标

- ①ctDNA 作为新一代基因型肿瘤标志物用于胰腺癌早期诊断、评估肿瘤严重程度及术后分子复发的临床应用价值。
- ②论证基于 ctDNA 的体液活检具有传统组织病理活检同等的对胰腺癌的确诊效力，替代有创穿刺活检，为已经丧失手术机会的进展期肿瘤患者进行下一步化疗提供非病理性依据。
- ③检测技术上明确胰腺癌组织、血 ctDNA 基因测序深度；ctDNA 检测 panel 模块的设计方案。
- ④建设综合性精准评估胰腺癌症状行为学、临床影像学及基因分子诊断学的临床诊疗模式。建立本中心基因诊断研究胰腺癌的标准作业程序、研究模式,完善地区胰腺癌患者基因数据库。

3.2 年度阶段性目标

2019.03-2020.03 搜集患者术前血液及术中组织标本，提取血ctDNA和白细胞，血样同时行CA199检测，血ctDNA、白细胞DNA及组织样本DNA行基因检测。

搜集就诊于胰腺外科的胰腺癌患者，根据AJCC分级进行疾病分期，术前采集患者血液，提取DNA和白细胞。手术采集患者组织样本提取DNA。本阶段拟采集样本60例，血ctDNA用panel检测，白细胞DNA及组织DNA行全外显子检测。

2020.04-2021.03 搜集2019年度患者的随访标本，记录随访情况。根据第一阶段检测结果设计panel。进行第二阶段血ctDNA替代组织穿刺诊断提供化疗依据的临床试验。

根据第一阶段的检测结果设计胰腺癌血液ctDNA测序专用panel，明确基因测序深度。继续按照前一年的运作模式搜集随访病例标本，ddPCR追踪患者外周循环突变目标基因，检测并分析ctDNA作为预后指标的临床应用。拟收集60例无法手术根治切除的胰腺癌患者进行临床试验，并进入化疗，记录化疗和生存结果。总结研究结果，撰写论文2篇。

2021.04-2022.03 继续搜集第一阶段患者随访标本，提取DNA并行基因检测，分析随访资料。对第二阶段的临床试验进行随访，记录生存结果。逐步建立胰腺癌基因数据库。

继续采集随访标本用 ddPCR 追踪患者外周循环突变目标基因，记录患者随访转归信息，分析 ctDNA 与疾病预后之间的关系。分析血 ctDNA 检测这种不激惹肿瘤的方式替代组织病理检测为化疗提供依据的可能性。分析并整理课题研究的数据资料，建立数据库，撰写、发表论文 2 篇，完成课题结题报告，制定后续研究方案，准备相关课题的继续申报。

四、项目的考核内容和考核指标

人才队伍建设目标

姓名：李昂, 目标：□院士、□千人计划、□长江学者、□万人计划、■杰出青年基金、□中华医学会/中国医师协会分会副主委及以上、□青年千人、□青年长江、□国自然优青、□青年拔尖、□其它 (请具体填写)

姓名：魏瑗琳, 目标：□院士、□千人计划、□长江学者、□万人计划、□杰出青年基金、□中华医学会/中国医师协会分会副主委及以上、□青年千人、□青年长江、□国自然优青、□青年拔尖、■其它 (请具体填写)

姓名：, 目标：□院士、□千人计划、□长江学者、□万人计划、□杰出青年基金、□中华医学会/中国医师协会分会副主委及以上、□青年千人、□青年长江、□国自然优青、□青年拔尖、■其它 引进人才 或 项目 PI (请具体填写)

科研产出目标

项目：

- 1) 科技部项目项【重点研发计划项（获准人：）、重大专项项（获准人：）】
- 2) 国自然基金 1 项【杰青项（获准人：）、重点项（获准人：）、面上项（获准人：）、优青项（获准人：）、青年 1 项（获准人：魏瑗琳）、其它（获准人：）】
- 3) 其它 100 万以上纵向项目项（项目类别、获准人）

论文：SCI 论文：4 篇，【A 级篇（发表人：）、B 级 1 篇（发表人：李昂 或 曹丹 或张文庚 或 谢丹）、C 级 3 篇（发表人：魏瑗琳 或 李柯宇 或 杜冰清 或 陈拥华 或 王成世 或 郭子恒 或黄子星 或 何度）、D 级篇】，其中交叉学科 SCI 论文：2 篇【A 级篇（发表人/跨学科发表人：）、B 级篇（发表人/跨学科发表人：）、C 级 2 篇（发表人/跨学科发表人 魏瑗琳 或 王成世 或 谢丹 或 黄子星）、D 级篇】

成果奖：国家奖项（获准人：）、中华医学会奖项（获准人：）、教育部奖项（获准人：）、省奖 1 项（获准人：李昂 或 曹丹）、市奖项（获准人：）

专利：发明专利授权项（发明人：）、实用新型专利授权项（发明人：）

科技转化：转化项（负责人）、转让经费万

项目负责人签字：日期：

四川大学华西医院

学科卓越发展 1·3·5 工程项目经费预算表

项目名称： 基于基因工程 ctDNA 检测的体液活检应用于胰腺癌早期诊断、预后评价及综合治疗的基础与临床研究

项目类别： ☐ 重大项目 ☐ 重点项目 ☒ 一般项目

项目负责人： 李昂 执行年限： 2019 年 3 月—2022 年 3 月

一、设备购置预算

序号	产品名称	经费（万元）	规格型号	产地	数量（台、套）
1					
2					
3					
4					
5					
.....					
小计		0			

备注：原则上不购买医院已有平台型设备及办公设备，确需购置的科研设备需通过医院论证。

二、业务项目预算

序号	预算项目	医院配套金额（万元）	支出内容	与研究任务的相关性
1	材料费	44.00	样本采集材料、基因提取试剂盒、测序试剂盒等	测序材料
2	测试化验加工费	62.00	Panel 模块测序、血白细胞全外显子检测、肿瘤组织全外显子检测等	基因测序
3	差旅费	2.00	参加国内学术交流、学习培训	
4	会议费	0.00		
5	国际合作与交流费	7.00	参加国际会议；邀请国外专家来院学术交流及课题指导	
6	出版/文献/信息传播/知识产权事务费	1.00	专利申请费、查新费、文印费	
7	劳务费	29.00	博士生：0.18 万元 / 月 × 10 个月 / 年 × 3 年 × 4	硕博研究生、临聘人

			人 硕士生：0.12 万元 / 月 ×10 个月 / 年×3 年×2 人	员、助研等 人员的劳务 费
8	专家咨询费	5.00	高级职称 2400 元/天,其 他 1500 元 / 天	课题指导
9	其他费用	无		
小计		150.00		

研究经费合计： 150 万

预算说明书

(请对各项支出的主要用途和测算理由及涉及合作研究外拨经费等内容进行详细说明，可根据需要另加附页)

1. 设备费 0.00 万元
2. 材料费 44.00 万元
检用于 panel / 全外显子 WES 建库建库中 PCR 纯化、库检等检测试剂盒 16 万，上机检测试剂盒等 23 万，以及其他常用实验室耗材及试剂等 4 万，总计 44 万元
3. 测试化验加工费 62.00 万元
Panel 模块测序 21 万、血白细胞全外显子检测 15 万，肿瘤组织全外显子检测 15 万，随访 ddPCR 检测等检测 11 万
4. 差旅费 2.00 万元
用于项目组成员参加国内学术交流、学习培训等 2.00 万元
5. 会议费 0.00 万元
6. 国际合作与交流费 7.00 万元
课题组成员参加胰腺疾病相关国际会议 4.00 万元；邀请国外专家来院学术交流及课题指导 3.00 万元
7. 出版 / 文献 / 信息传播 / 知识产权事务费 1.00 万元
用于文印费、专利申请费、查新费等
8. 劳务费 29.00 万元
无工资收入的硕博士研究生，临聘、助研人员等的劳务费
博士生：0.18 万元 / 月 × 10 个月 / 年 × 3 年 × 4 人
硕士生：0.12 万元 / 月 × 10 个月 / 年 × 3 年 × 2 人
9. 专家咨询费 5.00 万元
高级职称 2400 元 / 天，其他 1500 元 / 天
10. 其他费用 无

项目负责人意见：

负责人：

日期：

科室意见：

负责人：日期：

“双一流”建设办审核意见：

负责人：日期：

财务部审核意见：

负责人：日期：

分管院长意见：

负责人：日期：

院长意见：

负责人：日期：

四川大学华西医院临床研究孵化项目

计划任务书



综合性精准评估机体微生物分布及其代谢产物、机体免疫功能水平与胰腺癌发病的相关性研究

项目名称: 能水平与胰腺癌发病的相关性研究

项目批准号: 2019HXFH009

资助经费: 30 万元

执行年限: 2019 年 12 月 1 日 至 2023 年 11 月 30 日

负责人: 李卡

项目类别: ☒ 重大 ☐ 重点 ☐ 一般

所在科室: 护理学院

联系电话: 18980601488

电子邮件: Lika127@126.com

填表日期: 2019 年 10 月 8 日



项目批准号	81773174
申请代码	H1608
归口管理部门	
依托单位代码	61006508A0908-1705



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：基因型肿瘤标志物ctDNA用于胰腺癌早期诊断及预后评价的基础与临床研究

直接费用：54万元 执行年限：2018.01-2021.12

负责人：李昂

通讯地址：四川成都市武侯区国学巷37号

邮政编码：610041 电话：18980606692

电子邮件：angli1979@hotmail.com

依托单位：四川大学

联系人：张麟 电话：028-85401949

填表日期：2017年08月29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	李昂	性 别	男	出生年月	1979年08月	民 族	汉族
	学 位	博士			职称	副教授		
	电 话	18980606692		电子邮件	angli1979@hotmail.com			
	传 真	85582944		个人网页				
	工 作 单 位	四川大学						
	所 在 院 系 所	华西医院						
依托单位信息	名 称	四川大学					代码	61006508A0908
	联 系 人	张麟		电子邮件	jkh99@scu.edu.cn			
	电 话	028-85401949		网站地址	www.scu.edu.cn			
合作单位信息	单 位 名 称							代 码
项目基本信息	项 目 名 称	基因型肿瘤标志物ctDNA用于胰腺癌早期诊断及预后评价的基础与临床研究						
	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	H1608:肿瘤诊断						
	基 地 类 别							
	执 行 年 限	2018.01-2021.12						
	直 接 费 用	54万元						



项目摘要

中文摘要(500字以内):

胰腺导管腺癌为常见消化系统恶性肿瘤,五年生存期仅6%,外科手术仍是治疗胰腺癌的主要手段,但各种改良及扩大根治术并不能提高中晚期患者生存期,资料显示早诊早治具有重要临床意义,现有诊断方法已不能满足临床需求,故提高胰腺癌早期诊断水平是胰腺癌攻坚的重点及难点。患者循环血中肿瘤DNA(ctDNA)作为新型肿瘤标志物在乳腺癌、肺癌等肿瘤中的逐步应用,证实其具有特异度高、低浓度下敏感度高等特点,且检测便捷,使其可能成为胰腺癌早期诊断的理想方法。项目根据胰腺癌患者收治流程搜集临床病例资料,采集血液及组织标本,通过基因组学下一代基因测序等技术手段,检测患者循环血中ctDNA与胰腺癌组织基因突变的一致性,分析阳性突变基因与疾病分期和预后间的关系,与常规肿瘤标志物对比评估ctDNA作为新一代肿标用于胰腺癌早期诊断的临床价值,建立本中心基因诊断研究胰腺癌的标准作业程序、研究模式,完善地区胰腺癌患者基因数据库。

关键词: C11_胰肿瘤; 基因诊断; 肿瘤标志物; 循环肿瘤DNA

Abstract(limited to 4000 words):

The 5-year survival time of pancreatic adenocarcinoma (PDAC) is around 6%. Surgery is the main treatment protocol. However, some modified radical operation and extended radical resection could not improve the prognosis. In this situation, early diagnosis and early clinical intervention would be important to prolong life-span of patients with PDAC. Nowadays, Common blood circulating biomarker like CA199 could not guide prognosis and predict prognosis efficiently. So how to improve the way of early diagnosis is still one of the tough issues today. Circulating tumor DNA (ctDNA), which could be detected in human blood, has been used as a new biomarker in diagnosis of lung cancer and breast cancer. This gene diagnosis approach has higher disease specificity, higher sensitivity and specificity even at low concentration. The way to obtain ctDNA from blood is easy, so ctDNA will be an ideal approach for early diagnosis of PDAC. In this subject, we will collect the blood and tissue samples of patients with pancreatic cancer and their clinical data. We will check the gene mutations of ctDNA in blood through genomics techniques like next generation sequencing. We will compare these positive genes mutations in ctDNA with those that in pancreatic tissues. In addition, gene mutations and clinical data such as TNM staging and survival time will be analyzed. Compared with that of CA199 biomarker, the efficiency of ctDNA as a new diagnostic biomarker for pancreatic adenocarcinoma will be evaluated. A gene database of pancreatic cancer in West China and a standard operation procedure of cancer research will also be constructed.

Keywords: pancreatic cancer; genetic diagnosis; tumor biomarker; circulating tumor DNA



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	李昂	1979. 08	男	副教授	博士	四川大学	18980606692	511123197908060015	项目负责人	6				
2	魏瑗琳	1988. 05	女	博士后	博士	四川大学	18683958399	513902198805070403	基因测序及数据统计	8				
3	郭强	1987. 04	男	讲师	博士	四川大学	13880411391	362526198704161015	数据统计及论文撰写指导	6				
4	李轲宇	1991. 11	男	博士生	硕士	四川大学	18382008102	511123199111127314	采集标本及随访	10				
5	李懋	1987. 04	男	博士生	硕士	四川大学	18224485146	510105198704110296	样本收集及随访	10				
6	王成世	1986. 02	男	博士生	硕士	四川大学	15982080209	130682198602096779	DNA提取及基因检测	10				
7	熊俊杰	1984. 09	男	讲师	博士	四川大学	15928848756	513821198409226414	临床资料统计及数据分析	8				
8	陆慧敏	1981. 08	男	助理研究员	博士	四川大学	18108077766	510212198108130812	临床资料搜集及工作协调	6				
9	张懿	1982. 11	男	讲师	博士	四川大学	13408560526	510131198211090031	随访数据收集及统计	6				
10	胡伟明	1964. 01	男	教授	硕士	四川大学	18980601496	510102196401136159	项目指导及临床工作协调	5				
总人数			高级		中级		初级		博士后		博士生		硕士生	
10			2		4		0		1		3		0	



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：81773174

项目负责人：李昂

金额单位：万元

序号	科目名称	金额
1	一、项目直接费用	54.0000
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	8.5000
7	3、测试化验加工费	33.0000
8	4、燃料动力费	0.00
9	5、差旅/会议/国际合作与交流费	3.0000
10	6、出版/文献/信息传播/知识产权事务费	1.7000
11	7、劳务费	7.8000
12	8、专家咨询费	0.0000
13	9、其他支出	0.00
14	二、自筹资金	0.0000



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）设备费：无（本人所在实验室为国家重点实验室，具备研究所需设备，无需另购置）

（二）材料费：8.5万

项目名称	单价 (万元)	数量	金额 (万元)	说明
QIAamp DNA FFPE tissue 试剂盒	0.12	5	0.60	总样本量 100 份（组织 50 份样本、血液 50 份），每个试剂盒提取 20 份样本
eppendorf 1.5ml safe lock tubes	0.03	1	0.03	可重复使用
0.5-10ul Axygen 滤芯无菌盒枪头	0.0027	100	0.27	
KAPA Hyper Prep 试剂盒	1.30	1	1.30	供 100 个样本使用
PKR8 碱基接头(96 种)	1.47	1	1.47	供 100 个样本使用
玻璃珠 PCR 产物纯化试剂盒	2.78	1	2.78	供 100 个样本使用
IDT 捕获试剂盒	0.14	4	0.56	一个试剂盒供 25 个样本使用
xGen universal Blockers-TS Mix	0.78	1	0.78	供 100 个样本使用
Dynabeads M270 链霉亲和素	0.71	1	0.71	供 100 个样本使用
总计			8.5	

（三）测试化验加工费：33.0万

加工内容或测试指标	与研究内容相关性	数量	单价（万元）	金额（万元）
CA199检测	实验结果检测	100	0.003	0.30
NS500基因测序	对比手段差异	100	0.327	32.70
总计				33.0

（四）燃料动力费：无

（五）会议/差旅费/国际合作与交流费：3.0万

目的地	目的	人数	天数	交通费 (万元/人次)	会务费(万元/人次)	住宿费(万元/人次)	金额 (万元)
美国、欧洲等	胰腺疾病年会	2	10	0.85	0.15	0.50	3.0

（六）出版/文献/信息传播/知识产权事务费：SCI论文出版费 1.7万元

（七）劳务费：7.8万。用于参加项目研究的研究生劳务费用。研究生每月650元。劳务费：650元/人月×3人×10月/年×4年=7.8万

（八）专家咨询费：无

（九）其他支出：无

总计：54万元



报告正文

参照以下提纲撰写，要求内容翔实、清晰，层次分明，标题突出。
请勿删除或改动下述提纲标题及括号中的文字。

(一) 立项依据与研究内容 (4000-8000 字):

1. 项目的立项依据 (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；或结合国民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。附主要参考文献目录)；

1.1 胰腺癌的诊断及治疗

胰腺导管腺癌(Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, PDAC)，占胰腺癌的80%-90%，是一种常见的消化系统恶性肿瘤，近15年其发病率呈上升趋势。据我国2015年肿瘤数据结果显示，全年新发胰腺癌病例数为90100例，其中死亡人数79400人[1]，疾病死亡率居高不下，平均5年相关生存率仅6%左右。外科手术依然是治疗胰腺癌唯一有效的方法。然而，仅有10%-20%的患者能进行潜在治愈的R0手术切除，而这部分患者5年生存率也仅有20%~25%[2, 3]。尽管胰腺癌的发病率目前排名位于前五名之外，至2020年，胰腺癌疾病相关死亡率将赶超结直肠癌疾病死亡率；至2030年，胰腺癌将成为排在肺癌后第二致死恶性肿瘤疾病[4]。这些数据在一定程度上说明，这些年的临床工作对胰腺癌疾病发展过程还未产生实质性的影响。MRI、CT、PET-CT、多普勒超声、腹腔镜、传统的血液检测和活检术是目前常在临床工作中使用的肿瘤检测筛查方式。然而许多患者当检测到阳性结果时常处于癌症晚期且已经丧失有效的治疗手段的时机。因此，胰腺癌患者将可能从早期诊断技术中长期获益。

胰腺是腹膜后位器官，由于其位置较深，不易通过经皮穿刺的方式取组织过病理活检。及时穿刺成功，出血和胰瘘的并发症以及肿瘤种植转移的风险让临床医生很难抉择。因此，我们急需一种易操作，风险较小的诊断取材方式，而血液中由肿瘤细胞释放的游离循环DNA成为目前最有前景的肿瘤早期诊断标记物。

血清CA199是诊断胰腺癌及术后随访的最主要的指标，诊断敏感度达70%-95%，特异度达70%-90%[5]。理想的肿瘤标记物也应具备在无症状的患者



中同样具有较高的敏感度，而大样本试验发现 CA199 的阳性预测值仅 0.5%-0.9%[6]。然而，梗阻性黄疸、胰腺炎、肠炎、甚至血糖升高都能引起 CA199，导致 CA199 假阳性率增加，诊断效能受影响[7]。因此，我们仍需一种疾病特异度高，低浓度下诊断敏感度、特异度仍较强的诊断方式。或许依赖基因技术的 DNA 诊断能满足以上条件。

总而言之，胰腺癌是一种恶性程度很高、预后较差的腹部肿瘤，手术切除是唯一能够治愈的方式，而早期诊断能让胰腺癌患者获得能够手术治疗的机会。CA199 是传统的蛋白类诊断因子，仍具有一定缺陷，因此我们需要一种有别于传统的非蛋白类诊断标志物，基因诊断成为可能。

1.2 体液活检及 ctDNA 的应用

尽管现代肿瘤学在肿瘤诊断、治疗、分子机制研究等方面取得了长足的进步，但对于某些恶性肿瘤及进展期肿瘤治疗的效果仍较差，大多数患者在最终仍面临着药物耐受效果不佳和肿瘤局部或远处转移等问题。随着个体化医疗的开展，针对患者个体化肿瘤基因组分析及靶向定点确定突变成为未来恶性肿瘤治疗的主要方向。

血液细胞学检查、核磁共振 MRI、CT、多普勒超声、手术或穿刺组织活检是目前临床工作中常规开展的肿瘤筛查追踪的主要手段。循环血液中的肿瘤标志物广泛运用于肿瘤诊断和指导评估治疗效果及肿瘤复发。临床中常使用的蛋白肿瘤标志物如 CA-125,CEA,CYFRA21-1,PSA 等具有假阴性、无特定肿瘤类型等缺陷。对于 III、IV 期出现周围血管组织侵犯及远处脏器转移的晚期患者，因其已丧失手术根治机会，手术活检并不常规推荐，特别如胰腺癌这种位于腹膜后的器官肿瘤，经皮穿刺又不损伤周围脏器的成功几率微乎其微。因此，研发出多样（multiplex assays）检测如一次检测大于 50 个肿瘤标志物及定时多次检测、且不依赖于肿瘤组织本身的微创手段是目前解决检测诊断肿瘤运用诸多限制的最好方式。美国国家癌症研究所（National Cancer Institute, NCI）及国内的多个相关科研机构为了加强多种类循环血液中的肿瘤标志物检测倾注大量人力物力财力用于研发新的肿瘤标记物检测俘获试剂、分析试剂盒以及检测设备系统。非蛋白型肿瘤标志物的发现成为未来最有前景的早期筛查肿瘤的新方式。

目前检测筛查肿瘤的手段并不能满足临床运用需求，我们需要更准确并易



操作的检测手段大规模运用于临床。本实验的目标即研发一种有别于传统的检测方法的肿瘤诊断模式，该方法还能更准确区分肿瘤亚型。我们的目标是希望通过这种手段最终能延长全世界肿瘤患者的长期生存时间。

早在 1948 年, Mandel 和 Metais 等成功发现人的血液中含有核酸(nucleic acid) [8]。在当时, 由于对相关全新概念的认识度缺乏, 他们的实验结果并未得到大众的重视。1977 年, Leon 等人第一次从癌症患者的血清中提取到了游离 DNA (cell-free DNA, cfDNA), 他们进一步阐述了 cfDNA 作为肿瘤诊断的指标及对放疗治疗的效果评价 (cfDNA 水平明显下降) [9]。而后胰腺癌患者血清学基因分析发现了 KRAS 突变验证了肿瘤能散落 DNA 进入血液循环系统[10]。这些研究成果为我们展开循环核酸的全新探索, 多中心致力于验证这些核酸的功能以及作为肿瘤诊断指标的可行性。目前有两种具有说服力的核酸释放机制: “被动”机制和“主动”机制。“被动”机制即凋亡或坏死的细胞直接释放核酸或线粒体 DNA, 巨噬细胞和吞噬细胞吞噬坏死或凋亡的肿瘤细胞并直接释放核酸入微环境[11, 12]; “主动”机制即循环肿瘤细胞 (circulating tumor cells, CTCs) 通过自噬 (autophagy) 和程序性坏死 (necroptosis) 释放细胞中的核酸。凋亡是一种程序性、在细胞死亡损坏中能良好自控的过程, 这一过程释放的 DNA 长度大致在 160-180bp 之间[13, 14]。相反, 坏死是一个病理过程, DNA 片段长度更随机或更长。cfDNA 通过肝脏和肾脏被有效清除, 半衰期在 15 分钟至几小时不等[15, 16]。而循环肿瘤 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA) 则是从 ctDNA 中分离出来的跟肿瘤直接相关的最能够传递肿瘤信息的核酸。随着精准医学的提出, ctDNA 在肿瘤早期诊断和治疗效果评估中的运用价值被广泛认可[17]。

伴随着下一代测序技术(next generation sequencing)的开展, 因其通量提高、成本降低和测序周期缩短的优势已被广泛应用于基因组学、转录组学和表观组学等。在大规模癌症基因组测序的技术发展基础上, 我们了解到每一种癌症都具有本体基因变异, 并能够在外周血 DNA 中检测到。这些发现和 DNA 分离分析技术的进展开启了全新癌症标记物检测方法的时代。同尿液[18, 19]、脑脊液[20]、腹水[21]及其他体液中的核酸一样, 血液中的肿瘤核酸同样可以密切反应疾病状态, 通过检测肿瘤原发或转移部位释放到血液中的核酸来检测癌症, 这一技术就是“体液活检(liquid biopsy)”。体液活检以侵害最小的方式达到肿瘤生长



过程的时间空间上的多次检测，比单一局部肿瘤活检更实用、更方便，应用更广。同理，ctDNA 检测可以运用到抗药物疗效评价、药物抵抗、肿瘤预后及复发、分子结构异常分析等，实时动态分析肿瘤分子情况等研究中。未来五年，基于 ctDNA 的液体活检技术将纳入疾病诊断及药物研发，对于基因检测技术本身及肿瘤诊治模式将产生革命性的影响。

1.3 ctDNA 与胰腺癌的早期诊断

目前，在乳腺癌、肺癌、结直肠癌、肾癌有关肿瘤与 ctDNA 的研究相对较多，各研究中心通过改良不同的 PCR 及全基因组测序方式不断提高 ctDNA 检测的敏感度和特异性[22-26]。同样，ctDNA 仍可以作为胰腺癌早期诊断和预后的指标[27]。通过对早期胰腺癌患者血液和组织中 DNA 的 KRAS 基因突变情况进行检测，发现 ctDNA 与组织 DNA 中 KRAS 基因突变的一致性，也为 ctDNA 作为胰腺癌早期诊断新型标志物提供理论依据[28]。

那么 ctDNA 这种体液活检方法能否作为胰腺癌诊断筛查的手段之一且长期有效运用于临床工作中？为了回答这个问题我们需要明确的是：1) 胰腺癌和基因改变之间必须有明确的关系；2) 就目前已有的基因检测技术能检测到大部分胰腺癌患者血液中 ctDNA；3) ctDNA 在胰腺癌患者血液中能持续表达。

2015 年 Nature 上刊登了胰腺癌基因突变全图谱，代表着未来胰腺癌诊断治疗将朝着基因分子层面全面发展全面[29]。该实验研究对 100 个胰腺癌组织进行了全面基因测序，从分子层面上将胰腺癌分为四个类型：1、稳定型（Stable subtype,20%）--≤50 个结构变异，细胞周期中呈现广泛异倍体现象；2、局部重排性（Locally Rearranged subtype,30%）--一个至两个染色体重排；3、分散型（Scattered subtype,36%）--≤200 个结构突变，非随机染色体损坏；4、不稳定型（Unstable subtype,14%）-->200 个结构变异，最多可达 558 个变异，DNA 修复功能减弱。发生突变的基因是 KRAS、TP53、SMAD4、CDKN2A，占整个突变基因>90%，此外 KDM6A、PREX2、RNF43 等基因也存在突变。在这些癌症组织中，DNA 修复功能缺陷的 BRCA1、BRCA2、PALB2 存在不同程度的突变。因此，血清 ctDNA 针对这些目标基因进行全方位测序，有望实现胰腺癌的早期检测。



胰腺癌有12个核心的细胞信号通路发生了基因改变（表1）。其中主要的通路包括Ras-MAPK通路、EGFR信号通路、GNAS与PIK3CA信号通路、TP53介导的细胞周期调控与肿瘤抑制、TGF- β /SMAD信号通路、CDKN2A信号通路、ATM/BRCA2/Wee1、SWI/SNF与MLL基因复合体介导的染色质修饰、ADAMs与MMPs通路[30]。再如，KRAS（Kristen rat sarcoma viral oncogene homolog）是一种小型GTP酶，是下游络氨酸激酶信号通路受体，其突变将过度激化细胞外调节激酶通路MAPK、ERK等。一旦ERK通路被激活，信息转运至细胞核中，参与细胞增殖分化的目标基因将会过表达。RAS致癌基因同样和细胞生长中重要的信号通路分子相互作用。早在1990年代研究发现，PIK3CA

（phosphatidylinositol-3-OH kinase，磷脂酰肌醇-3-激酶）是细胞周期G1期中蛋白合成重要的信号转导分子，也是Ras致癌基因的作用靶点之一[31]。PIK3CA被Ras激活后同其他促进细胞生长的受体如EGFR一起促进细胞增殖和向下一细胞周期前进。K-Ras致癌基因也可以和其他分子相互作用激活应激反应和细胞增殖信号通路如c-Jun N端激酶（JNK）和蛋白激酶C（PKC），这也说明胰腺癌中的信号通路网相互作用极其复杂，一旦一个信号通路被激活，其他的细胞反应将改变细胞处于应激状态且微环境如缺氧、氧自由基也随着改变。第二，在胰腺癌发展早期即出现KRAS基因突变[28]。GNAS、PIK3CA联合KRAS激活在胰腺癌早期特别是胰腺导管内乳头状粘液瘤（IPMN）来源的胰腺癌中表达增加[32, 33]。这些基因即可潜成为早期诊断胰腺癌的重要的标志物。虽然p53突变常发生与胰腺癌发展的晚期，但在胰腺癌患者中有约40%-75%会发生p53基因突变。p53是一个小核蛋白，它通过周期素依赖性蛋白激酶CDKs使细胞周期停留在G1期。当乳腺癌易感基因1（Breast Cancer susceptibility gene1, BRCA1）在启动DNA修复程序后但无法正常修复时，p53激活让细胞周期停滞。因此，p53也可作为潜在的标志物用于肿瘤监测。



表 1 胰腺癌患者中主要的信号通路和基因改变

Regulatory process or pathway	Number of genetically altered genes detected	Fraction of tumors with genetic alteration of at least one of the genes	Representative altered genes
Apoptosis	9	100%	CASP10, VCP, CAD, HIP1
DNA damage control	9	83%	ERCC4, ERCC6, EP300, RANBP2, TP53
Regulation of G ₂ S phase transition	19	100%	CDKN2A, FBXW7, CHD1, APC2
Hedgehog signaling	19	100%	TBX5, SOX3, LRP2, GLI1, GLI3, BOC, BMPR2, CREBBP
Homophilic cell adhesion	30	79%	CDH1, CDH10, CDH2, CDH7, FAT, PCDH15, PCDH17, PCDH18, PCDH9, PCDHB16, PCDHB2, PCDHGA1, PCDHGA11, PCDHGC4
Integrin signaling	24	67%	ITGA4, ITGA9, ITGA11, LAMA1, LAMA4, LAMA5, FN1, ILK
c-Jun N-terminal kinase signaling	9	96%	MAP4K3, TNF, ATF2, NFATC3
KRAS signaling	5	100%	KRAS, MAP2K4, RASGRP3
Regulation of invasion	46	92%	ADAM11, ADAM12, ADAM19, ADAMS220, ADAMTS15, DPP6, MEP1A, PCSK6, APGA4, PRSS23
Small GTPase-dependent signaling (other than KRAS)	33	79%	AGHGEF7, ARHGEF9, CDC42BPA, DEPDC2, PLCB3, PLCB4, RP1, PLXNB1, PRKCG
TGF- β signaling	37	100%	TGFBR2, BMPR2, SMAD4, SMAD3
Wnt/Notch signaling	29	100%	MYC, PPP2R3A, WNT9A, MAP2, TSC2, GATA6, TCF4

1.4该项目的研究意义

①胰腺癌是一种常见的、预后差得恶性消化器官肿瘤，基因突变在疾病发生、发展中扮演着重要角色。手术治疗是使患者获益的唯一手段。基于基因早期诊断为患者争取手术治疗机会成为未来临床工作的重要方向之一。血ctDNA是存在于血液中的循环肿瘤细胞释放的细胞DNA，通过抽取患者血液并提取DNA进行全基因组测序这种“零创伤”的方式得到胰腺癌患者基因信息的第一手资料，为下一步突变基因分子信息联合患者宏观临床资料之间的关系分析出基因突变预测胰腺癌发生及疾病预后的临床应用价值打下研究基础。

②由于基因的人种特异性，通过该项目逐步建立中国西南地区甚至亚洲人种的胰腺癌基因信息数据库并分析胰腺癌疾病人种特征是了解疾病发展过程的重要手段，为分子机制研究及药物研发奠定基因理论基础。该项目基因研究模式可以作为肿瘤基因组学研究的标准模式，为下一步临床工作运用开展奠定理论基础。



参 考 文 献

- [1]W Chen, R Zheng, Baade PD,et al.Cancer Statistics in China, 2015.Ca Cancer J Clin 2016;66: 115-132
- [2]Siegel R, Naishadham D, Jemal A.Cancer statistics, 2013.CA Cancer J Clin 2013;63: 11-30
- [3]Hartwig W,Hackert T,Hinz U,et al.Pancreatic Cancer Surgery in the New Millennium Better Prediction of Outcome. Ann Surg 2011;254: 311-319
- [4]Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, et al. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. Cancer Res 2014;74: 2913-2921
- [5]Ballehaninna RS.The clinical utility of serum CA 19-9 in the diagnosis, prognosis and management of pancreatic adenocarcinoma: an evidence based appraisal. J Gastrointest Oncol 2012;3: 105-119
- [6]UK Ballehaninna, RS Chamberlain.The clinical utility of serum CA 19-9 in the diagnosis, prognosis and management of pancreatic adenocarcinoma: An evidence based appraisal. Journal of Gastrointestinal Oncology 2012;3: 105-119
- [7]D Zhang, W Hou, F Liu,et al.Metformin Reduces Serum CA199 Levels in Type 2 Diabetes Chinese Patients with Time–Effect and Gender Difference. Diabetes Technology & Therapeutics 2014;17: 72
- [8]Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l’Homme. 1948;142: 241-243.
- [9]Leon S A, Shapiro B, Sklaroff D M, et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. Cancer Research 1977; 37: 646-650.
- [10]Sorenson GD, Pribish D M, Valone FH,et al. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1994;3: 67-71
- [11]Choi JJ, Rd RC, Pisetsky DS.The role of macrophages in the in vitro generation of extracellular DNA from apoptotic and necrotic cells. Immunology 2005;115: 55-62



- [12]Mcevoy AF. The origin of extracellular DNA during the clearance of dead and dying cells. *Autoimmunity* 2007;40: 281-284
- [13]Nagata S, H Nagase, Kawane K, et al. Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death Differ* 2003;10: 108-116
- [14]Mouliere F, Robert B, Arnau Peyrotte E, et al. High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. *PloS One* 2011;6: e23418
- [15]Diehl F, Schmidt K, Choti MA, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* 2008;14: 985-990
- [16]Emlen W, Mannik M. Effect of DNA size and strandedness on the in vivo clearance and organ localization of DNA. *Clin Exp Immunol* 1984;56: 185-192
- [17]Aravanis AM, Lee M, Klausner RD. Next-Generation Sequencing of Circulating Tumor DNA for Early Cancer Detection. *Cell* 2017;168: 571-574
- [18]Janku F, Vibat CR, Kosco K, et al. BRAF V600E mutations in urine and plasma cell-free DNA from patients with Erdheim-Chester disease. *Oncotarget* 2014;5: 3607-3610
- [19]Dynamic tracing for epidermal growth factor receptor mutations in urinary circulating DNA in gastric cancer patients. *Tumour Biol* 2017;39: doi: 10.1177/1010428317691681.
- [20]Pan W, Gu W, Nagpal S, et al. Brain tumor mutations detected in cerebral spinal fluid. *Clin Chem* 2015;61: 514-522
- [21]Husain H, Venkatapathy S, Gomez G, et al. Cell-free DNA derived from ascites: Detection of copy number and somatic mutations using OncoScan FFPE® Assay (Abstract 2410). *Cancer Res* 2015;75: 2410-2410
- [22]Church TR, Wandell M, Lofton-Day C, et al. Prospective evaluation of methylated SEPT9 in plasma for detection of asymptomatic colorectal cancer. *Gut* 2014;63: 317-325
- [23]J Earl, S Garcianieto, JC Martinez-Avila, et al. Circulating tumor cells (CTC) and KRAS mutant circulating free DNA (ctDNA) detection in peripheral blood as biomarkers in patients diagnosed with exocrine pancreatic cancer. *BMC Cancer* 2015;15: 797



- [24]SK Pedersen, EL Symonds, RT Baker, et al.Evaluation of an assay for methylated BCAT1 and IKZF1 in plasma for detection of colorectal neoplasia.BMC Cancer 2015;15: 654
- [25]Corrò C, Hejhal T, Poyet C,et al. Detecting circulating tumor DNA in renal cancer: An open challenge.Exp Mol Pathol 2017;102: 255-261
- [26]Vendrell JA, Mauthem F, Béganton B,et al.Circulating Cell Free Tumor DNA Detection as a Routine Tool forLung Cancer Patient Management.Int J Mol Sci 2017;18: doi: 10.3390/ijms18020264
- [27]Pietrasz D, Pecuchet N, Garlan F,et al.Plasma Circulating Tumor DNA in Pancreatic Cancer Patients Is a Prognostic Marker.Clin Cancer Res 2017;23: 116-123
- [28]Brychta N, Krahn T, Ahsen OV.Detection of KRAS Mutations in Circulating Tumor DNA by Digital PCR in Early Stages of Pancreatic Cancer.Clin Chem 2016;62: 1482-1491
- [29]Waddell N, Pajic M, Patch AM,et al.Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer.Nature 2015;518: 495-501
- [30]Sahin IH, Lacobuziodonahue CA, O'Reilly EM. Molecular signature of pancreatic adenocarcinoma: an insight from genotype to phenotype and challenges for targeted therapy. Expert Opin Ther Targets 2016;20: 341-359
- [31]Rodriguezviciano P, Warne PH, Dhand R, et al.Phosphatidylinositol-3-OH kinase direct target of Ras.Nature 1994;370: 527-532
- [32]Wu J, Matthaei H, Maitra A, et al. Recurrent GNAS mutations define an unexpected pathway for pancreatic cyst development.Sci Transl Med 2011;3: 92ra66
- [33]Schönleben F, Qiu W, Ciau NT, et al.IK3CA mutations in intraductal papillary mucinous neoplasm/carcinoma of the pancreas.Clin Cancer Res 2006;12: 3851-3855



2. 项目的研究内容、研究目标，以及拟解决的关键科学问题（此部分为重点阐述内容）；

2.1 研究内容

1) 外周血ctDNA与胰腺癌病理组织阳性基因突变率及一致性。根据临床标准流程搜集胰腺癌患者的血液及组织标本，通过传统标准模式提取分离全部DNA，利用下一代测序技术全面行基因测序分析中国西南片区胰腺癌基因突变及染色体异常表现情况。通过比较血浆ctDNA与组织DNA的突变基因种类差异性与一致性及阳性基因突变阳性率确立ctDNA用于胰腺癌诊断的可行性。

2) 手术干预前后外周血ctDNA总量的变化及与CA199诊断敏感度差异。比较术前与术后血浆中ctDNA总量水平的改变和持续表达情况来评估血ctDNA量的变化作为手术疗效评估及疾病随访的检测指标；通过ROC曲线计算ctDNA诊断胰腺癌的阈值，并与匹配患者的血清学CA199诊断的敏感度和特异度对比评估ctDNA的诊断效率。

3) 胰腺癌疾病不同分期与ctDNA总量的关系。分析患者年龄、性别、病理分级、术后疾病分期与血浆ctDNA总量、阳性突变基因之间的关系，分析胰腺癌的宏观及基因微观预测因素。建立突变基因的量化分数与癌症疾病严重程度（早期及晚期）预测的统计模型，用该数据模型分析ctDNA与早晚期癌症发生风险。

4) ctDNA与胰腺癌无病生存期及总生存时间的关系。记录患者从确诊至死亡疾病发展过程中ctDNA总量变化，ctDNA量化改变作为评估患者生存预后的指标。对患者术后（R0切除/非R0切除）不同随访时间点的血ctDNA值的测量确定诊断胰腺癌肿瘤复发的血ctDNA阳性时间点，并与临床血清学、影像学阳性表现时间点之间比较，寻求ctDNA作为早期判断胰腺癌术后复发转移的诊断指标的优势及临床运用价值。

5) 逐步建立胰腺癌基因信息数据库。通过搜集所有遗传信息结果及临床资料，统计分析数据结果，建立西南地区胰腺癌基因诊断及随访数据库。

2.2 研究目标

1) 阐明胰腺癌ctDNA中的体细胞基因突变与胰腺癌之间的关系。通过对提取到的血游离DNA并进行下一代基因测序，并与组织DNA测序结果比对，验证ctDNA作为新一代胰腺癌诊断肿瘤标志物的可行性。



2) 阐明ctDNA较CA199诊断胰腺癌的优势及与胰腺癌疾病分期之间的关系。

通过计算ctDNA诊断阈值、同一患者的ctDNA和CA199诊断敏感度和特异度分析ctDNA诊断优势。分析术后患者临床疾病分期与ctDNA总量之间的关系，明确ctDNA能够成为预测胰腺癌早期和晚期的重要指标。

3) 阐明ctDNA与胰腺癌生存预后之间的关系。分析患者术后无病生存期和总生存期与ctDNA总量之间的关系，明确ctDNA能够成为预测胰腺癌疾病预后的重要指标。

4) 明确ctDNA成为新一代胰腺癌早期诊断和筛查的重要指标。对比正常人群和胰腺癌患者血浆中ctDNA量的差异，评估新一代非蛋白类基因诊断标志物作为胰腺癌早期诊断和筛查的可行性。

2.3拟解决的关键科学问题

1) 运用DNA提取技术及下一代基因测序的关键技术分析ctDNA在胰腺癌患者外周血中的持续表达情况及基因突变情况。比较血ctDNA与组织DNA突变基因种类及阳性率，观察ctDNA在胰腺癌患者疾病过程中持续表达情况，且ctDNA的早期诊断、胰腺癌诊断效率及在术后随访、疾病预后判断中的运用价值；

2) 解决如何提高外周血ctDNA诊断的敏感度和特异度，ctDNA体液活检与传统CA199相比的运用优势。所有阳性突变基因诊断胰腺癌及其各种亚型的敏感度和特异度，分析不同突变基因之间诊断一致性；通过ROC曲线计算ctDNA诊断胰腺癌的阈值。并与匹配患者的血清学CA199诊断的敏感度和特异度对比评价诊断效率，追溯ctDNA诊断假阳性和假阴性结果的原因。通过不同的测序手段提高基因诊断的敏感度和特异度。

3) 运用外周血ctDNA联合临床指标预测癌症疾病发生发展风险，将基础研究数据结果与临床资料有效结合分析。分析患者临床一般资料、肿瘤病理分级、生存期、血浆ctDNA浓度及总量等与不同阳性突变目标基因之间的关系，用宏观数据和分子数据共同预测疾病发生风险。



3. 拟采取的研究方案及可行性分析（包括研究方法、技术路线、实验手段、关键技术等说明）；

3.1 研究方法

1) 胰腺癌患者血液中ctDNA的基因突变情况与胰腺癌病理组织中的情况一致性

1.1 患者纳入与排除标准

纳入标准：于四川大学胰腺外科就诊的、可行根治性或姑息性手术治疗的胰腺癌患者。

排除标准：胰腺肿瘤非胰腺原发灶或包括胰腺癌等两种肿瘤同时并存的患者，非胰腺癌恶性肿瘤病史的患者。患者均留有术中冰冻及术后明确的病理诊断，并行病理分级与疾病分期。

1.2 目标基因的选择

胰腺癌中存在许多基因突变。在这一部分实验中我们将着重于以下基因为研究目标：我们选择KRAS2, CDKN2A, TP53, TGFBR2, SMAD4, PCDH15, MLL3, SPARC, hENT1, and DPC4, USP9X等数十种胰腺癌和消化道恶性肿瘤突变率较高的基因（允许情况下行全基因组测序）。这些基因在胰腺癌基因突变中均有涉及（表1）。这些通路相关的基因活性和表达的改变和肿瘤生长侵袭都有直接的关系。对于胰腺癌患者，这些基因将作为检测ctDNA的重点目标基因。



表1胰腺癌致病主要突变基因（部分）

Gene	nucleotide (genomic)	nucleotide (cDNA)	amino acid	mutation type	expression
KRAS2	g chr12:25271542A>C (homozygous)	c. 183A>C	p. Q61H	Missense	Exp
	g chr12:25289551G>A	c. 35G>A	p. G12D	Missense	Exp
	g chr12:25289551G>T	c. 35G>T	p. G12V	Missense	Exp
	g chr12:25289552G>C	c. 34G>C	p. G12R	Missense	Exp
CDKN2A	g chr9:21961171C>G	c. 187C>G	p. L63V	Missense	Exp
	g chr9:21961065A>C (homozygous)	c. 293A>C	p. H98P	Missense	Exp
TP53	g chr17:7514721T>C (homozygous)	c. 103T>C	p. L344P	Missense	Exp
	g chr17:7517819C>T (homozygous)	c. 844C>T	p. R282W	Missense	Exp
	g chr17:7517839G>A (homozygous)	c. 824G>A	p. C275Y	Missense	Exp
	g chr17:7517866G>T (homozygous)	c. 797G>T	p. G266V	Missense	Exp
	g chr17:7518236T>C (homozygous)	c. 770T>C	p. L257P	Missense	Exp
	g chr17:7518242T>A (homozygous)	c. 764T>A	p. I255N	Missense	Exp
	g chr17:7518264C>T (homozygous)	c. 742C>T	p. R248W	Missense	Exp
	g chr17:7518284C>T (homozygous)	c. 722C>T	p. S241F	Missense	Exp
	g chr17:7518305A>G (homozygous)	c. 701A>G	p. Y234C	Missense	Exp
	g chr17:7518924T>G (homozygous)	c. 650T>G	p. V217G	Missense	Exp
	g chr17:7518951A>T (homozygous)	c. 623A>T	p. D208V	Missense	Exp
	g chr17:7518972delT (homozygous)	c. 602delT	frameshift	INDEL	Exp
	g chr17:7519119A>G (homozygous)	c. 536A>G	p. H179R	Missense	Exp
	g chr17:7519131G>A (homozygous)	c. 524G>A	p. R175H	Missense	Exp
	g chr17:7519165delA (homozygous)	c. 490delA	frameshift	INDEL	Exp
	g chr17:7519192A>C (homozygous)	c. 463A>C	p. T155P	Missense	Exp
	g chr17:7520037_7520027delGGTCAG	c. 375_IVS3+10delGGTCAGTTGCC	frameshift	INDEL	Exp
	g chr17:7520053A>G (homozygous)	c. 359A>G	p. K120R	Missense	Exp
TGFB2	g chr3:30688745dupC	c. 1066dupC	frameshift	INDEL	Exp
	g chr3:30704933_30704943delGTCGA	c. 1450_1460delGTCGAAAGCAT	frameshift	INDEL	Exp
	g chr3:32688143_32688144insA (homozygous)	c. 464_465insA	frameshift	INDEL	Exp
SMAD4	g chr18:46829088A>C (homozygous)	c. 284A>C	p. Y95S	Missense	Exp
	g chr18:46829118_46829121delACAA	c. 314_317delACAA	frameshift	INDEL	Exp
	g chr18:46829170dupA (homozygous)	c. 366dupA	frameshift	INDEL	Exp
	g chr18:46838724delG (homozygous)	c. 804delG	frameshift	INDEL	Exp
	g chr18:46845922T>C (homozygous)	c. 1087T>C	p. C363R	Missense	Exp
	g chr18:46845931C>T (homozygous)	c. 1096C>T	p. Q366X	Nonsense	Exp
	g chr18:46857030C>T (homozygous)	c. 1333C>T	p. R445X	Nonsense	Exp
	g chr18:46858684dupT (homozygous)	c. 1508dupT	frameshift	INDEL	Exp
PCDH15	g chr10:55808661C>T	c. 205C>T	p. P69S	Missense	N.I.
	g chr10:5566676G>T	c. 898G>T	p. V300F	Missense	N.I.
	g chr10:55666642G>A	c. 932G>A	p. R311Q	Missense	N.I.
	g chr10:55391604C>A	c. 2923C>A	p. P975T	Missense	N.I.
MLI3	g chr7:151329239C>T	c. 4441C>T	p. R1481X	Nonsense	Exp
	g chr7:151316674G>T	c. 5919G>T	p. V1973V	Synonymous	Exp
	g chr7:151316588G>A	c. 6005G>A	p. G2002E	Missense	Exp
	g chr7:151316523G>C	c. 6070G>C	p. D2024H	Missense	Exp
	g chr7:151315992G>C	c. 6601G>C	p. D2201H	Missense	Exp
	g chr7:151283589G>A (homozygous)	c. 13071G>A	p. W4357X	Nonsense	Exp
	g chr7:151283363G>A	c. 13297G>A	p. A4433T	Missense	Exp
N.I.: not informative					
INDEL: insertion or deletion					
EXP: expressed in the tumor					

1.3血ctDNA及胰腺癌病理组织的搜集与检测

患者术前搜集其血液标本及术中搜集组织样本分别行DNA分离萃取。健康人群和患者标本送至实验室后由实验室与课题无关专业工作人员进行实验检测。

1.3.1血液样本处理

采集胰腺癌患者和健康对照组的的全血10ml装入EDTA管中。室温保存采集的血液并在血液采集后的1h内进行实验操作，尽可能立即操作避免血液凝固和EDTA高盐抗凝剂对血液细胞的影响。取收集的血液10ml，室温下以1600xg离心10分钟，吸取上层清液约5-6ml装入15ml管中，上清液于4℃、16000xg旋转15分钟后吸取上清装入2ml单位管中，上清液血浆可以用来DNA萃取或者-80℃冻存。两步骤的离心是去除血细胞和血小板的标准方法。DNA仍遗留在提纯后的上清



液中。且在-80℃的情况下，DNA仍可重复测量时使用。

1.3.2血游离DNA萃取

我们常规使用DNA提取试剂盒并遵循其说明书操作：

1. 2ml血浆样本中加入蛋白酶K（10mg/ml，Invitrogen）和 ACL buffer（Qiagen 19075）释放DNA。裂解血浆释放cfDNA，因cfDNA是由坏死、凋亡或激活的外泌体释放，周围被微粒膜型包裹，仍需被裂解掉才能释放裸DNA。
- 2.加入含有丙醇的ACB缓冲液进行裂解
- 3.将DNA置入QIAamp盒中
- 4.用含有乙醇的ACW缓冲液冲洗盒子来移除剩余的蛋白和盐分
- 5.用水洗涤DNA，总量要超过30ng。
- 6.提取中层白细胞的gDNA检测作为对照，以区分胚系突变和体细胞突变。

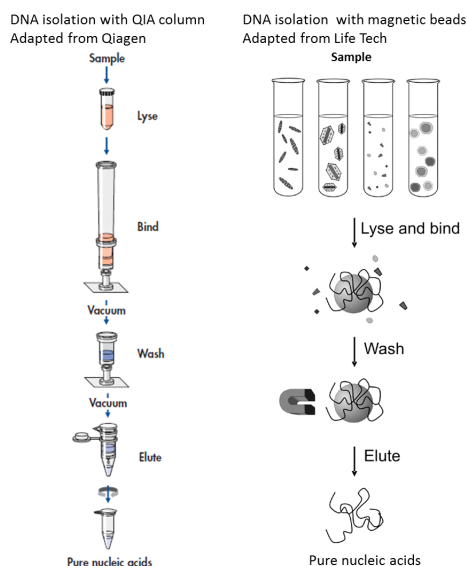


图2 DNA分离模式图（改良自试剂盒说明书）

因此，我们计划使用已经成熟建立的DNA分离技术作为起点。然而从长远考虑，我们需要从以下两方面提高DNA提取效率：（1）目标基因的数量，即从获得的有限血液中丢失最少的DNA；（2）我们也可使用磁珠法作为备选方案提高DNA提取效率。

磁珠法提取DNA

为了提高DNA提取的数量与质量，我们使用磁珠法提取DNA。

2ml 样本中加入 1ml 蛋白酶 K（10mg/ml，Invitrogen）和 3ml AL buffer（Qiagen



19075)在 50℃中消化 2-4 小时。消化后,加入 3ml100%IPA 和 150ul SSBs(Promega Magnesil KF - MD1471)。溶解过程在室温孵化 10min 使 DNA 沉淀且绑定在 SSBs 表面。加入 10ul 载体 RNA (1ug/ul) 通过共沉淀促进 DNA 绑定, 后在室温孵化 5min。

SSBs 和 DNA 复合物通过磁倾析分离和纯化剩余血清。在磁场范围内, 小心吸除上层血清, 切勿影响分离的 SSBs。移除上清后, 操作平台移出磁场, 加入 800ulAW1 缓冲液 (Qiagen19081), 缓慢搅匀并转移至 1.5ml 微量离心管中。这一过程重复 2 此即可纯化 DNA 绑定 SSBs 复合物。置入 70℃加热器中 10min 使残余上清液蒸发。

于 SSBs 中加入 45ul 水和 5ul M-Dilution 缓冲液 (ZymoD5001-2) 为盐转化做准备。溶液在 37℃下孵化 15min, 然后加入 100ul CT 转化试剂盒 (Zymo D5001-1,按照说明书加入 750ul 水和 250ul M-Dilution 缓冲液), 溶液暗箱中孵化 12-14h。样本在冰上冷却 10min。然后加入 400ulM-绑定缓冲液(Zymo D5001-3) 室温孵化 10min。接下来加入 5ul 载体 RNA(Qiagen1017647)室温下静置 5min。接下来将管子放入磁场中, 当 SSB 贴附于管壁后移除剩余的水。加入 200ul M-脱磺化缓冲液 (ZymoD5001-5) 并室温孵化 13min。孵化结束后立即加入 5ul 载体 RNA 样本继续孵化 3min。孵化结束后, 将试管放入磁场中, 同样方式吸除残余水分。加入 M-水洗缓冲液水洗, 并放入磁场去除水分, 操作重复 2 次。结束后将试管自旋向下让 SSB 移至管底并且再次放入磁场移除剩余水分。然后将试管置于 90℃加热板中让缓冲液中的乙醇蒸发。等待 SSB 晾干后, 加入 62ulM-洗涤缓冲液 (D5001-6) 在 90℃下孵化 10min。磁场下将液体转移至一个新的试管中, 加 50ul 洗涤液于 SSB 中 90℃孵化 10min, 将液体转移至先前的新试管中。由于液体蒸发和被 SSB 吸收, 最终的产量可以到达~100ul。

1.3.3 DNA浓度测定及质量检测

分离出的DNA浓度及质量检测通过分光光度计、凝胶电泳分析, 并用标准 DNA标志物比对实施。用Nanodrop2000测OD值及浓度记录数据, 提取的DNA总浓度>50ng/ul则视为满足实验浓度需求, 所提取的DNA置于-20℃保存备用。A260/A280的理想比值为1.6-1.8, 大于1.8时为RNA污染, 可用RNA酶进行处理, 小于1.6时为蛋白污染。A260/A230比值应在1.8-2.0之间, 小于1.8为盐浓度较高。



我们使用Qubit2.0荧光定量仪和Qubit dsDNA BR分析试剂盒精确定量DNA浓度。为了检测所提取的DNA的质量，对所提取DNA进行琼脂糖凝胶电泳成像，主带清晰副带少则表明提取DNA质量较高，污染少。

1.3.4全基因组测序及ctDNA俘获与分析：

将血浆中提取出的游离DNA上机测序，与DNA数据库中的序列进行比对确定ctDNA，并对其丰度进行定量。

①采用DNA建库试剂盒进行DNA建库，用Illumina NS500高通量测序平台进行测序，测序深度达到15000X，平均有效测序深度5000X；

②对测序原始数据预处理：Fastq 格式文件生成，序列比对，冗余片段去重；

③自动化分析流程：基本QC信息生成，样本配对准确性检查，样本交叉污染检查；

④ctDNA变异检测和定量分析：体细胞点突变、短插入/缺失片段，突变丰度=变异拷贝数/ml；胚系细胞点突变、短插入/缺失片段，突变丰度=变异拷贝数/ml；拷贝数变异；基因融合。

2) 手术干预前后外周血ctDNA总量变化及与CA199诊断敏感度的差异

2.1纳入对象

可行根治性手术或姑息性手术的胰腺癌患者。胰腺癌患者根据临床血清学指标和影像学上腹部增强CT和MRI可初步诊断。术中取胰腺病理组织明确诊断。

2.2血ctDNA和CA199检测

患者于术前及术后第三天抽取清晨空腹血5ml各两管，共计四管血液标本。选择应用DNA提取试剂盒提取DNA并测量其浓度（如前1.3.4所述）。CA199检测送至检验科常规定量检测血CA199。

2.3ctDNA诊断阈值和诊断敏感度与特异度

根据胰腺癌患者术前的ctDNA及CA199 水平且通过ROC曲线计算ctDNA的诊断阈值，诊断敏感度和特异度，对比ctDNA和CA199的诊断效率。用Youden指数（=敏感度+特异度-1）来绘制，敏感度和特异度的最高值作为诊断阈值。ctDNA值明显高于或等于阈值的即为阳性诊断，小于阈值的为阴性诊断。

2.4ctDNA用于评估治疗效果

通过比较术前和术后胰腺癌患者血浆ctDNA的数值变化差异，观察ctDNA用于评估手术治疗效果的可行性。



3) 胰腺癌疾病不同分期与ctDNA总量的关系

3.1纳入对象

可行根治性手术或姑息性手术的胰腺癌患者。胰腺癌患者根据临床血清学指标和影像学上腹部增强CT和MRI可初步诊断。术中取胰腺病理组织明确诊断。根据术后淋巴结病理结果及术中探查转移情况，对患者进行全面的TNM分期。具体分期系统见表2。

表2TNM及病理分期系统（AJCC第7版）

T-原发肿瘤	M-远处转移
Tx 原发肿瘤无法评估 T0 无原发肿瘤的证据 Tis 原位癌(包括 PanIN-3) T1 肿瘤局限于胰腺内,最大径 ≤ 2 cm T2 肿瘤局限于胰腺内,最大径 > 2 cm T3 肿瘤浸润至胰腺外 T4 肿瘤累及腹腔干或肠系膜上动脉	M0 无远处转移 M1 远处转移
N-区域淋巴结	分期
Nx 区域淋巴结无法评估	0 期 Tis N0 M0
N0 无区域淋巴结转移	IA期 T1 N0 M0
N1 有区域淋巴结转移	IB期 T2 N0 M0
	IIA期 T3 N0 M0
	IIB期 T1,T2,T3 N1 M0
	III期 T4 任何N M0
	IV期任何T 任何N M1

3.2 ctDNA总量检测及基因测序

通过DNA试剂盒提取患者术前空腹血中的肿瘤DNA, 上机测序后测定ctDNA总量（方法如前述1.3.4）。

3.3ctDNA总量及阳性突变基因与胰腺癌高危指标、临床资料、疾病分期之间的关系

记录搜集胰腺癌患者的年龄（ >60 岁或 <60 岁）、性别（男性或女性）、肿瘤大小（ >3 cm或 <3 cm）、肿瘤位置（胰头、胰体、胰尾）、病理分化程度（高分化、中分化、低分化）、肿瘤分期、淋巴结转移（有、无）等临床信息。连



续性变量采用SPSS软件中Mann-Whiney U检验，非连续性变量采用卡方检验。 $P < 0.05$ 即为统计学差异。该部分实验结果可以说明ctDNA总量与疾病恶性程度（早期、晚期）之间的关系，ctDNA联合宏观指标作为预测疾病发生风险和恶性程度的标志物的可行性。

4) ctDNA与胰腺癌无病生存期及总生存时间的关系。

4.1纳入对象

可行根治性手术或姑息性手术的胰腺癌患者。胰腺癌患者根据临床血清学指标和影像学上腹部增强CT和MRI可初步诊断。术中取胰腺病理组织明确诊断。

4.2 随访

所有胰腺癌患者行手术切除后行定期动态随访直至出现临床复发转移阳性表征和患者死亡。患者术后至发现阳性复发转移的时间为无病生存期。患者术后至胰腺癌疾病相关性死亡的时间为总生存期。具体随访时间点为术后1个月、三个月、六个月、一年、一年零六个月、两年、三年、五年。术后随访中ctDNA阳性水平发生时间和临床阳性肿瘤复发转移及影像学检查发生时间差即为ctDNA诊断获取肿瘤复发转移提前期，即ctDNA诊断获益时间。

4.3ctDNA和CA199检测

ctDNA提取和总量检测、CA199检测技术同前所述（1.3.4和2.2）。术前和术后每个随访时间点均采集血液两管分别用于ctDNA检测和CA199检测。

4.4ctDNA用于预测疾病生存的预测效能

运用SPSS软件中的Kaplan-Meier生存分析，术前ctDNA阳性诊断用于评估胰腺癌患者总生存期和无病生存期长短，得出ctDNA用于评估疾病预后的标志物的可行性。

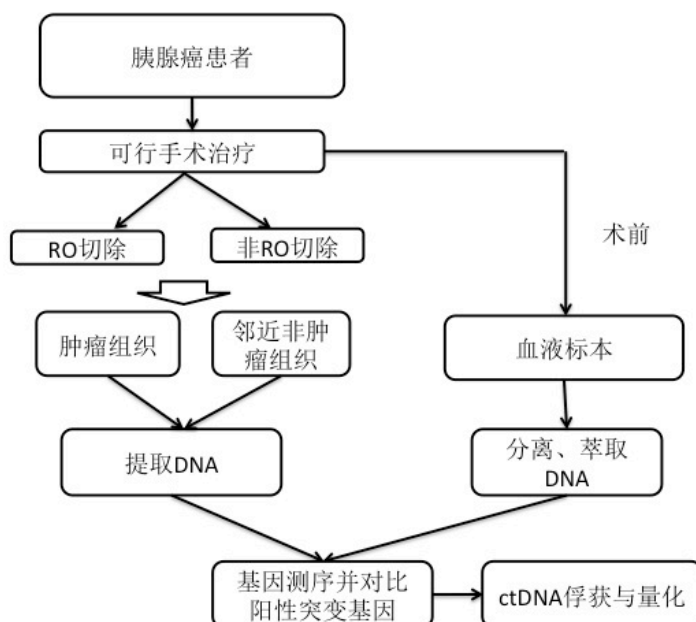
4.5比较ctDNA、CA199、影像学阳性诊断预测疾病预后的差异

记录每个纳入的患者每个随访时间点的ctDNA、CA199和影像学阳性诊断结果出现时间，即无病生存期的时间，比较各手段用于阳性复发评估的差异和优劣性。

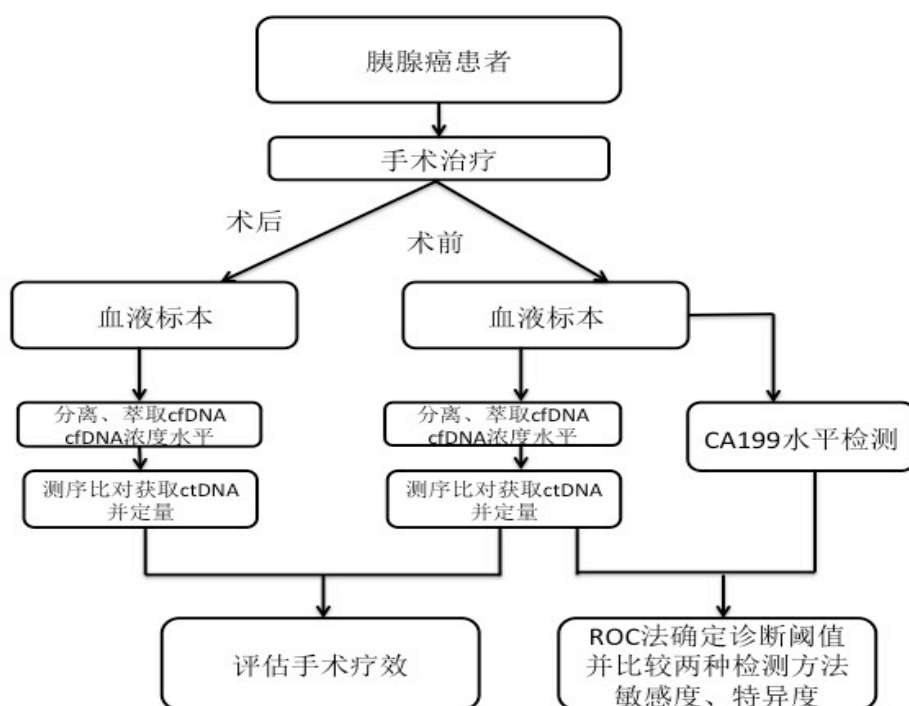


3.2技术路线图

1) 外周血ctDNA与胰腺癌病理组织阳性基因突变率及一致性

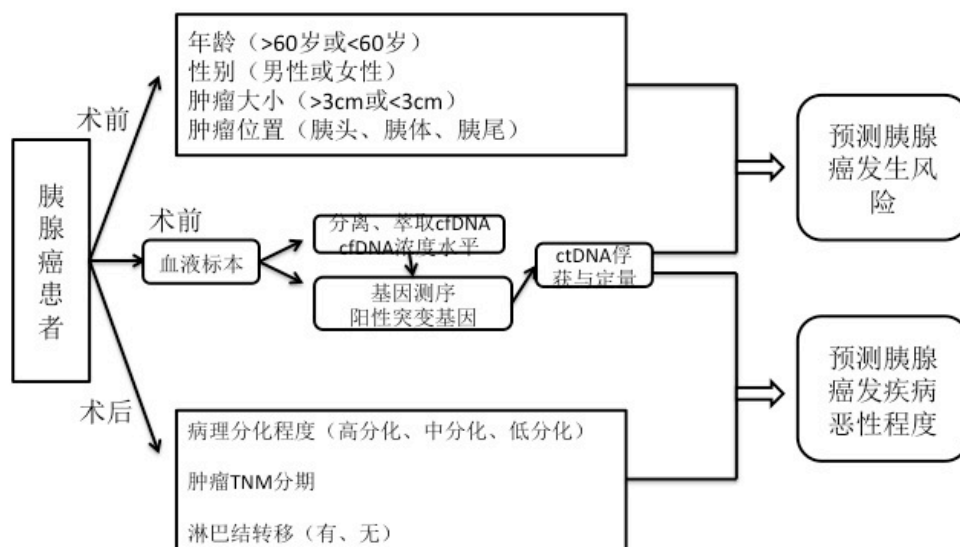


2) 手术干预前后外周血ctDNA和CTC总量的变化及与CA199诊断敏感度差异

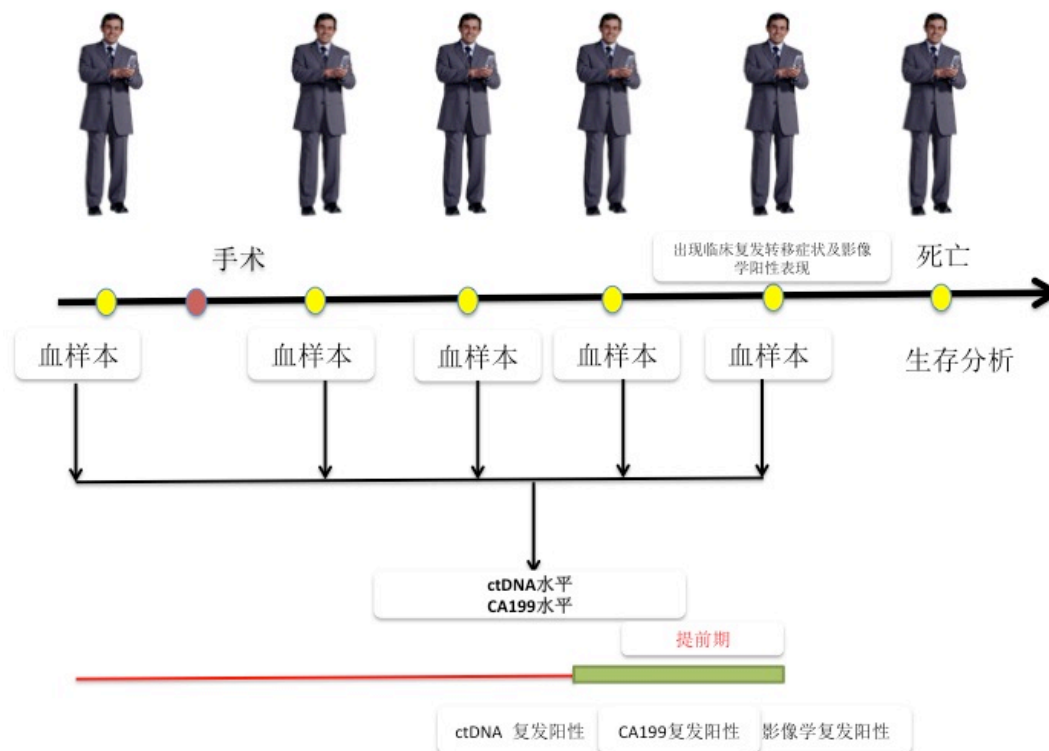




3) ctDNA总量用于评估胰腺癌疾病发生风险和疾病严重程度



4) ctDNA与胰腺癌无病生存期及总生存时间的关系





3.3可行性分析

①充分的理论基础

基于前面课题相关研究进展的描述，运用基因组学的理论和技术寻找新的肿瘤诊断标志物，这也将成为未来肿瘤特别是像胰腺癌这类预后较差的肿瘤研究的热门方向，终极目标是为了延长患者总体生存期。文献和我们的前期研究也表明胰腺癌患者血浆中能够提取到ctDNA并与组织标本中的基因测序结果一致。基于基因的人种特异性，全面建立本中心的胰腺癌患者的血液及组织标本基因数据库势在必行。因此这个课题在理论上是可行的。

②常规实验操作技术及备选实验方法。

该实验采用的血浆DNA提取技术及下一代基因测序技术是常规的实验技术手段，我们为了提高DNA的提取效率，借鉴其他中心运用的提取手段作为备用实验方法。根据实验经费，合理安排目标基因SNP检测手段作为备选手段。因此，这个课题的临床及基础实验设计是合理可行的。

③申请人科研能力和相关研究背景

申请人长期从事临床工作，现任四川省医学会急性胰腺炎协作组委员，从事肝胆胰外科工作十余年，擅长肝脏、胆道、胰腺、脾脏、十二指肠等脏器的肿瘤及炎症疾病的外科治疗，包括肝癌、胰腺肿瘤、慢性胰腺炎胰管结石、急性胰腺炎、胆囊结石及胆道结石的手术治疗，擅长运用腹腔镜微创技术开展手术治疗上述疾病；对相关疾病的研究总结撰写十余篇医学 SCI 论著，其中对胰腺疾病研究成果的相关文章被国际外科学领域中最顶级期刊《外科学年鉴》所收录发表。负责或参与研究四川省级课题 2 项，其中负责一项，到校经费 30 万。曾赴上海瑞金医院进修机器人手术技术，曾赴美国 Scintillon 细胞移植中心进修胰岛细胞移植技术。因此，申请人拥有较丰富的胰腺疾病特别是胰腺癌疾病的研究经验，具备完成本课题的科研能力。

④雄厚的技术力量及充分的实验条件

申请人所在的四川大学华西医院胰腺外科年收治胰腺疾病约600例，其中胰腺癌约200例。具有大数量的胰腺疾病特别是胰腺癌肿瘤疾病标本，病人覆盖云南、贵州、四川等西南片区，为基因相关基础实验及基因数据库建设创造样本条



件。

本课题参与者所在卫生部移植工程与移植免疫重点实验室，具备基础实验如基因提取、PCR、基因测序等的先进仪器设备。华西医院精准医疗中心，具备基因检测的测序设备及专业操作分析人员。因此该课题可在本单位研究中心完成。

课题组成员李懋、李柯宇，外科学博士在读，熟练掌握临床科研设计及研究方法，能完成DNA提取等基础研究技术。课题组成员王成世，移植科学与工程学博士在读，2014年9月至16年4月赴悉尼大学学习，参加了包括863项目的4项国家自然科学基金项目部分科研项目的工作，能熟练掌握了较全面的基础实验方法和科研技术。

课题组成员陆慧敏，助理研究员，长期从事胰腺疾病的临床工作及基础研究。参加胰腺癌课题相关的四川省科技厅课题2项，具备较全面的临床课题及基础科研理论知识及课题设计能力。

课题组成员胡伟明，教授，急性胰腺炎、胰腺肿瘤等专业方向，长期致力于胰腺外科临床及科研工作。通讯作者SCI论文8篇。主持四川省科技厅科技支撑项目，2009SZ0150, Beclin 1介导自噬与凋亡的分子机制及在胰腺癌中的作用，2009/01-2011/12, 20万元，已结题。曾获得教育部科学技术进步奖二等奖、中华医学会科学技术进步奖二等奖、四川省科技部科学技术进步奖一等奖。

4. 本项目的特色与创新之处；

本课题运用下一代测序技术这一新兴技术解决疾病诊断、预后等肿瘤患者诊治过程中的关键问题，做到基础科研与临床研究的有效结合，基础研究的实验结果直接用于指导临床疾病诊疗。通过微创便捷的抽血方式获取患者循环血DNA，第一手资料获取患者的遗传信息，运用基因测序的先进技术搜寻基因突变与疾病发生发展之间的关系，不论从实验设计还是实验结果都具有代表性、先进性。

胰腺癌由于发病率较低，临床样本的可贵，因此目前全世界各中心与本课题类似的课题结果报道还较少，就目前所知，国内还未见相关报道。由于基因存在人种特异性，因此建立本中心甚至亚洲人种胰腺癌血液及组织样本的基因数据库是具有深远的意义的，对于未来基因诊断、基因治疗打下理论基础。

在研究过程中，建立胰腺癌基因突变基因分离标准作业程序及胰腺癌患者



标本数据管理系统,除了不断提高基因研究相关技术水平,为提高萃取效率研发新的技术,为未来标准临床运用和商业化开展都具有指导意义。该标准化作业程序作为基础可以运用至其他类型肿瘤的基因相关研究中,成为肿瘤基因研究的标准方案。

5. 年度研究计划及预期研究结果(包括拟组织的重要学术交流活动、国际合作与交流计划等)。

2018.01-12 搜集患者术前血液及术中组织标本,提取血ctDNA和CA199检测,样本DNA检测。

搜集就诊于胰腺外科的胰腺癌患者,根据AJCC分级进行疾病分期,术前采集患者血液,提取DNA。手术采集患者组织样本。本阶段拟采集样本25-30例,样本DNA检测数量根据样本量决定,并创建临床实验室标本库及标本采集标准流程。

2019.01-12 搜集患者术前血液及术中组织标本,提取血ctDNA和CA199检测,样本DNA检测。搜集2018年度患者的随访标本。

继续按照2018年的运作模式搜集病例标本,本阶段拟采集新样本25-30例,并运用下一代基因测序技术对搜集到的血液及组织样本DNA进行基因突变测序,检测并分析胰腺癌相关基因的突变情况,统计分析ctDNA总量及阳性突变基因与疾病分期之间的关系。2018年随访血液样本DNA进行测序分析。总结研究结果,撰写论文1篇,参加会议1次。

2020.01-2020.12 搜集2019年的随访标本DNA提取与基因检测,分析随访资料

对2019年的随访患者随访标本进行DNA测序,继续采集前两年患者随访转归信息,分析ctDNA与疾病预后之间的关系。

2021.01-2021.12 术后随访,收集资料,逐步建立胰腺癌基因数据库。

继续采集2018-2019年患者随访信息,分析并整理课题研究的数据资料,建立数据库,撰写、发表论文2篇,完成课题结题报告,制定后续研究方案,准备相关课题的继续申报。

(二) 研究基础与工作条件

1. 研究基础(与本项目相关的研究工作积累和已取得的研究工作成绩);



我们检测了 15 名胰腺癌患者的血浆及组织学样本。

1.1 实验方法

我们采用传统的 DNA 提取技术，组织来源为手术中胰腺癌样本，术后均有病理学诊断。

基因测序采用的是 Illumina 公司的 Solexa 测序技术，其基本原理是 DNA 簇和可逆性末端终结，利用单分子阵列进行边合成边测序。

基本步骤为：

(1) 构建样品的测序文库。首先从待测样本的细胞中提取出基因组 DNA，随机打断成 100 到 200bp 大小的序列片段并且在每个片段的末端加上接头；

(2) 聚合酶链式反应扩增。开始需要把 DNA 进行解链，生成两条单链，接着把单链片段的两端分别固定在芯片上，形成的结构类似于桥的形状，然后进行桥式聚合酶链式反应扩增。经过聚合酶链式反应扩增后，将产生的数百万条 DNA 片段线性化等待测序；

(3) 可逆链终止物和合成测序。荧光标记过的脱氧核苷酸和反应引物加入到测序设备后，开始测序反应流程。在反应的过程中，每一个脱氧核苷酸都会释放具有荧光特性的焦磷酸物质。由于不同种类的脱氧核苷酸碱基有着独特的荧光标记，设备检测到脱氧核苷酸发出的专属荧光后会将 3'-OH 端丢掉，接着加入第二个脱氧核苷酸。重复上述步骤，循环直到模板序列全部被合成脱氧核苷酸双链结束。

1.2 实验结果

1.2.1 胰腺癌阳性基因突变分布

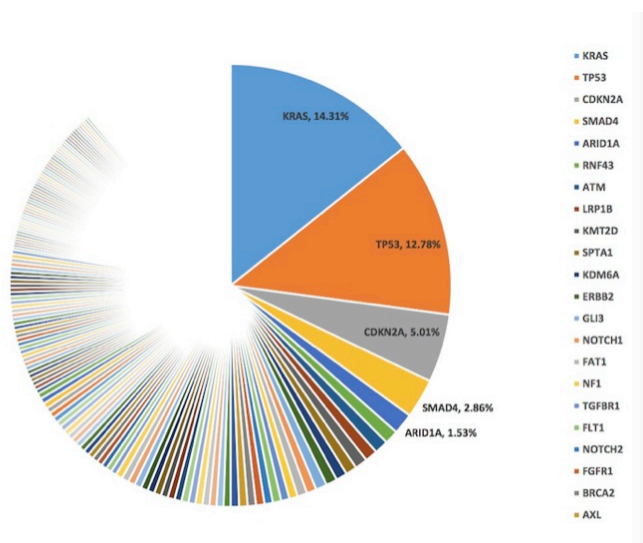


图 1 胰腺癌组织阳性基因突变分布



如图 1 所示，我们发现，阳性突变基因前五位分别为 KRAS（14.31%）、TP53（12.78%）、CDKN2A（5.01%）、SMAD4（2.86%）、ARID1A（1.53%），与国外报道主要突变阳性基因结果相符，总的基因突变种类及突变率需要扩大样本量支持。

1.2.2 基因突变类型

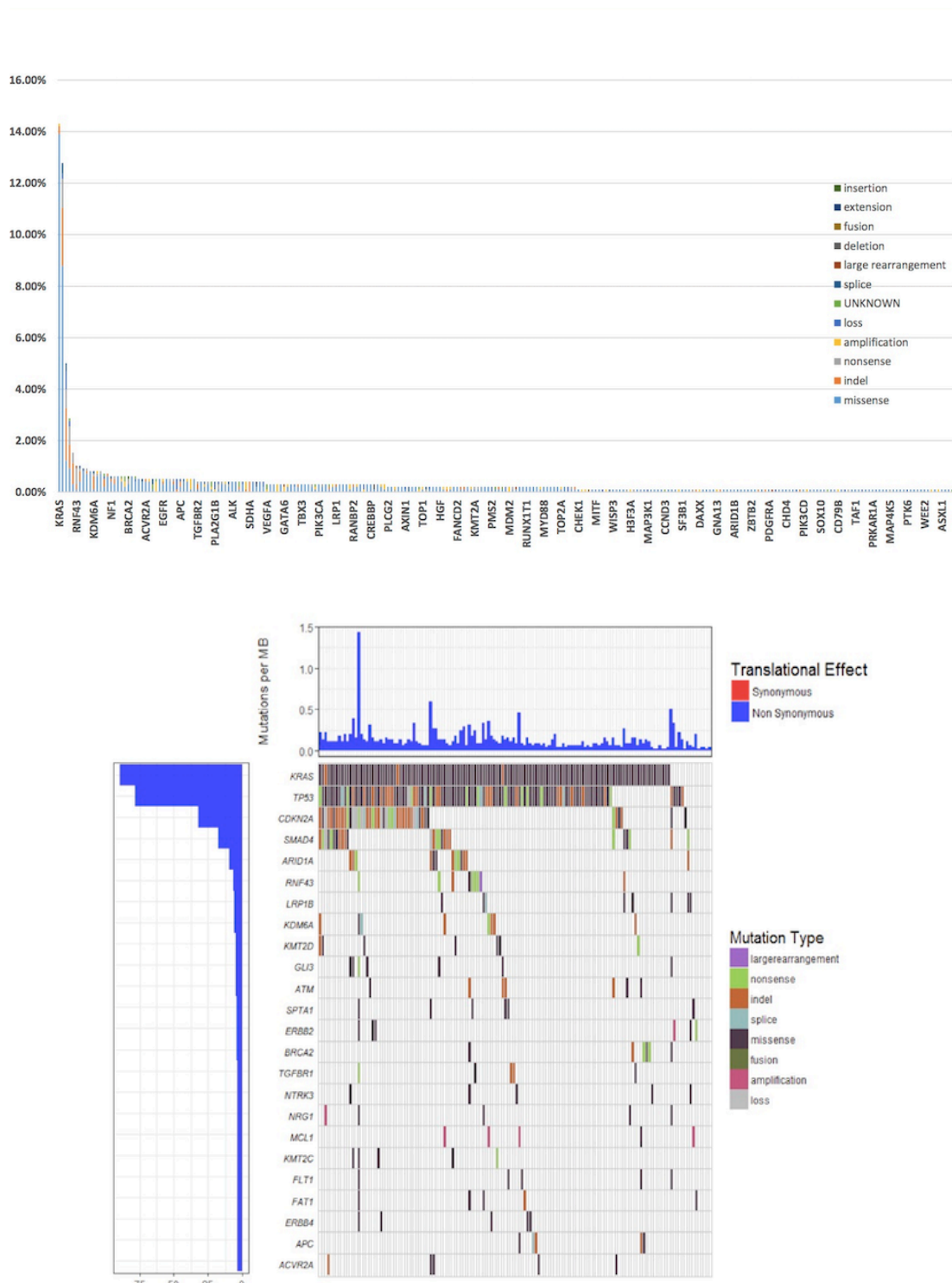


图 2 基因突变类型



我们还同样分析了突变基因的突变类型（如图 2 所示），结果发现，主要类型分别为基因大片段重组、无义突变、插入缺失、剪接、错义、融合、扩增、缺失等。每种突变基因都可能出现上述的突变类型。

1.2.3 血游离 DNA（cfDNA）的获取

①基本实验流程

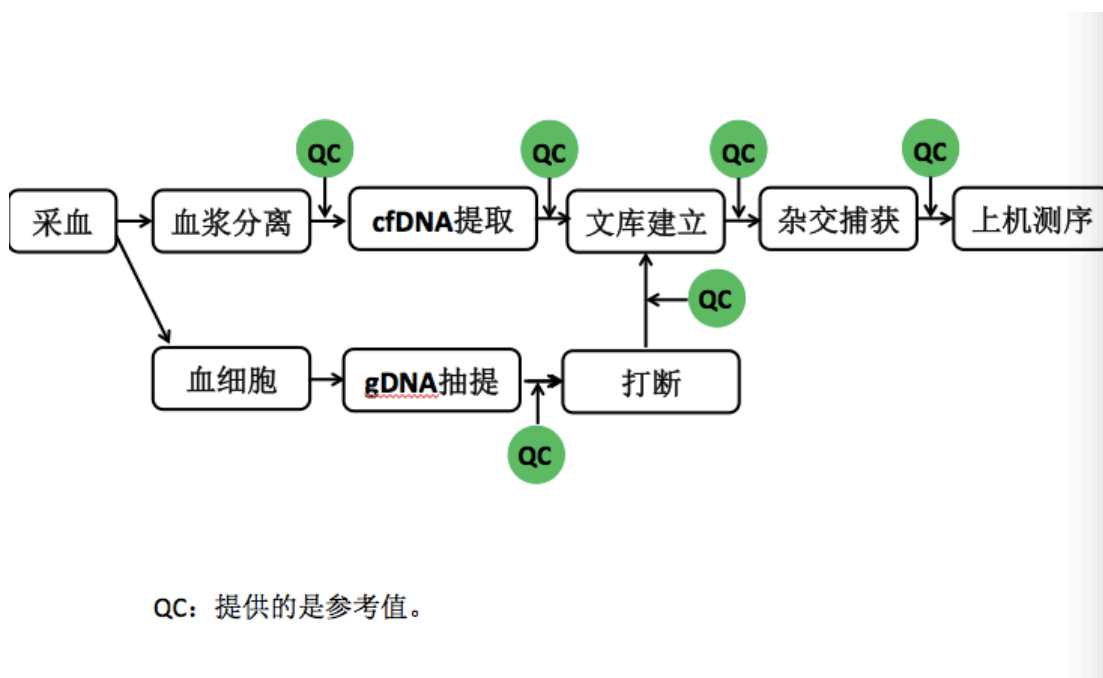


图 3 cfDNA 提取及检测流程

②实验结果

表 1 血 cfDNA 的浓度

样本 ID	提取体积(ml)	DNA 浓度(ng/μl)	DNA 总量(ng)
6253B01	0.2	59.8	5621.2
6272B01	0.2	10	936.2
6348B01	0.2	42.2	3882.4
6364B01	0.2	18.6	1748.4
6421B01	0.2	15.7	1475.8
6471B01	0.2	23.2	2180.8
6474B01	0.2	49.8	4581.6
6495W01	0.2	28.2	2566.2



6497P01	3	0.798	31.9
6497W01	0.2	49.4	4446
6623B01	0.2	33.2	3087.6
6634B01	0.2	53.6	5038.4
6712B01	0.2	18.2	1710.8
6735B01	0.2	29.6	2782.4
6768B01	0.2	40.6	3816.4

我们得出循环血 cfDNA 均值为 $29.6 \pm 4.49 \text{ ng/ul}$, cfDNA 总量为 $2782 \pm 417.0 \text{ ng}$ 。

表 2 KRAS、TP53、SMAD4 的 ctDNA 丰度

变异基因	丰度
KRAS	0.0697484482195
TP53	0.0659250777033
SMAD4	0.0641430073607

如表 2 所示,我们还检测了 cfDNA 中 ctDNA 的丰度, ctDNA 丰度=突变序列浓度/野生型核酸浓度。ctDNA 丰度表示为不同序列 (reads) 的百分比, 见下图。

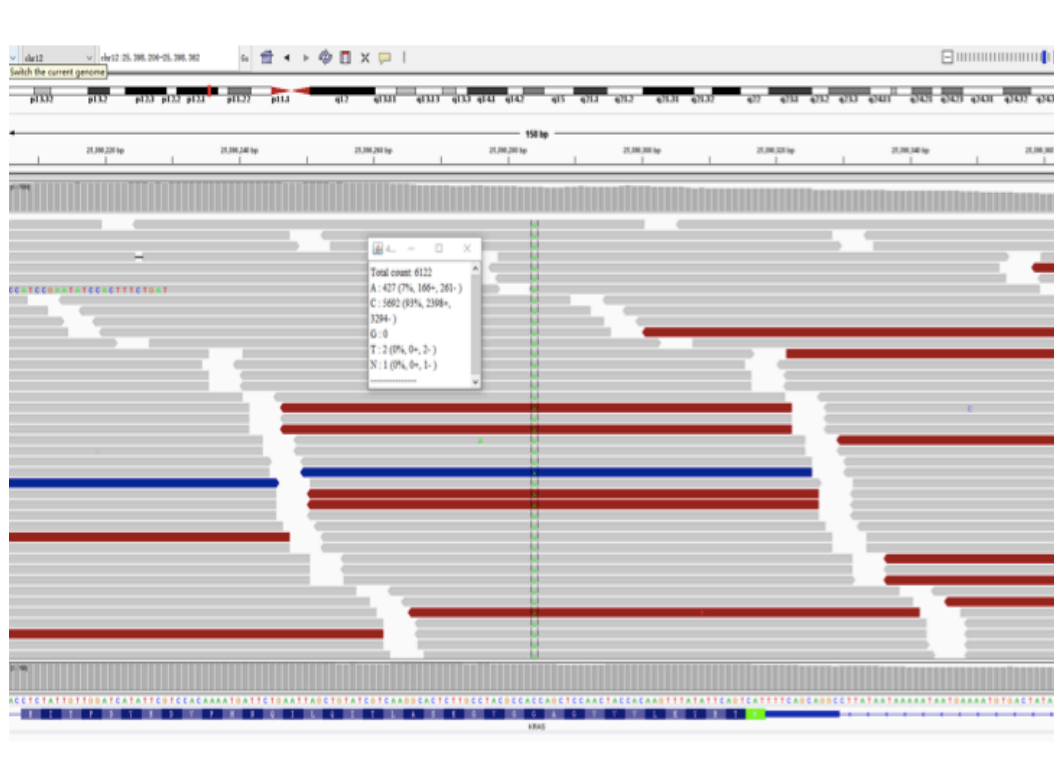


图 4 KRAS 基因突变情况

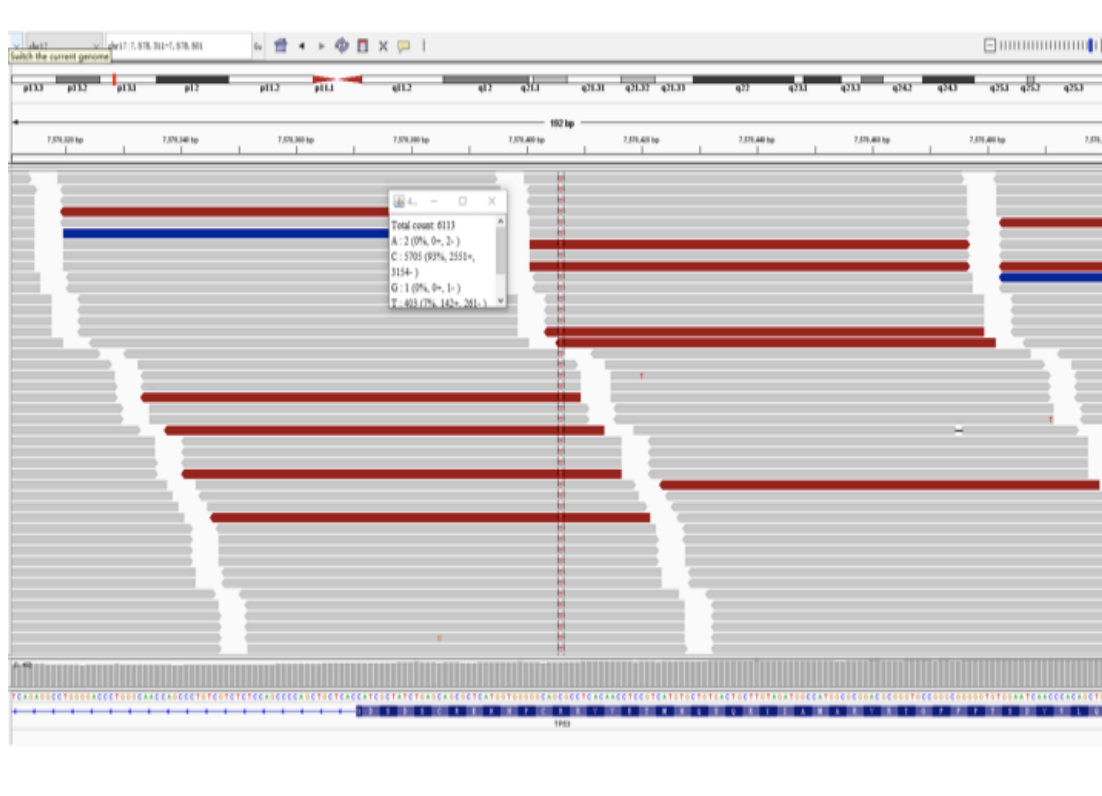


图 5 TP53 基因突变

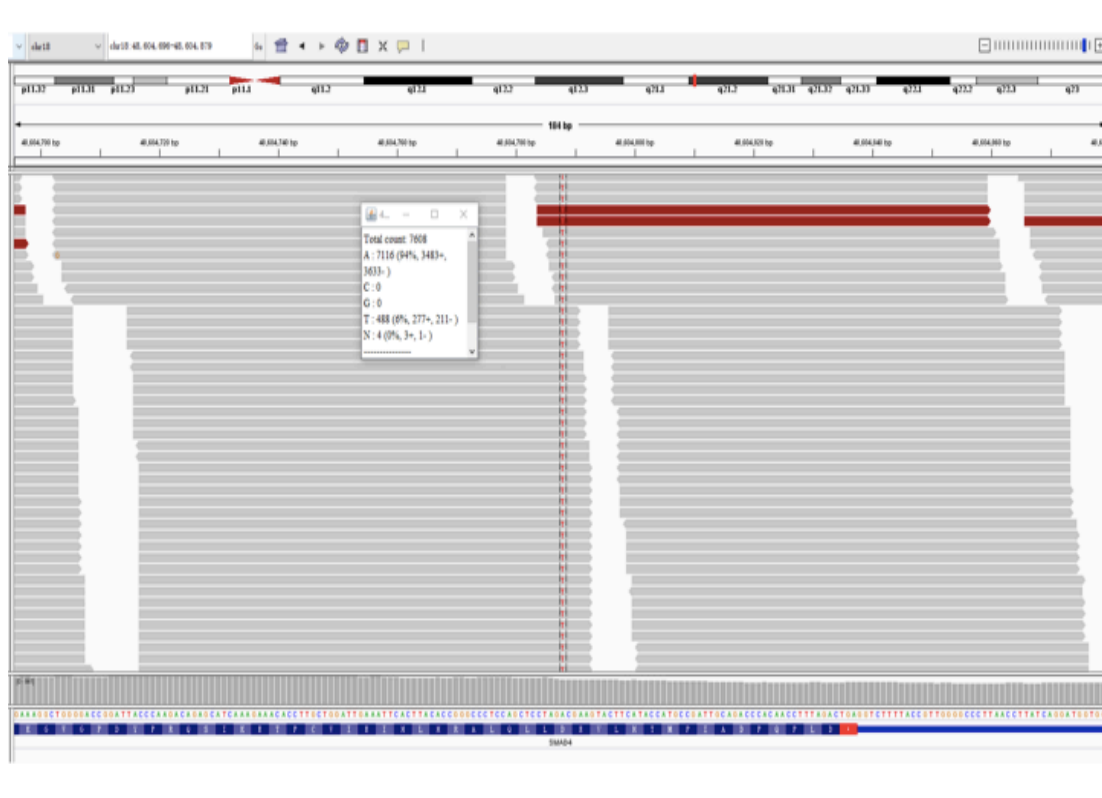


图 6 SMAD 基因突变

因此，我们的前期工作主要证实了本中心胰腺癌患者确实存在不同程度的基因突变，患者血液中可以提取到游离 DNA，两者的基因突变情况基



本一致。我们下一步的工作重心是继续搜集样本及随访工作，寻求基因诊断与疾病预后的关系。

2. 工作条件（包括已具备的实验条件，尚缺少的实验条件和拟解决的途径，包括利用国家实验室、国家重点实验室和部门重点实验室等研究基地的计划与落实情况）；

本课题参与者所在卫生部移植工程与移植免疫重点实验室，具备基础实验如基因提取、PCR 等的先进仪器设备。该实验室长期从事胰岛移植等细胞移植等研究，具备丰富的细胞学技术和设备，可进行原代、传代细胞培养和细胞生物学实验。华西医院精准医疗中心，具备基因检测的测序设备及专业操作分析人员。

3. 正在承担的与本项目相关的科研项目情况（申请人和项目组主要参与者正在承担的与本项目相关的科研项目情况，包括国家自然科学基金的项目和国家其他科技计划项目，要注明项目的名称和编号、经费来源、起止年月、与本项目的关系及负责的内容等）；

1. 四川省科技厅科技支撑计划，2016SZ0057，整合素及 talin 在急性胰腺炎微循环障碍中的作用及机制研究，2016/01-2018/12，20 万元，在研，参加。
2. 四川省科技厅科技支撑计划，2015SZ0074，整合素及其调节因子 kindlin 在血栓形成中的作用机制研究，2015/01-2017/12，30 万元，在研，主持。

4. 完成国家自然科学基金项目情况（对申请人负责的前一个已结题科学基金项目（项目名称及批准号）完成情况、后续研究进展及与本申请项目的关系加以详细说明。另附该已结题项目研究工作总结摘要（限 500 字）和相关成果的详细目录）。

无

（三）其他需要说明的问题

1. 申请人同年申请不同类型的国家自然科学基金项目情况（列明同年申请的其他项目的项目类型、项目名称信息，并说明与本项目之间的区别与联系）。

无

2. 具有高级专业技术职务（职称）的申请人或者主要参与者是否存在同年申请或者参与申请国家自然科学基金项目的单位不一致的情



况；如存在上述情况，列明所涉及人员的姓名，申请或参与申请的其他项目的项目类型、项目名称、单位名称、上述人员在该项目中是申请人还是参与者，并说明单位不一致原因。

无

3. 具有高级专业技术职务（职称）的申请人或者主要参与者是否存在与正在承担的国家自然科学基金项目的单位不一致的情况；如存在上述情况，列明所涉及人员的姓名，正在承担项目的批准号、项目类型、项目名称、单位名称、起止年月，并说明单位不一致原因。

无

4. 其他。

无



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：81773174），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>						

申报编号: 20ZDYF2954

立项编号: 2020YFS0264

四川省科技计划项目 任务合同书 (重点研发项目)

新型肿瘤标志物cfDNA甲基化用于胰腺癌早期诊断及

项目名称: 药物疗效评估的基础与临床研究

承担单位: 四川大学 (盖章)

项目负责人: (签字)

推荐单位: 四川省科学技术厅

立项经费: 20 (万元)

项目起止年限: 2020-01-01 至 2021-12-31

四川省科学技术厅制

填报说明

1. 填写任务合同书各项内容应实事求是，认真填写，表述明确。外来语要同时用原文和中文表达，第一次出现的缩略词，须注明全称。
2. 任务合同书的各个部分都必须填写，原则上不能有空白；确实无法填写的内容，请填“无”或“0”。
3. 任务合同书是项目经费拨付、中期检查、绩效评价（验收）的依据。任务合同书的内容应参照项目申报书填写，各项指标不能调减，可以调增。
4. 任务合同书必须通过四川省科技信息管理系统在线填写、上报，并经承担单位、推荐单位和四川省科技厅审核通过后签订，必须确保网上的四川省科技信息管理系统电子文档与最终打印稿一致。
5. 项目负责人将任务合同书打印一式四份纸质文档，A4纸，左侧装订，不得加用塑料等额外装订材料。由承担单位和推荐单位审核签署意见并加盖公章后，报送四川省科技厅相关处室进行纸质文档和网上的审核签署。纸质文档盖“四川省科学技术厅科研项目合同专用章”后，四川省科技厅存档一份，另三份返项目单位归档（推荐单位一份、承担单位一份、项目负责人一份）。
6. 任务合同书是四川省科技厅与项目承担各方的约束性文本，具有合同效力，其中四川省科技厅为甲方，项目承担单位为乙方，推荐单位为丙方。任务合同书受《中华人民共和国合同法》、《四川省科技计划项目管理办法》等相关法律法规和管理制度保护，由四川省科技厅负责解释。



项目信息表

项目名称	新型肿瘤标志物cfDNA甲基化用于胰腺癌早期诊断及药物疗效评估的基础与临床研究		
起始时间	2020-01-01	终止时间	2021-12-31
知识产权	<input checked="" type="checkbox"/> 申报单位独占 <input type="checkbox"/> 相关单位共享		

第一承担单位

单位名称	四川大学	社会信用代码	121000004000091949
单位地址	成都市一环路南一段24号	邮编	610065
职工人数	9000 人	单位性质	
单位法人	李言荣	推荐单位	四川省科学技术厅
联系人	刘力玮	联系部门	
联系人手机	18048504510	联系人电话	(028)85403107

合作单位

社会信用代码	单位名称	在本项目中分工

项目负责人

姓名	魏瑗琳	性别	女	出生年月	1988-05-07
学历/学位	博士/ 博士	职称	助理研究员	手机	18683958399
从事专业	临床医学外科学				

项目组人数

项目组人数	总计 <u>10</u> 人, 其中: 高级职称 <u>1</u> 人, 中级职称 <u>6</u> 人, 初级职称 <u>0</u> 人, 其他 <u>3</u> 人。
-------	---

项目概述

胰腺癌是一种常见的、肿瘤相关死亡率高的恶性消化器官肿瘤。早期诊断和早期手术治疗能使患者获益。肿瘤基因突变测序分析因受诊断敏感度低, 测序费用较高等因素限制了其临床应用。基因表观修饰甲基化与5羟甲基化在不同类型肿瘤中都有明显的特征, 能指导临床评估肿瘤疾病严重程度和预后。我们前期的研究结果也发现胰腺癌患者血液cfDNA中596个基因的5 羟甲基化表达有明显差异, 对肿瘤预测都有良好的灵敏度与特异性。本项目拟通过采集不同分期的胰腺癌肿瘤和匹配的血样样本, 检测基因甲基化与5羟甲基化表达与分布情况, 并与胰腺交界性肿瘤、慢性胰腺炎患者的样本进行对比, 评估cfDNA表观多组学修饰整合用于胰腺癌



诊断的临床应用价值。通过动态随访根治性切除的胰腺癌患者,在其进行临床化疗过程中不同阶段以及临床阳性复发时血基因甲基化与5羟甲基化表达与分布状态,评估血cfDNA表观多组学修饰用于胰腺癌预后及药物疗效评估的价值。

四川省科技计划项目任务书正式版



一、项目研究主要目标、研究内容、技术关键、技术路线和应用方案。(不超过3000字)

1、研究目标

①血 cfDNA 甲基化和 5-羟甲基化（5-hydroxymethylation, 5-hmC）表达与分布能够有效区分胰腺癌和胰腺交界性、良性肿瘤及胰腺慢性炎症和正常人群，能够预测疾病的严重程度，并能在随访中更早判断肿瘤阳性复发和疾病预后。

②血 cfDNA 甲基化和 5-hmC 表达与分布能有效预测化疗药物治疗效果和判断药物耐受。

2、研究内容

①胰腺癌组织中基因甲基化和5-hmC的分布情况且外周血cfDNA甲基化和5-hmC与胰腺癌组织中分布的一致性。根据临床标准流程搜集胰腺癌患者的组织标本，通过标准模式提取分离血cfDNA和组织DNA，并运用一种较高敏感性的化学标记法标记（hMe-Seal），进行甲基化富集处理与建库，用低输入全基因组游离5hmC测序技术全面分析中国胰腺癌基因甲基化和5-hmC表达水平和分布情况，并能区分肿瘤和正常人群、胰腺交界性肿瘤及慢性胰腺炎。通过比较胰腺癌患者血清中cfDNA甲基化和5-hmC分布与组织中表达的一致性与差异，确立血cfDNA甲基化和5-hmC用于胰腺癌诊断的可行性。并进一步比较甲基化与5-hmC两种组学之间的结果差异。

②手术干预前后外周血cfDNA甲基化和5-hmC表达变化及与CA199诊断敏感度差异。比较术前与术后血清中cfDNA甲基化和5-hmC表达变化来评估血cfDNA甲基化作为手术疗效评估及疾病随访的检测指标；通过ROC曲线计算cfDNA甲基化诊断胰腺癌的阈值和诊断效率。

③整合症状行为学、影像组学分析胰腺癌疾病不同分期与cfDNA甲基化和5-hmC表达与分布的关系。分析患者术后疾病分期、症状行为学和影像组学指标（肿瘤大小、肿瘤周边浸润、瘤周强化、低密度晕征、非光滑肿瘤边缘等）与血清cfDNA甲基化和5-hmC表达与分布的关系，建立基因表观修饰的量化分数与癌症疾病严重程度（早期及晚期）预测的统计模型，分析cfDNA甲基化预测早晚期癌症发生风险的可行性。

④cfDNA甲基化和5-hmC表达与分布与胰腺癌无病生存期及总生存时间的关系。记录患者从确诊至死亡疾病发展过程中血cfDNA甲基化的表达变化。对患者（传统临床病理根治性R0切除/非R0切除，cfDNA甲基化表达阴性/阳性）术后不同随访时间点的血cfDNA甲基化的表达测量确定“基因分子复发”诊断胰腺癌阳性复发的时间点，并与临床血清学、影像学阳性表现时间点之间比较，寻求基因表观修饰作为早期判断胰腺癌术后复发转移的分子诊断指标的优



势及临床运用价值。

⑤**cfDNA甲基化和5-hmC表达与分布预测化疗药物耐受**。已行根治性手术胰腺癌患者接受化疗的过程中，根据实体肿瘤疗效评估标准，在每一个治疗周期开始和结束时对患者进行一次实体肿瘤疗效评估，在患者出现药物耐受和疾病进展时，对患者的血液样本和转移组织样本进行基因甲基化分析，并与术前的检测结果进行对比，分析基因表观修饰作为药物治疗疗效标志物的可行性。

3、研究方法及技术关键

3.1 研究方法

1. 甲基化和 5-hmC 在胰腺癌基因组的分布情况

1.1 患者纳入排除标准

纳入标准：于四川大学胰腺外科就诊的胰腺癌患者。所有胰腺癌患者均能通过手术或穿刺行病理明确诊断。

排除标准：胰腺肿瘤非胰腺原发灶或包括胰腺癌等两种肿瘤同时并存的患者，非胰腺癌恶性肿瘤病史并有化疗、放疗、免疫治疗史。

1.2 胰腺癌组织采集

术中采集胰腺癌组织及癌旁组织各一，放于液氮罐后移至-80℃冰箱冻存待用。

1.3 DNA中基因甲基化和5-hmC的标记与检测

1.3.1 血液样本处理

采集胰腺癌患者和健康对照组的的全血10ml装入EDTA管中。样本再采集后的1h内进行实验操作。取收集的血液10ml，室温下以1600xg离心10分钟，吸取上层清液约5-6ml装入15ml管中，上清液于4℃、16000xg旋转15分钟后吸取上清装入2ml单位管中，上清液血浆可以用来DNA萃取或者-80℃冻存。

1.3.2 血游离DNA萃取

我们常规使用DNA提取试剂盒并遵循其说明书操作，见图2:



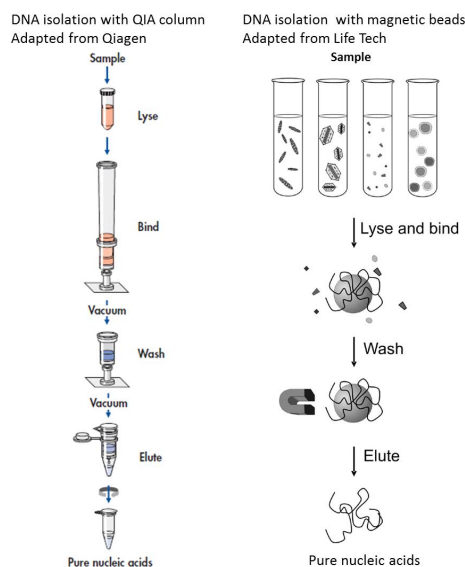
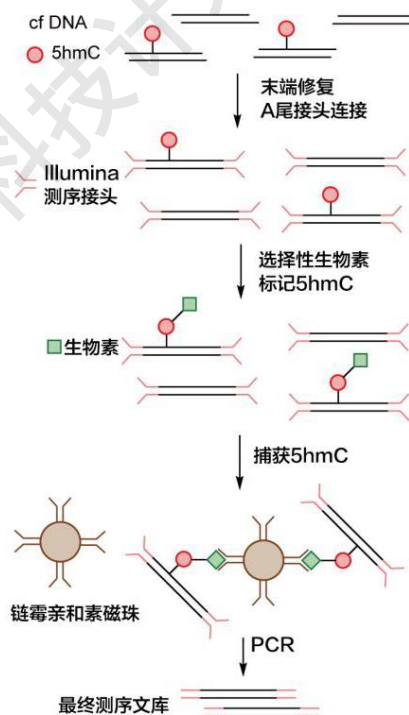
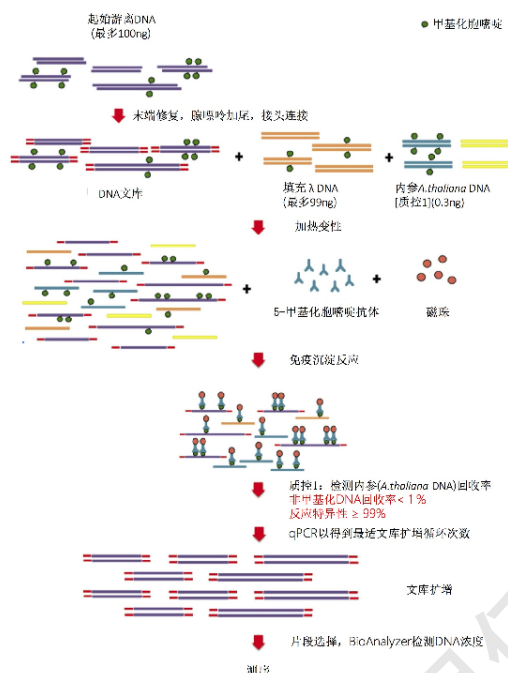


图2 DNA分离模式图（改良自试剂盒说明书）

1.3.3 建库与 5hmC 标记测序

我们将选择性化学标记（hMe-Seal）方法运用于低输入全基因组 5hmC 测序中。首先使用微量 cfDNA 建库方法对 cfDNA 进行非扩增二代测序文库构建，使用靶向化合物特异性富集 5hmC 文库片段，并利用链霉亲和素磁珠与生物素标记的 5hmC 之间的高度特异性捕获反应，最后使用建库时引入的接头引物进行 PCR 扩增富集产物并上机测序。应用这种方法能够成功对 10 ng 以内的极微量 cfDNA 样本进行建库和 5hmC 富集、扩增、测序。详见下图：





1.4

结果分析

对原始数据质控后，使用 Bowtie2 对测序数据进行序列比对，用 samtools 去除低质量和没有比对到参考基因组上的 reads，Picard 去重后提取测序片段的比对位置（包括染色体、起始位点、终止位点）。使用 bedtools 对长度大于 1kb 且在常染色体上的基因上覆盖的片段进行计数，并对所有的基因的片段数进行归一化处理计算 FPKM。对所有基因预筛选后（筛选方法见图 1），通过 Student's t-test 得到胰腺癌和健康人羟甲基化程度有差异的基因。通过 MACS2 得到细胞游离 DNA 羟甲基化和甲基化修饰片段富集区域，同时利用生成的 bigwig 文件结合 Integrative Genomics Viewer (IGV) 得到细胞游离 DNA 甲基化和羟甲基化差异区域的可视化结果。



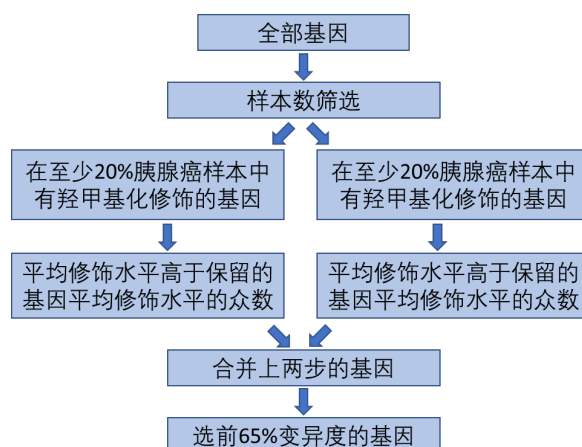


图 1 基因筛选方法

2. 血清游离 DNA 中基因甲基化和 5-hmC 的表达和分布水平用于胰腺癌诊断和预后的价值

2.1 血 cfDNA 和肿瘤组织中 DNA 甲基化和 5-hmC 分布的一致性

2.1.1 研究分组及患者纳入排除标准

①研究分组：胰腺癌组，慢性胰腺炎组，交界性肿瘤组，正常对照组。

②纳入排除标准：

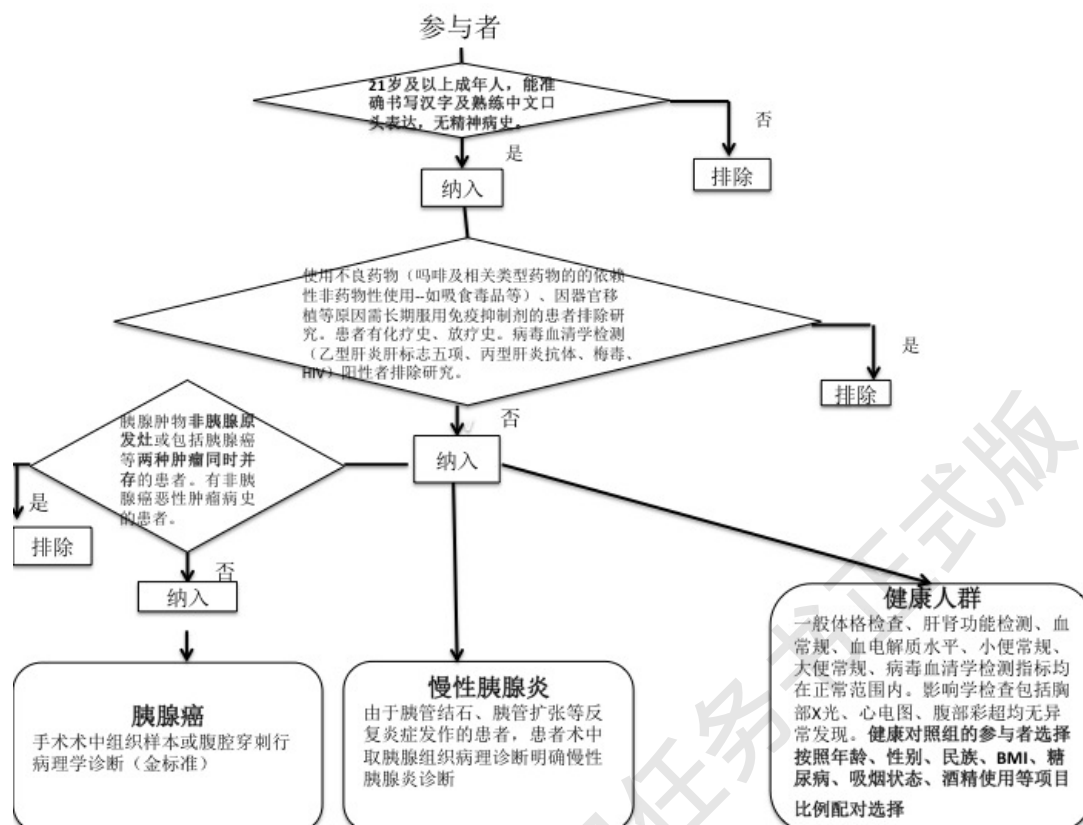
参与者纳入总标准：>21岁成年人，能准确书写汉字，熟练口头表达，无精神病史。探索性实验为将检验效能增加至80%，胰腺癌组纳入100人，正常对照组纳入150人。其余胰腺疾病由于患病率低，样本数目少，根据实际情况纳入，预计每组50人。

胰腺癌患者纳入排除标准：同 1.1，不再赘述。

慢性胰腺炎患者纳入标准：就诊于我科的慢性胰腺炎患者选取由于胰管结石、胰管扩张等反复炎症发作的患者，患者术中取胰腺组织病理诊断明确慢性胰腺炎诊断。胰腺交界性肿瘤包括：实性假乳头状瘤、神经内分泌肿瘤、导管内乳头状黏液瘤。纳入标准为达到指南手术标准行手术后有病理诊断报告。

健康人群纳入、排除标准：见图 1。





2.1.2 血液游离 DNA 中基因甲基化和 5-hmC 的分布情况

- 入组胰腺癌、胰腺交界性肿瘤、慢性胰腺炎备手术患者于术前抽取清晨空腹静脉血 10ml，正常参与者抽取清晨空腹静脉血做对照。
- 血液游离 DNA 中基因甲基化和 5-hmC 的检测：同前 1.3，不再赘述。
- CA199 检测送至检验科按规定量检测血 CA199 水平。

2.2 血液游离 DNA 中甲基化和 5-hmC 的表达水平用于胰腺癌诊断的诊断阈值及其诊断敏感度和特异度

通过 ROC 曲线计算诊断阈值，诊断敏感度和特异度，对比 CA199 的诊断效率。用 Youden 指数（=敏感度+特异度-1）来绘制，敏感度和特异度的最高值作为诊断阈值。表达水平值明显高于或等于阈值的即为阳性诊断，小于阈值的为阴性诊断。

2.3 联合症状行为学、影像组学分析血液游离 DNA 中基因甲基化和 5-hmC 分布与胰腺癌疾病分级、分期之间的关系

2.3.1 症状学指标

重点掌握参与者与本研究相关的临床资料，如下：



症状资料（与胰腺癌疾病相关的临床症状）：疼痛（评分）、肿胀等整体评估；黄疸、皮肤瘙痒等皮肤症状；腹泻、恶心呕吐等消化系统症状；疲乏/乏力、身体活动度及睡眠质量等相关症状。胰腺癌患者心理评估。所有指标均以量表和问卷形式表现；

2.3.2 影像组学预测胰腺癌预后的临床研究

通过CT、MRI等动脉期和门脉期影像图像中高通量MATLAB2014提取组学特征，采用LASSO特征选择算法，对图像进行降维、特征选择和构造组学标签的处理，建立包括影像学特征、影像图像特征和基因甲基化分布、CA199水平的诺莫模型（Nomogram），分析该模型的识别能力和临床应用价值。影像图像特征（Radiologic features）包括包括肿瘤大小、肿瘤周边浸润、瘤周强化、低密度晕征、非光滑肿瘤边缘、瘤旁水肿、瘤内低密度环、肿瘤内动脉显著、毛玻璃样改变、坏死等。

记录搜集胰腺癌患者的年龄（>60岁或<60岁）、性别（男性或女性）、肿瘤大小（>3cm或<3cm）、肿瘤位置（胰头、胰体、胰尾）、病理分化程度（高分化、中分化、低分化）、肿瘤分期、淋巴结转移（有、无）、神经侵犯（有、无）、血管侵犯（有、无）等临床信息。连续性变量采用SPSS软件中Mann-Whiney U检验，非连续性变量采用卡方检验。



表1 TNM及病理分期系统（AJCC第7版）

T-原发肿瘤	M-远处转移
Tx 原发肿瘤无法评估	M0 无远处转移
T0 无原发肿瘤的证据	M1 远处转移
Tis 原位癌(包括 PanIN-3)	
T1 肿瘤局限于胰腺内, 最大径≤2 cm	
T2 肿瘤局限于胰腺内, 最大径>2 cm	
T3 肿瘤浸润至胰腺外	
T4 肿瘤累及腹腔干或肠系膜上动脉	
N-区域淋巴结	分期
Nx 区域淋巴结无法评估	0 期 Tis N0 M0
N0 无区域淋巴结转移	IA期 T1 N0 M0
N1 有区域淋巴结转移	IB期 T2 N0 M0
	IIA期 T3 N0 M0
	IIB期 T1,T2,T3 N1 M0
	III期 T4 任何N M0
	IV期任何T 任何N M1

2.4 血游离DNA中基因甲基化和5-hmC表达与分布与胰腺癌疾病预后之间的关系

所有胰腺癌患者手术切除后定期动态随访。第一观察截止点为出现临床复发转移阳性表征，第二观察截止点为患者死亡。患者术后至发现阳性复发转移的时间为**无病生存期**。患者术后至胰腺癌疾病相关性死亡的时间为**总生存期**。仅临床行根治术的胰腺癌患者行术后动态随访，具体随访并采集血液样本的时间点为**术后1周、每三个月一次至患者出现临床阳性复发征象**。

根治性切除胰腺癌术后“分子复发”理论的验证

所有行根治性手术切除（R0 切除）的胰腺癌患者：

- ① 术后一周采集血样并行基因甲基化表达检测，观察阳性分布与阴性分布的患者术后无病生存期和总生存期的情况；
- ② 术后随访中基因甲基化阳性水平发生时间和临床阳性肿瘤复发转移及影像学检查发生时间差即为基因甲基化表达诊断获取**肿瘤复发转移提前期，即诊断获益时间**。
- ③ 在患者发生临床阳性复发转移时采集血样并行基因甲基化表达检测，与术前血中基因甲基化表达对比评价血cfDNA中基因甲基化表达用于预后检测的可行性。

3.血 cfDNA 中基因甲基化和 5-hmC 表达水平用于评估胰腺癌患者化疗疗效及药物耐受的应用

3.1纳入标准



行根治性手术切除（R0切除）的胰腺癌患者且体力状况ECOG评分 ≤ 2 分。主要器官状态正常：肝脏、肾脏、血液造血系统功能正常。

3.2 化疗方案

患者在术后均进行标准化化疗，详细记录药物干预开始时间、具体药物选择，化疗疗程。化疗方案为：化疗方式采用FOLFIRINOX 方案（oxaliplatin奥沙利铂, irinotecan伊立替康, fluorouracil氟尿嘧啶, and leucovorin亚叶酸）。方案为：奥沙利铂 $85\text{mg}/\text{m}^2$ 伊立替康 $180\text{mg}/\text{m}^2$ 5fu $400\text{mg}/\text{m}^2$ 快速滴注，亚叶酸钙 $400\text{mg}/\text{m}^2$ 5fu $2400\text{mg}/\text{m}^2$ 持续46小时滴注每两周一 次，共计12个周期。

3.3 实体肿瘤疗效评估标准

疗效评估采用《实体肿瘤疗效评估标准》(The Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, RECIST)1.1 版本。患者在化疗每个周期前行影像学评估。疗效分为完全缓解、部分缓解、疾病进展、疾病稳定。若患者在化疗开始后 3 个月内出现疾病进展即定义为药物耐受。

3.4 药物耐受患者血游离 DNA 中基因甲基化和 5-hmC 表达水平情况

3.4.1 血液样本采集

入组患者在每个化疗周期开始前采集其清晨空腹静脉血 10ml。

3.4.2 血游离DNA中基因甲基化和5-hmC分布检测

同前1.3，不再赘述。

3.5 血游离DNA中基因甲基化和5-hmC表达水平评估化疗疗效

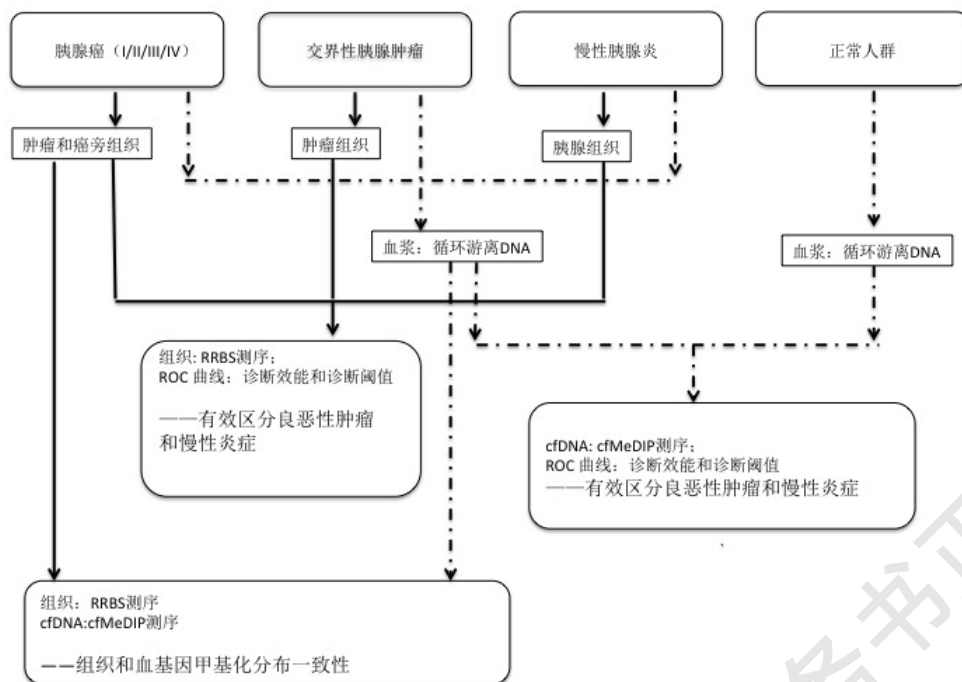
所有术后行化疗患者定期动态随访。第一观察截止点为出现药物耐受，第二观察截止点为出现临床复发转移阳性表征或疾病进展。

患者出现药物耐受时对患者进行血 cfDNA 中基因甲基化水平检测，并与术前、术后进行对比，通过观察患者出现药物耐受时基因表观修饰的改变，探索药物耐受相关的基础机制。

4、技术路线

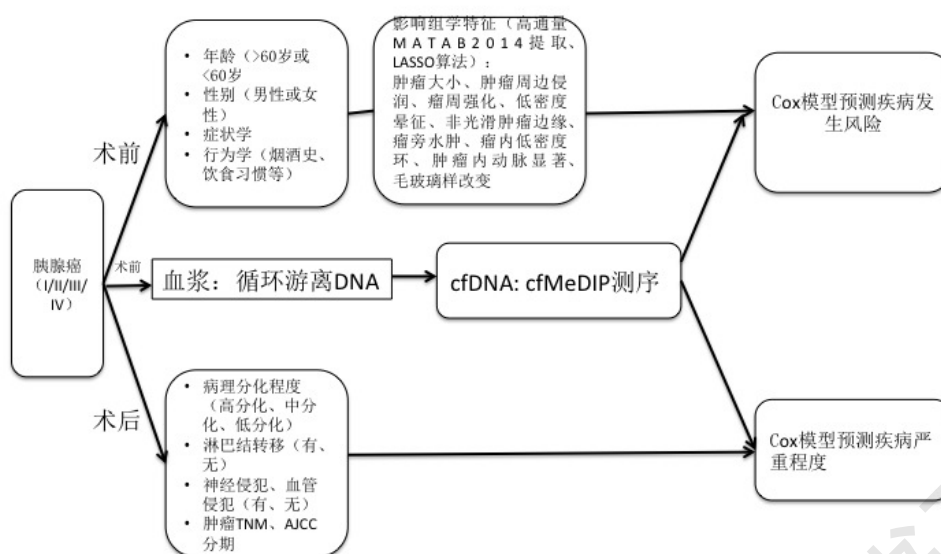
①外周血 ctDNA 甲基化分布与表达在胰腺癌诊断中的应用



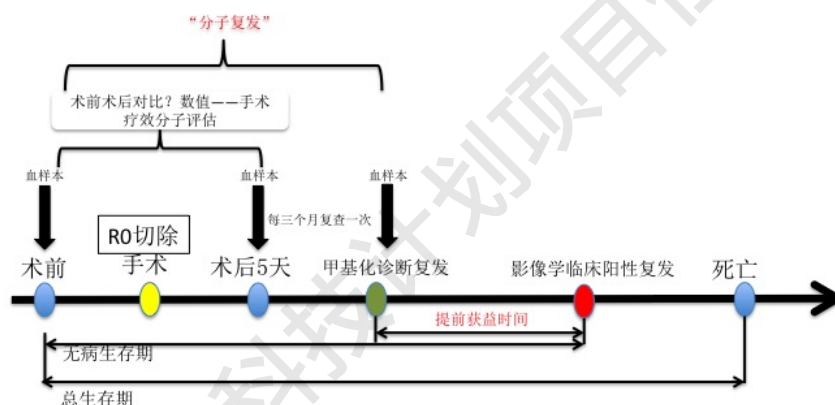


②联合影像组学分析血游离 DNA 中基因甲基化和 5-hmC 表达与胰腺癌疾病分级、分期之间的关系



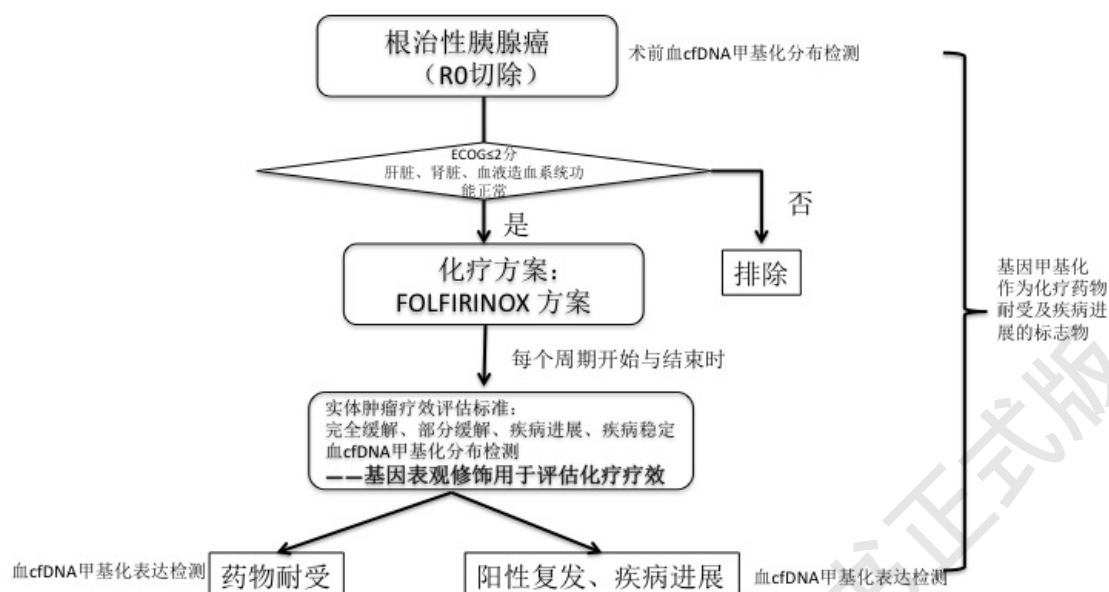


③血游离 DNA 中基因甲基化和 5-hmC 表达与胰腺癌疾病预后之间的关系



④血游离DNA中基因甲基化和5-hmC分布水平用于评估胰腺癌患者化疗疗效及药物耐受的应用





5、应用方案

该课题紧密围绕恶性肿瘤早期癌变的基因表观修饰分子可视化识别检测，发现新的诊断敏感度、特异性高、价格较合宜的肿瘤标志物，易于未来临床应用，建立临床信息、影像组学信号、病理特征与分子表征之间的整合用于胰腺癌早期诊断和预后评估。下一步可根据本课题的诊断结果阈值设定参考值和易于临床开展的检测试剂盒，向社区正常人群推广胰腺癌早期筛查，对正常高危人群进行定向专科性长期随访，为该标志物用于体检常规筛查提供数据支持。



补充说明

四川省科技计划项目任务书正式版



二、项目绩效目标和考核目标

技术创新目标

产品或技术名称	主要技术参数/性能参数	现有指标	项目完成时的预期达到指标
知识产权	发明专利授权 __0__ 项，发明专利受理 __0__ 项，实用新型专利授权 __0__ 项，实用新型专利受理 __0__ 项。		
技术标准制定	国际标准 __0__ 项，国家、行业标准 __0__ 项，地方、企业标准 __0__ 项		
认证、许可	新药证书 __0__ 项，新品种审定证书 __0__ 项，计算机软件著作权登记证书 __0__ 项，计量许可证书 __0__ 项，计量型式证书 __0__ 项，新药临床批件 __0__ 件，三类医疗器械注册受理证明 __0__ 件，三类医疗器械临床试验许可 __0__ 件		
论文专著	公开发表 __2__ 篇，引用 __6__ 次，出版专著 __0__ 部。		

示范应用目标

示范基地及规模	
中试线及规模	
推广应用目标	
人才引进及培训	办 __ 期培训班（现场会），培训农村科技人员 __ 人，培训企业科技人员 __ 人，培训科技管理人员 __ 人，培训医疗技术、推广人员 __ 人，培训技术人员 __ 人次，引进国（境）外专家__人__人次。

经济效益目标

/	现有指标	项目完成时的预期达到指标
销售收入	__ 万元	__ 万元
节创汇	__ 万元	__ 万元

社会效益目标

形成的公益性贡献、价值和可持续影响	本项目通过采集不同分期的胰腺癌肿瘤和匹配的血液样本,检测基因甲基化与5羟甲基化表达与分布情况,并与胰腺交界性肿瘤、慢性胰腺炎患者的样本进行对比,评估cfDNA表观多组学修饰整合用于胰腺癌诊断的临床应用价值。通过动态随访根治性切除的胰腺癌患者,在其进行临床化疗过程中不同阶段以及临床阳性复发时血基因甲基化与5羟甲基化表达与分布状态,评估血cfDNA表观多组学修饰用于胰腺癌预后及药物疗效评估的价值。本项目的研究成果为血cfDNA甲基化用于胰腺癌的早期诊断和预后评估提供理论数据,为下一步试剂盒的研发和临床应用打下基础。
-------------------	--

人才培养目标



高端人才	院士 ____ 人, 享受国务院政府特殊津贴专家 ____ 人, 国家杰出青年科学基金 ____ 人, 全国杰出专业技术人才 ____ 人, 长江学者 ____ 人, 新世纪优秀人才 ____ 人, 省有突出贡献的优秀专家 ____ 人, 省学术和技术带头人 ____ 人, 省学术和技术带头人后备人选 ____ 人, 其他国家级高层次人才 ____ 人, 其他省级高层次人才 ____ 人。
职称晋升	高级 ____ 人, 中级 ____ 1 ____ 人。
学位人才	在读博士后 ____ 1 ____ 人, 在读博士研究生 ____ 1 ____ 人, 在读硕士研究生 ____ 2 ____ 人, 毕业博士后 ____ 1 ____ 人, 毕业博士研究生 ____ 1 ____ 人, 毕业硕士研究生 ____ 2 ____ 人, 毕业学士 ____ 人。
吸纳大学生就业	博士后 ____ 1 ____ 人, 博士研究生 ____ 1 ____ 人, 硕士研究生 ____ 2 ____ 人, 本科生 ____ 人, 专科生 ____ 人。

科技报告的呈交情况

进展报告	年度报告 ____ 2 ____ 篇, 中期报告 ____ 1 ____ 篇
最终报告	____ 1 ____ 篇

关键核心考核指标(在上述指标中选择1-2项)

论文专著、人才培养目标

三、计划进度和阶段目标(以半年为单位, 叙述项目的进度安排和阶段目标任务。)

开始时间	结束时间	阶段目标
2020-01-01	2020-06-30	完成搜集预计50%患者术前血液及术中组织标本, 提取血cfDNA, 血样同时进行CA199检测, 血ctDNA及组织样本DNA行基因甲基化与5-hmC测序。
2020-07-01	2020-12-31	根据第一阶段采集情况, 完成搜集剩余50%患者术前血液及术中组织标本, 完成血ctDNA及组织样本DNA行基因甲基化与5-hmC测序
2021-01-01	2021-06-30	完成搜集2020年度患者的随访标本, 记录随访情况。进行第二阶段血 cfDNA 甲基化与5-hmC分布用于评估化疗药物疗效的临床研究。
2021-07-01	2021-12-31	根据上一阶段随访安排, 继续搜集第一阶段患者随访标本, 提取DNA与基因甲基化与 5-hmC检测, 分析随访资料。对第二阶段的临床试验进行随访, 记录生存结果。 逐步建立胰腺癌基因表观修饰信息数据库。



四、项目固定研究人员基本情况表

姓名	职称	所在单位	投入本项目的 工作时间 (月)
魏瑗琳	中级	四川大学	16
陈拥华	中级	四川大学	12
刘红英	中级	四川大学	12
李懋	中级	四川大学	14
郭子恒	中级	四川大学	14
成科	中级	四川大学	12
刘亚	其他	四川大学	16
李振录	其他	四川大学	16
袁珏	其他	四川大学	16
李昂	副高	四川大学	12



五、项目经费预算

项目经费预算表（表1）

单位：万元

序号	预算科目名称	财政科技经费	自筹经费	合计
1	一、经费支出	20	0	20
2	（一）直接费用	16.68	0	16.68
3	1、设备费	0	0	0
4	（1）购置设备费			
5	（2）试制设备费			
6	（3）设备改造费			
7	（4）设备租赁费			
8	2、材料费	5.23	0.00	5.23
9	3、测试化验加工费	3.80	0.00	3.80
10	4、燃料动力费			
11	5、差旅费/会议费/国际合作与交流费	0	0	0
12	6、出版/文献/信息传播/知识产权事务费	1.35	0.00	1.35
13	7、劳务费	6.30	0.00	6.30
14	8、专家咨询费			
15	9、其他支出			
16	（二）间接费用	3.32	0	3.32
17	其中：绩效支出	1.66	0	1.66
18	二、经费来源	20	0	20
19	1、省级财政科技经费	20	/	20
20	2、自筹经费	/	0	0

经费拨付进度（单位：万元）

科目	总经费	第一年	第二年	第三年	第四年	第五年
财政经费	20	20	0	0	0	0
承诺自筹	0	/	/	/	/	/



项目经费支出预算分解表(表2)

序号	单位名称	组织机构代码	单位类型	任务分工	项目负责人	合计	专项经费		自筹经费
							小计	其中:间接费用	
1	四川大学	121000004000091949	A、承担单位	承担单位完成所有研究工作	魏瑗琳	20.00	20.00	3.32	0.00
累计						20.00	20.00	3.32	0.00

填表说明:单位类型分为: A、承担单位(即第一承担单位),B、合作单位(即合作承担单位);组织机构代码指企事业单位国家标准代码,单位若已三证合一请填写单位社会信用代码,无组织机构代码的单位填写“000000000”;请手动设置为横表打印。



各科目预算说明表（表3）

（一）间接费用

本项目间接费用预算为 3.32 万元，其中绩效支出核定为 1.66 万元。

（二）材料费

材料类型	材料名称	与研究任务的相关性	预计金额 (元)	资金来源
主要材料	QIAamp DNA FFPE tissue 试剂 盒	受试者血液、肿瘤组织DNA提取	6000	专项经费
主要材料	cfDNA 甲基化检测试剂盒	用于基因甲基化检测，一个试剂盒供 25 个样本使用	13800	专项经费
主要材料	Illumina PE150	cfDNA 表观遗传新方法预示	10000	专项经费
主要材料	微量核酸建库试剂盒	微量 cfDNA 建库使用，150例样本，每例样本成本约150元	22500	专项经费
合计:专项经费 5.23 万元，自筹经费 0.00 万元，总经费 5.23 万元。				

（三）测试化验加工费

加工或测试内容	与研究任务的相关性	预计金额 (元)	资金来源
cfDNA甲基化测 序与分析	实验结果检测, 每个样本产生68G数据量	38000	专项经费
合计:专项经费 3.80 万元，自筹经费 0.00 万元，总经费 3.80 万元。			

（四）燃料动力费

设备名称	与研究任务的相关性	预计金额 (元)	资金来源
合计:专项经费 万元，自筹经费 万元，总经费 万元。			

（五）会议费/差旅费/国际合作交流费

预计差旅费	预计会议费	预计国际合作交流费
专项经费 万元，自筹经费 万元	专项经费 万元，自筹经费 万元	专项经费 万元，自筹经费 万元
总经费 万元	总经费 万元	总经费 万元
合计:专项经费 0 万元，自筹经费 0 万元，总经费 0 万元。		

（六）出版/文献/信息传播/知识产权事务费

费用名称	与研究任务的相关性	预计数量	预计金额 (元)	资金来源
------	-----------	------	-------------	------



版面费、文献检索费	论文出版过程中产生的版面费、文献检索费	2	13500	专项经费		
合计:专项经费 1.35 万元, 自筹经费 0.00 万元, 总经费 1.35 万元。						
(七) 劳务费						
聘用人员	参与的研究任务(承担的具体工作)	预计金额(万元)	资金来源			
研究生、博士后	研究生参与项目中需完成受试者纳入排除筛选、采集样本、临床数据收集、随访工作、数据统计、论文撰写等工作。 硕士研究生: 每个人每月1200元*2人*15个月=36000元。 博士研究生: 每个月1800元*1人*15个月=27000元	6.30	专项经费			
合计:专项经费 6.30 万元, 自筹经费 0.00 万元, 总经费 6.30 万元。						
(八) 专家咨询费						
咨询形式	与研究任务的相关性	预计金额(万元)	资金来源			
合计:专项经费 万元, 自筹经费 万元, 总经费 万元。						
(九) 其他支出						
费用名称	与研究任务的相关性	预计金额(元)	资金来源			
合计:专项经费 万元, 自筹经费 万元, 总经费 万元。						
(十) 设备费						
(1) 购置设备费						
设备名称	与研究任务的相关性	预计设备单价(万元/台件)	预计数量(台件)	预计金额(万元)	资金来源	
合计:专项经费 万元, 自筹经费 万元, 总经费 万元。						
(2) 试制设备费/设备改造费/设备租赁费						
设备名称	类型	与研究任务的相关性	预计单价	预计数量/单位	预计金额(万元)	资金来源
合计:专项经费 0 万元, 自筹经费 0 万元, 总经费 0 万元。						



六、项目承担单位承诺书

1. 我单位保证在项目实施（包括项目申请、评估评审、检查、项目执行、资源汇交、验收等过程）中所提交的材料真实、准确、有效。

2. 我单位将严格履行《四川省科技计划项目管理办法》、《四川省科技计划项目专项资金管理办法》等项目及经费管理办法文件规定，组织实施管理机构的职责和《项目任务合同书》中的各项约定，承诺项目经费专款专用、单独核算，为项目实施提供必要的条件和进行有效的管理与监督。

3. 我单位已按照《国家科技计划（专项、基金等）严重失信行为记录暂行规定》的规定建立了规范科研行为、调查处理科研不端行为的相关制度。

4. 我单位保证严肃调查处理或配合相关调查机构调查处理在实施项目过程中发现的科研不端行为，并及时向推荐单位和四川省科技厅报告相关调查处理结果。

5. 我单位已对任务合同书的内容和密级进行了审核，项目所属密级符合《中华人民共和国保守国家秘密法》、《科学技术保密规范》及《对外科技交流保密提醒制度》中的密级要求和条件，保证严格遵守国家有关保密规定，在科研活动和对外合作中不泄露国家秘密。

6. 我单位保证在项目执行期间及时做好科技报告的呈交工作，在项目完成后1年内做好项目验收工作，如项目通过验收或通过科技成果鉴定，及时做好项目的科技成果登记工作。

项目承担单位盖章：

年 月 日



七、项目研究人员承诺书

1. 本人承诺在项目实施（包括项目评估评审、检查、项目执行、资源汇交、验收等过程）中，遵守科学道德和诚信要求，严格执行《四川省科技计划项目管理办法》、《四川省科技计划项目专项资金管理办法》等相关科技计划管理及经费管理办法规定和《项目任务合同书》中的约定，不发生下列科研不端行为：

- （1）在职称、简历以及研究基础等方面提供虚假信息；
- （2）抄袭、剽窃他人科研成果；
- （3）捏造或篡改科研数据；
- （4）在涉及人体研究中，违反知情同意、保护隐私等规定；
- （5）违反医学伦理和实验动物管理规范；
- （6）其他科研不端行为。

2. 如本人被举报在项目实施中存在科研不端行为，将积极配合相关调查机构组织开展的调查。

3. 本人承诺严格遵守《中华人民共和国保守国家秘密法》、《科学技术保密规范》及《对外科技交流保密提醒制度》，在科研活动和对外合作中不泄露国家秘密。

项目负责人签字：

项目参与人签字：

年 月 日



八、任务合同书签订各方盖章及意见

甲方	单位名称	四川省科学技术厅	(项目合同章) 年 月 日 (预算合同章) 年 月 日
	分管厅领导	(签章)	
	分管处室负责人	(签章)	
	项目管理人	贺婧	
	电话及传真	86710082	
乙方	承担单位名称	四川大学	(承担单位公章) (合作单位公章) 年 月 日
	地址及邮编	成都市一环路南一段24号, 610065	
	电话及传真	(028)85403107	
	开户银行	中国建设银行股份有限公司成都建行川大支行	
	帐 号	51001870469059888666	
	合作单位名称		
丙方	推荐单位名称	四川省科学技术厅	(单位公章) 年 月 日
	电话及传真		



九、附加条款

1. 任务各方共同遵守《四川省科技计划项目管理办法》、《四川省科技计划项目专项资金管理办法》等相关管理办法，以下简称《办法》，并自愿接受其约束。
2. 任务合同书下达后，项目负责人全面负责项目的实施工作，各成员必须严格履行相应职责。
3. 项目实施过程中，项目的研究计划、主要研究人员、研究任务、经费预算等需要调整时，项目负责人应根据《办法》中有关规定，向甲方或乙方提出变更理由及其内容的申请报告，经甲方或乙方审查通过后实施。未经批准，项目负责人必须按原任务合同书履行。
4. 乙方必须接受甲方对项目进度及经费使用的监督和检查，并按甲方要求及时提供相关执行情况报告和相关统计报表，逾期不报，甲方有权暂停资助或终止项目。
5. 乙方因某种原因致使无法按计划执行而主动要求结题时，乙方应在规定时限内提出申请；如乙方未主动提出申请，甲方有权根据调查情况终止任务。
6. 任务执行过程中，若甲方无故终止任务，甲方无权追回拨给乙方的经费和乙方所购置的物资，甲方并承担善后处理所发生的费用。
7. 乙方应遵守任务合同书的约定，及时呈送符合撰写标准的科技报告，并获得科技报告收录证明。乙方可根据项目具体情况提出科技报告的保密和解密期限要求。乙方应在项目验收后按规定进行成果登记。
8. 任务到期完成后，乙方必须在三个月内完成验收准备，主动提交验收材料，并在任务到期后1年内完成项目验收手续。
9. 推荐单位作为任务合同书中的丙方加盖公章，负责协调项目的组织实施、经费使用及监督检查中出现的有关问题。
10. 项目研究成果及其形成的知识产权归项目承担单位所有。在特定情况下，国家根据需要保留无偿使用、开发、使之有效利用和获取收益的权利。乙方申报成果、专利、发表论文时需注明由“四川省科技计划资助”（英文标注：“Supported by Sichuan Science and Technology Program”）。乙方因实施本项目而引起的各种知识产权纠纷由乙方负全部责任。
11. 乙方对项目执行过程中产生的研究成果须及时采取知识产权保护措施，依法取得相关知识产权，并予以有效管理和充分使用。
12. 乙方指定项目组成员_____为本项目档案员，负责本项目档案的收集、积累和保存工作，要做到随时收集、编号登记、入袋保管，归档的重点是项目各个阶段形成的不同载体的文件材料和技术资料，特别是研究实验阶段形成的作为成果依据的原始材料。
13. 乙方在项目实施过程中应建立相应的规章制度，加强安全管理，确保人员及设备安全，并对科研安全负全部责任。
14. 乙方在项目实施过程中，应遵守科研诚信、科技行为廉洁的有关规定，不得向甲方、丙方工作人员行贿或报销应由个人支付的任何费用，被纪检监察机关或司法机关查证属实的，甲方有权终止项目实施并追缴拨付的全部科研经费。
15. 任务合同书是对签订各方都有法定约束力的协议，自各方签字盖章之日起正式生效，若有争议或纠纷，按《办法》有关条款处理。
16. 任务合同书未尽事宜，由甲乙双方协商解决。协商不成的，可向仲裁机构申请仲裁或向人民法院起诉，但在有关司法、仲裁结果生效之前，乙方应按照甲方要求继续履行或终止履行本任务合同书。

