

## 浙江省基础公益研究计划

## 项目计划书

立项编号	LGF21H160022		
项目名称:	LncRNA Neat1 介导 PD-1 免疫阻断在肝癌微波消融中的协同作用及机制研究		
计划类别:	公益技术研究计划		
项目类别:	社会发展		
项目负责人:	金冲	电话:	
电子邮箱:	ymqys3@yahoo. com. cn		
通信地址:	浙江省/台州市/椒江区 . 台州市经济开发区东海大道 999 号		
邮政编码:	318000		
依托单位:	台州市中心医院(台州学院附属医院)		
联系人:	朱杰	电话:	
申报日期:	2020-11-18		

浙江省科学技术厅  
浙江省自然科学基金委员会  
二〇二〇年制

## 填写说明

- 一、收到《浙江省基础公益研究计划项目立项通知》后，请认真阅读省基础公益研究计划有关项目和经费管理办法，按要求认真填写《浙江省基础公益研究计划项目计划书》（简称《计划书》）。填写《计划书》时要求科学严谨、实事求是、表述清晰、准确，并认真阅读本填报说明。
- 二、项目负责人应当按照申请书的内容填写《计划书》，除根据确定的资助额度对项目经费预算进行适当调整外，不得对申请书的其他内容进行变更。依托单位应对《计划书》内容进行审核。
- 三、《计划书》经项目负责人和依托单位签字盖章，并经省自然科学基金委员会办公室审核批准后，将作为项目执行、检查、验收的依据。
- 四、资助项目的有关研究成果，包括论文、专著、专利、获奖等情况，均须按规定标注“浙江省基础公益研究计划项目”（属于省自然科学基金的可标注“浙江省自然科学基金项目”）和立项编号。
- 五、省基础公益研究计划的项目经费管理（包括省级财政拨款经费、联合资助经费、自筹经费）依照省财政关于科技项目的有关经费管理要求执行，非省级财政拨款单位联合资助经费参照执行。

## 基本信息

负责人信息	姓 名	金冲	性别	男	出生日期	
	电 话		E-mail		ymqys3@yahoo.com.cn	
	证件类型	身份证 18 位	证件号码			
项目基本信息	项目名称	LncRNA Neat1 介导 PD-1 免疫阻断在肝癌微波消融中的协同作用及机制研究				
	英文名称	Synergistic effect and mechanism of LncRNA Neat1-mediated PD-1 immune blockade in microwave ablation of hepatocellular carcinoma				
	计划类别	公益技术研究计划	项目类别	社会发展		
	项目研究阶段	基础研究				
	国家自然科学基金学科代码	H1612				
	国家自然科学基金学科代码名称	医学科学部/肿瘤学/肿瘤综合治疗				
	国家标准学科分类与代码	3202710				
	国家标准学科分类与代码名称	临床医学/外科学/普通外科学				
	预计研究年限	2021 年 1 月 至 2023 年 12 月				
	项目总经费	10	其中省财政资助经费	10 万元		
	中文关键词	肝癌; 微波消融; PD-1 肿瘤免疫; 非编码 RNA				
英文关键词	hepatology; microwave ablation; PD-1 tumor immunity; non-coding RNA					
中文摘要	<p>项目研究内容与目标:</p> <p>微波消融是肝癌的根治性治疗手段之一, 具有微创、安全、经济、恢复快等优势, 而且可诱导肿瘤免疫反应, 但具体调控机制不明, 本项目结合微波消融协同 PD-1 免疫阻断增强肝癌微波消融效果的背景, 在我们新近研究发现 PD-1 免疫阻断后 lncRNA Neat1 和 HNRNPA1 表达水平均下调, 后者受 HNRNPA2 调控, 而且 lncRNA Neat1 可与 miRNA-218-5p 结合, 其下游靶标蛋白 AKT3 表达下调的研究基础上, 提出 1) 核内 lncRNA Neat1 通过 HNRNPA2 下调 HNRNPA1, 直接促进靶标 SMAD2 表达; 2) 胞质内下降的 lncRNA Neat1 通过 miRNA-218-5p 下调蛋白 AKT3 的表达, 进而抑制 PI3K-AKT 信号传导通路的激活, 两者协同治疗肝癌的假说, 并将以肝癌小鼠模型为研究对象, 结合细胞学试验, 利用基因过表达和基因沉默技术, 观察 lncRNA Neat1 对微波消融及 PD-1 免疫阻断的影响, 和对肝癌的协同抑制作用, 目的在于明确 lncRNA Neat1 介导 PD-1 免疫阻断在肝癌微波消融中的协同作用及调控机制, 为肝癌的治疗提供新的思路和依据。</p>					

## 项目组成员

编号	姓名	成员类别	证件号码	性别	单位名称	电话
1	金冲	负责人		男	台州市中心医院(台州学院附属医院)	
2	王昆鹏	会员成员		男	台州市中心医院(台州学院附属医院)	
3	江浩	会员成员		男	台州市中心医院(台州学院附属医院)	
4	汪列智	会员成员		男	台州市中心医院(台州学院附属医院)	
5	阮思涵	会员成员		女	台州市中心医院(台州学院附属医院)	
6	莫经刚	会员成员		男	台州市中心医院(台州学院附属医院)	
7	冯一浮	会员成员		男	台州市中心医院(台州学院附属医院)	

## 项目经费

项目总经费 10 万元，其中省财政资助经费 10 万元（第一批财政拨款 10 万元，第二批财政拨款 0 万元），联合资助经费 0 万元，自筹经费 0 万元。

科研经费	名称	项目总经费预算 (万元)
直接费用	1、设备费	0.00
	2、材料费	6.00
	3、测试化验加工费	1.50
	4、燃料动力费	0.00
	5、差旅费、会议费、合作、协作研究与交流费	0.50
	6、出版/文献/信息传播/知识产权事务费	0.50
	7、人员劳务费	0.00
	8、专家咨询费	0.50
间接费用	9、间接费用	1.00

需增添的仪器及设备:

无

## 研究计划

### 2021 年度

研究内容: 1)验证联合 PD-1 肿瘤免疫和微波消融抑制肝癌小鼠进展;  
2)确认细胞核内 lncRNA Neat1 作用的靶基因为 SMAD2;  
3)确定 HNRNPA2 与 HNRNPA1 之间的相互作用。

研究目标: 明确细胞核内 lncRNA Neat1 与 HNRNPA2 结合,从而上调 HNRNPA1 表达水平,促进 SMAD2 的表达,调控肿瘤免疫反应。

### 2022 年度

研究内容: 1) 验证 lncRNA Neat1、AKT3 的功能;  
2) 共转染 lncRNA Neat1 和 miRNA-218-5p, 验证联合治疗下调 lncRNA Neat1 的表达水平,上调 miRNA-218-5p 表达水平,从而下调 AKT3 表达水平,进而通过抑制 PI3K-AKT3 信号传导通路的激活,调控肿瘤免疫反应;  
3) 在 lncRNA Neat1 基因敲除小鼠中,进一步验证 lncRNA Neat1 的 ceRNA 机制。

研究目标: 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,调控肿瘤免疫反应。

### 2023 年度

研究内容: 1)确定 HNRNPA1 与 lncRNA Neat1 之间存在相互作用;  
2)确定 HNRNPA1 对 lncRNA Neat1 下游基因转录水平和蛋白水平的影响;  
3)进一步验证和阐明 HNRNPA1 参与 lncRNA Neat1 细胞核内外调控的分子机制;  
4) 全面分析、整理数据,投稿 SCI 论文,准备结题。

研究目标: 阐明 lncRNA Neat1 介导细胞核内外两条通路协同调控微波消融与 PD-1 免疫治疗的分子作用机制。

## 预期研究成果:

1. 本项目执行期间,拟发表SCI论文1-2篇(单篇IF>5分或IF>3分2篇);
2. 本项目的成功实施将进一步证实PD-1肿瘤免疫与微波消融治疗肝癌的协同作用。阐明LncRNA Neat1在二者协同作用中的调控机制,有望为肝癌的治疗提供新的思路和治疗靶点,研究结果将有力促进该项目的临床转化,有望在临床上作为一种新的治疗方式,进行推广。同时本项目还将作为重点研究基础继续申报国家自然科学基金项目,参与省市级科技进步奖评奖;
3. 本项目执行期间协助培养硕士研究生1-2人,协助人员职称晋升2人。培养肝癌基础研究方面的青年科技骨干1人,进行研究相关学术交流1次;
4. 在后续研究中我们将积极推荐该研究成果的临床转化。

## 研究年限期间预期完成的成果:


一、预期成果产出情况								
论著	发表科技论文	2篇	出版科技著作	0部	共计出版科技专著: 0万字			
专利	发明专利申请	0件	实用新型专利申请	0件	发明专利授权	0件	实用新型专利授权	0件
技术标准	国际标准	0项	国家标准	0项	行业标准	0项		
	地方标准	0项	企业标准	0项				
二、本课题预期人才培养情况								
研究期限内项目组成员晋升职称人数: 2				研究期限内参与本项目的毕业研究生人数: 1				
三、预期成果转化情况								
是否能实现成果转化: 能转化								
成果转化形式	新产品	0项	新工艺	0项	新技术	1项	新品种	0项
	开创性的产品或技术: 微波消融与肿瘤免疫协同治疗肝癌							
	替代国外进口的产品或技术: 请填写							
经济效益	提升销售	0万元, 测算依据: 请填写						
	产生利税	0万元, 测算依据: 请填写						
环境治理	节能	否	节水	否	减排废气	否		
	减排废物	否	减排废水	否				
治理能力	对公共卫生起到明显提升作用: 是			对公共安全起到明显提升作用: 否				
	对社会治理起到明显提升作用: 否			对防灾减灾起到明显提升作用: 否				



## 签字和盖章页

我接受浙江省基础公益研究计划的资助,将按照项目申请书、批准通知和计划书负责实施本项目,严格遵守浙江省基础公益研究计划相关项目和经费管理规定,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。

项目负责人(签字):

  
2020年12月28日

我单位同意承担上述浙江省基础公益研究计划项目,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,严格遵守浙江省基础公益研究计划相关项目和经费管理规定,并督促实施。

依托单位(公章):



浙江省自然科学基金委员会办公室审批意见:

同意。

浙江省自然科学基金委员会办公室







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

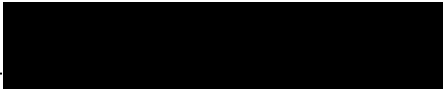
疗法抑制肝癌进展的机制研究

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 

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		主任医师	台州市中心医院		4	项目指导		
		江浩	男		主治医师	台州市中心医院		6	协调安排		
		冯一浮	男		医师	台州市中心医院		8	统计分析		
		王松	男		医师	台州市中心医院		8	细胞实验		
		陈昕怡	女		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]。

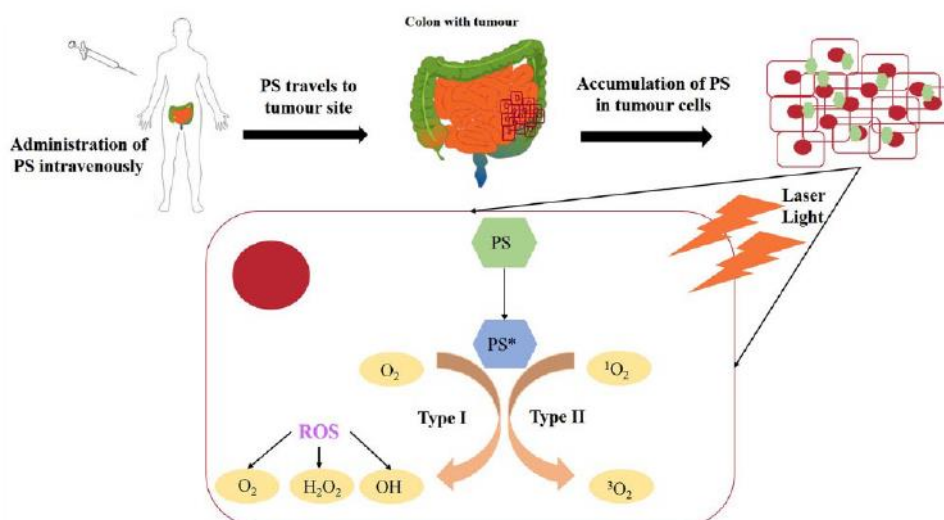


图 1 光动力治疗 (Photodynamic therapy, PDT) 的基本原理图 (参考相关文献)

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 $\alpha$  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。

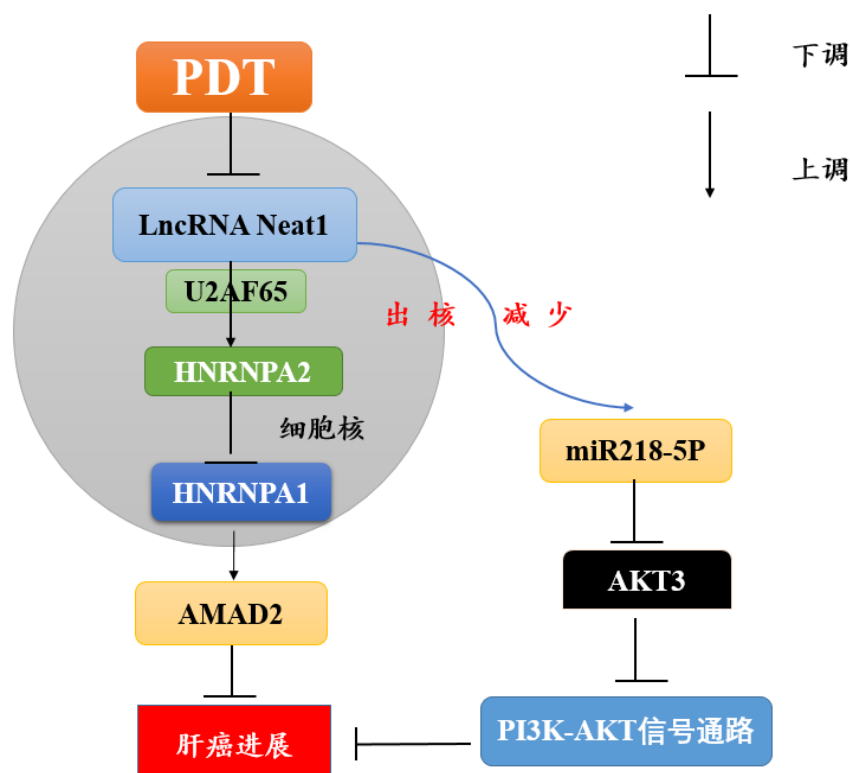


图2 中心假说图

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

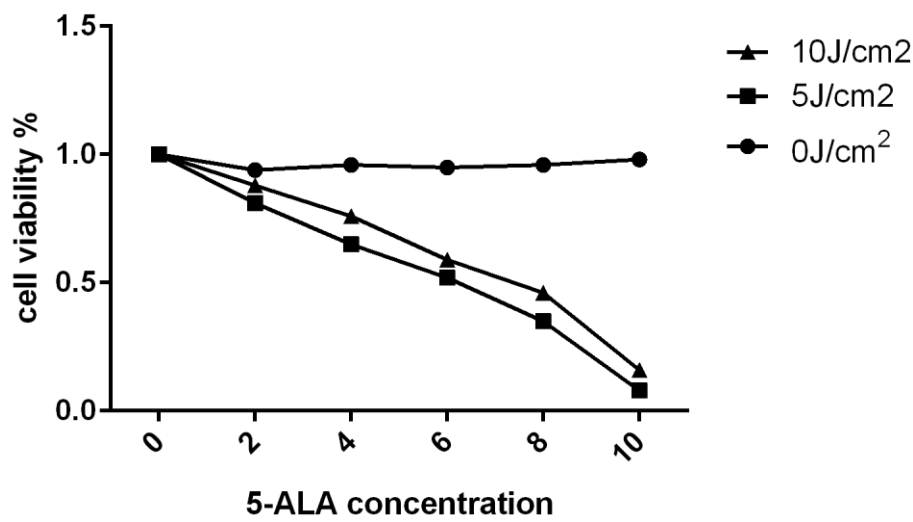


图 4：5-ALA 介导 PDT 有效抑制肝癌细胞 HepG2 增殖

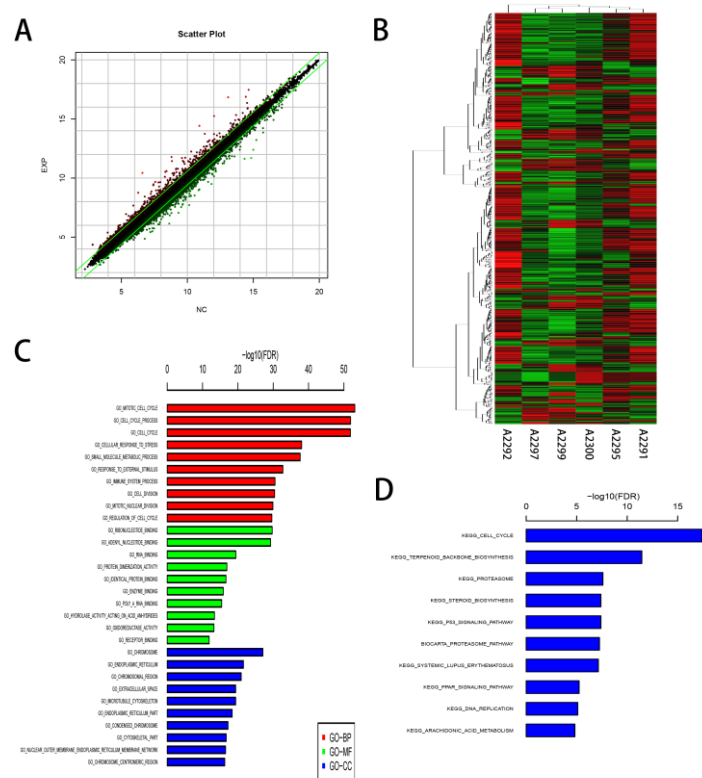


图 5：5-ALA 介导 PDT 治疗前后肝癌细胞高通量测序情况

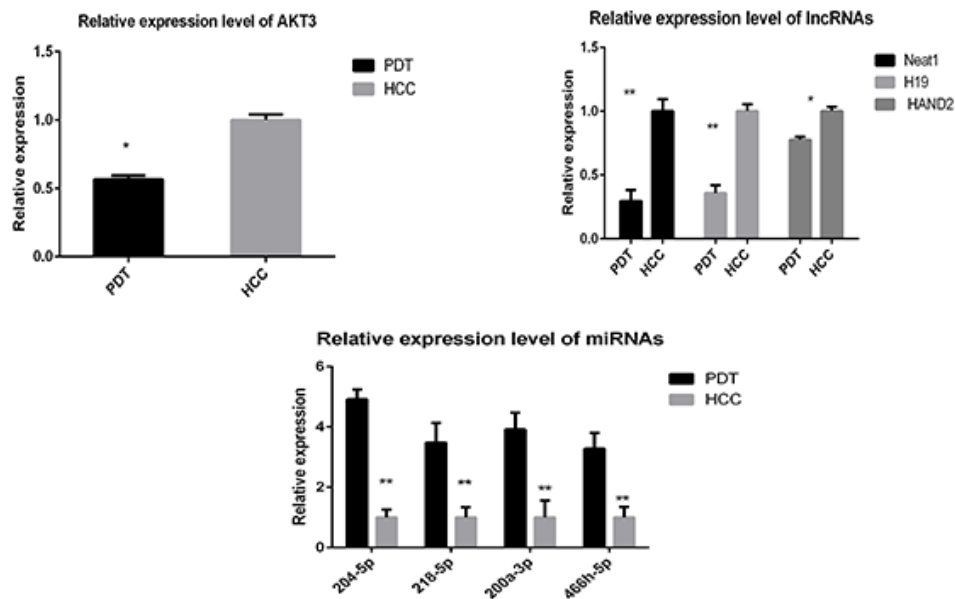


图 6: qPCR 验证芯片预测结果 (PDT 处理后 lncRNA Neat1 表达水平下调, miRNA 218-5P 表达水平上调, AKT3 表达水平下调)

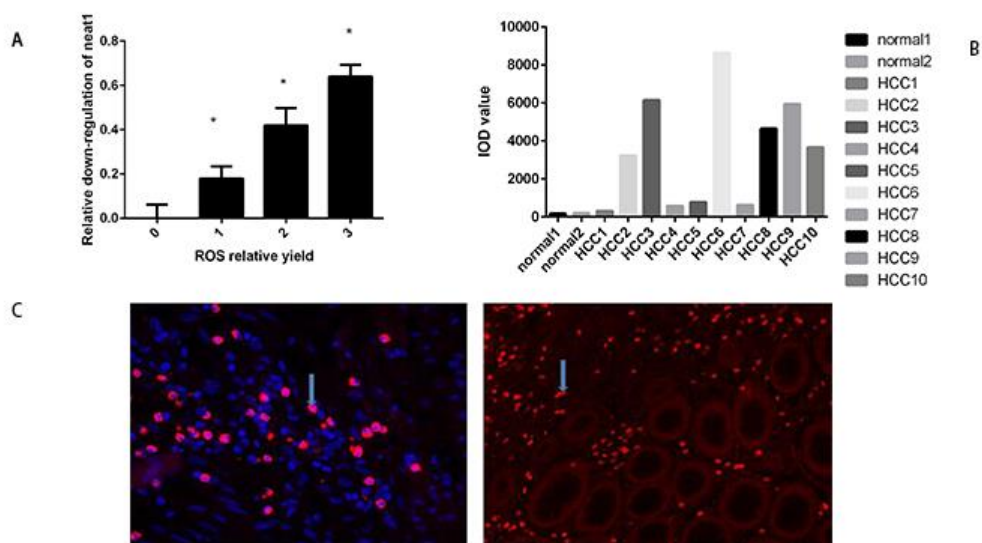


图 7: (A) ROS 产量与 lncRNA Neat1 的下调水平存在平行关系; (B) 纵坐标为肝癌组织中 lncRNA Neat1 的表达量, 相对于正常人、肝癌患者 lncRNA Neat1 表达上调; (C) Fish 实验发现 lncRNA Neat1 在细胞核和细胞质均有表达, 左图为细胞核, 右图为细胞质、箭头所示为 lncRNA Neat1 探针 (400X)

starBase  
For RNA Interactions

Home miRNA-Target Degradome-RNA RNA- ceRNA- Network RBP-Target RBP- Motif RBP- Disease Pathway Pan-Cancer Web Help starBase2 API

Clade »

Genome »

Assembly »

RBP »

CLIP Data »

Pan-Cancer »

Target Gene »

Quick Search: mammal human hg19 RBP: all CLIP-Data >= 1 pan-Cancer >= 0 target: NEAT1

The RBP-lncRNA Interactions Supported by CLIP-seq Data

Download: EXCEL TXT

Show/Hide Columns Search:

RBP	GeneID	GeneName	GeneType	ClusterNum	ClipExpNum	ClipSiteNum	HepG2 (log2FC)	K562 (log2FC)	Pan-Cancer
HNRNPC	ENSG00000245532	NEAT1	lincRNA	193	10	466	1.192	NA	16
HNRNPA1	ENSG00000245532	NEAT1	lincRNA	133	8	419	0.569	1.264	19
HNRNPM	ENSG00000245532	NEAT1	lincRNA	204	8	364	0.596	0.990	16
HNRNPUL1	ENSG00000245532	NEAT1	lincRNA	143	4	329	NA	NA	15
HNRNPK	ENSG00000245532	NEAT1	lincRNA	137	5	312	2.128	0.808	14
HNRNPA2B1	ENSG00000245532	NEAT1	lincRNA	104	6	277	0.363	0.523	19
HNRNPU	ENSG00000245532	NEAT1	lincRNA	88	4	210	0.704	NA	13
HNRNPD	ENSG00000245532	NEAT1	lincRNA	14	4	18	NA	NA	17

HNRNP Search Search Search Search Search Search Search Search Search

Show 10 entries Previous 1 Next

图 8: lncRNA Neat1 与旁斑蛋白 HNRNPA2 等存在结合位点

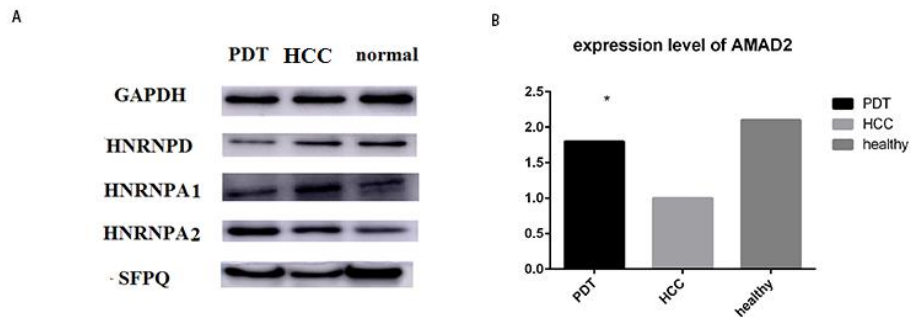


图 9: (A) 光动力处理后 HNRNPD、HNRNPA1 表达水平下调、HNRNPA2 表达水平上调; (B) 光动力处理后上调 AMAD2 的表达水平

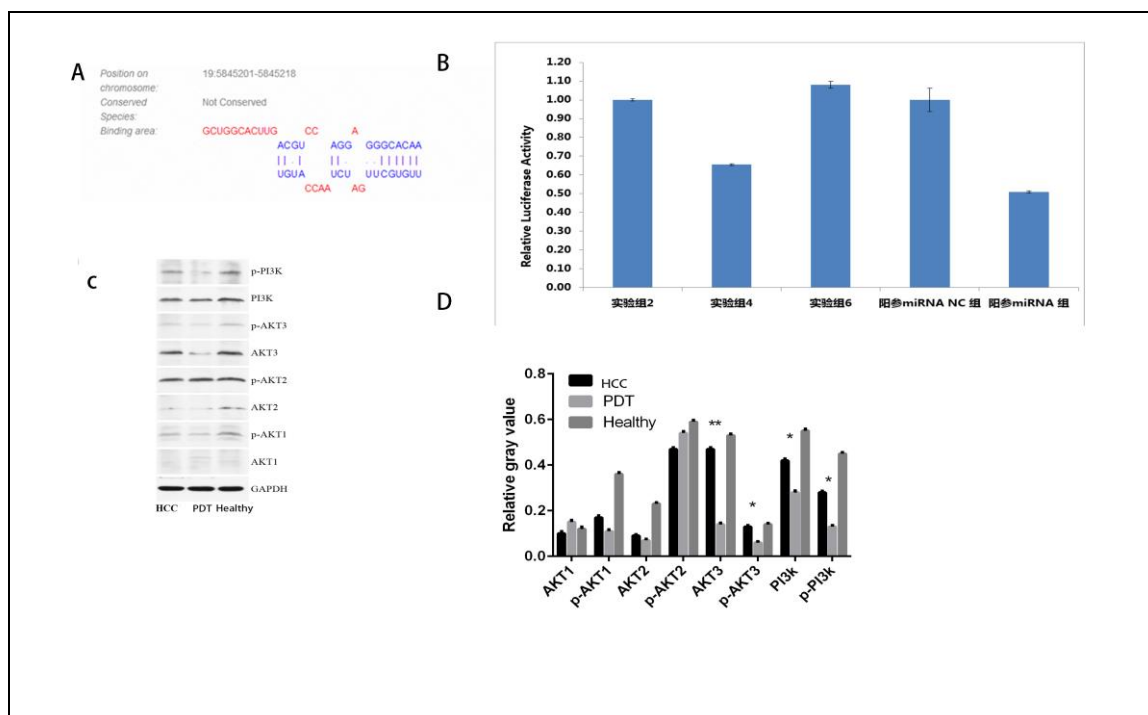


图 10: (A) 预测软件提示 lncRNA Neat1 与 miRNA-218-5p 之间存在结合位点; (B) 双荧光素酶报告实验证实 lncRNA Neat1 与 miRNA-218-5p 之间存在结合位点; (C) Western blot 实验验证 PI3K-AKT 通路表达水平不同处理组 AKT1, p-AKT1, AKT2, p-AKT2, AKT3, p-AKT3, PI3K, p-PI3K 蛋白质组的水平的 Western 印迹分析; (D) 以 GAPDH 的灰度值为标准。\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

## 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  $\beta$  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”, “p53/PIK 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