

受理编号: c18140500001254

项目编号: 2018A0303130165

文件编号: 粤科规财字(2018)207号



(广东科技微信公众号)



(受理纸质材料二维码)

## 广东省自然科学基金项目 合同书

项目名称: miRNA-500a-3p调控射频消融术后肝癌复发转移的机制研究

项目类别: 广东省自然科学基金-自由申请

项目起止时间: 2018-05-01 至 2021-04-30

管理单位(甲方): 广东省自然科学基金管理委员会

依托单位(乙方): 中山大学

通讯地址: 广东省广州市海珠区广州新港西路135号

邮政编码: 510275

单位电话: 020-84113181

项目负责人: 龙健婷

联系电话: [REDACTED]

广东省科学技术厅  
二〇一四年制

## 一、主要研究内容和要达到的目标

（一）本研究所要达到的研究目标是：1、探究miR-500a-3p对RFA术后肝癌干细胞表型的影响。2、探究miR-500a-3p调控热刺激后肝癌干细胞的具体分子机制。3、探究靶向阻断miR-500a-3p对抑制RFA术后复发转移的影响。

（二）基于以上研究目标，本研究的主要内容如下：

本研究通过qRT-PCR，分析RFA治疗后复发肝癌组织miR-500a-3p表达对比原发灶，肝癌RFA术后外周血miR-500a-3p水平对比RFA治疗前的变化，初步探索临床标本中miR-500a-3p与RFA治疗后复发转移的关系。

通过建立RFA亚致死性热刺激细胞模型，探索亚致死性热刺激对miR-500a-3p表达及肝癌干细胞表型的影响。并通过靶向敲除该分子、过表达该基因进行功能上的验证。

最后通过构建裸鼠原位肝癌移植瘤不全消融模型及尾静脉注射肺转移模型，探究阻断miR-500a-3p对RFA后肝癌干细胞表型以及对转移瘤疗效的影响。揭示miR-500a-3p参与RFA术后肝癌干细胞表型改变的主要调控机制。旨在为防治RFA术后肝癌复发转移提供潜在的干预靶点。

二、研究成果及形式

论文及专著情况	国家统计源刊物以上刊物 发表论文（篇）		2		科技报告（篇）		0	
	专著（册）		0					
专利情况(项)	发明专利		实用新型专利		外观设计专利		国外专利	
	申请	授权	申请	授权	申请	授权	申请	授权
	0	0	0	0	0	0	0	0
其他								

## 三、项目进度和阶段目标

1. 项目起止时间： 2018-05-01 至 2021-04-30		
2. 项目实施进度及阶段主要目标：		
开始日期	结束日期	主要工作内容
2018-05-01	2018-12-31	在课题组肝癌生物标本库中筛选经RFA治疗后首次复发并行手术治疗的肝癌患者，选取RFA术前(肿瘤活检)和复发后(手术切除)的肿瘤标本，通过RT-PCR检测干细胞表面相关标记分子（CD133、CD44和Epcam等）。取RFA治疗前及RFA治疗后24h的冻存外周血标本。使用RT-PCR法检测外周血miR-500a-3p的浓度变化。
2019-01-01	2019-08-31	建立RFA亚致死性热刺激细胞模型：设置温度梯度，选取 47° C处理细胞15分钟模拟RFA构建亚致死性热刺激HCC细胞模型。 探讨热刺激对肝癌细胞株干细胞表型、miR-500a-3p表达及STAT3通路激活的影响：分别于热刺激后12h、24h、48h、60h，通过检测肝癌细胞多能干细胞标志物（CD133、CD44、Epcam等）、成球能力、裸鼠体内成瘤能力，通过RT-PCR检测miR-500a-3p表达水平并通过免疫印迹法检测STAT3通路激活情况。
2019-09-01	2020-03-31	运用多种生物信息学分析平台如TargetScan、miRNA.ORG，筛查miR-500a-3p可能作用的靶基因（前期研究发现miR-500a-3p 的潜在靶基因可能是SOCS家族），并通过1）荧光素酶报告基因系统验证miR-500a-3p与靶基因启动子之间的相互作用，并采用免疫沉淀实验验证miR-500a-3p是否与靶基因转录复合物结合。从而实现结构上的验证；2）靶向敲除SOCS，检测肝癌干细胞表型的变化，从而实现功能上的验证。
2020-04-01	2020-08-31	热刺激下，过表达或沉默miR-500a-3p后，1）检测SOCS家族相关基因分子的mRNA和蛋白的表达水平；2）测定STAT3激活相关指标（STAT3依赖性荧光素活性、STAT3核聚集、及其下游基因（包括Bcl-2、MCL1和Bcl-xL）的表达水平），并进一步观察敲除miR-500a-3p对STAT3通路的抑制作用能否被逆转；3）检测肝癌干细胞表型的变化，观察差异表达miR-500a-3p对热刺激后肝癌干细胞表型的影响。
2020-09-01	2021-04-30	构建原位肝癌移植瘤不全消融小鼠模型。分组:空白组、miR-500a-3p敲除组;miR-500a-3p过表达组。观察指标: 1)肝内复发率及肺转移发生率:通过小动物PET-CT成像监测小鼠肿瘤，并应用IHC检测肺标本是否存在微小转移灶，记录复发转移; 2)肝癌干细胞表型:通过免疫组化检CD133、Epcam及CD44等干细胞表面相关分子标记。 尾静脉注射肺转移小鼠模型。分组:空白组、miR-500a-3p敲除组;miR-500a-3p过表达组。观察指标: 1)肺转移发生率:通过HE染色，观察肺转移灶数量，对比不同组别间肺转移的发生率; 2)肝癌干细胞表型:通过免疫组化检测CD133、Epcam及CD44等干细胞表面相关分子标记。 整个研究周期持续随访患者RFA术后复发转移等预后情况。

2018A0303130165

## 四、项目总经费及省科技厅经费预算

1. 省科技厅经费下达总额：（大写）壹拾万圆整；（小写）10万元；					
2. 省科技厅经费年度下达计划：					
年度	2018 年	年	年	年	年
经费(万元)	10.00				
3. 总经费开支预算计划：					
经费筹集情况：					(单位：万元)
省科技厅经费	自筹资金				合计
	自有资金	贷款	地方政府投入	其它	
10.00	0	0	0	0	10.00
政府部门、境外资金及其他资金投入情况说明：					

经费预算			(单位: 万元)	
	总投入经费		省科技厅经费	
支出经费	经费额	用途说明	经费额	用途说明
基建费:	0	无		
1、直接费用:	8.34		8.34	
(1) 设备费:	0	无	0	无
(2) 材料费:	3.4439	细胞系、抗体、载体构建、siRNA、细胞培养、转染试剂、Western blot、一次性耗材、动物、样本采集加工、病理检查	3.4439	细胞系、抗体、载体构建、siRNA、细胞培养、转染试剂、Western blot、一次性耗材、动物、样本采集加工、病理检查
(3) 测试化验加工外协费:	2.00	基因测序、生物信息学分析、计算测试分析	2.00	基因测序、生物信息学分析、计算测试分析
(4) 燃料动力费:	0	无	0	无
(5) 差旅费/会议费/国际合作与交流费:	0	无	0	无
(6) 出版/文献/信息传播/知识产权事务费:	0	无	0	无
(7) 劳务费:	2.8961	用于直接参与项目的研究生等劳务费	2.8961	用于直接参与项目的研究生等劳务费
(8) 人员费:	0	无	0	无
(9) 专家咨询费:	0	无	0	无
(10) 直接费用其他支出:	0	无	0	无
(11) 科技金融服务体系其他费用:	0.00	无	0.00	无
①信用评级补贴:				
②大赛场租:				
③特派员奖励与补贴:				
2、间接费用:	1.66		1.66	
(1) 间接成本:	0.0581	现有仪器设备及房屋、水、电、气、暖消耗, 有关项目组织、实施、检查等管理费用的补助支出	0.0581	现有仪器设备及房屋、水、电、气、暖消耗, 有关项目组织、实施、检查等管理费用的补助支出
(2) 管理成本:	0.4980	有关项目组织、实施、检查等管理费用的补助支出	0.4980	有关项目组织、实施、检查等管理费用的补助支出
(3) 绩效支出:	1.1039	对项目执行做出实际贡献人员的绩效支出	1.1039	对项目执行做出实际贡献人员的绩效支出
合计:	10.00		10.00	

## 五、人员信息

## 项目负责人

姓名	证件号码	年龄	性别	职称	学历	在项目中承担的任务	所在单位	签名
龙健婷		40	女	副主任医师	博士研究生	项目负责人	中山大学	

## 项目组主要成员

姓名	证件号码	年龄	性别	职称	学历	在项目中承担的任务	所在单位	签名
刘保娴		33	女	主治（管）医师	博士研究生	细胞培养、分子生物学实验	中山大学	
姜春林		33	男	医师	硕士研究生	动物实验、分子生物学实验	中山大学	
邹莹		25	女	未取得	硕士研究生	稳定转染体系、细胞生物学实验	中山大学	
胡洁		24	女	未取得	硕士研究生	分子克隆、基因检测、细胞生物学实验	中山大学	



## 六、依托单位与合作单位的合作协议

承担/参与单位名称 (盖章)	工作分工	总经费分摊 (万元)	省科技厅经费分配 (万元)
中山大学		10.00	10.00
	合计	10.00	10.00

## 七、合同条款

第一条 甲方与乙方根据《中华人民共和国合同法》及国家有关法规和规定，为顺利完成（2018）年 miRNA-500a-3p调控射频消融术后肝癌复发转移的机制研究 专项项目（文件编号： 粤科规财字〔2018〕207号）经协商一致，特订立本合同，作为甲乙双方在项目实施管理过程中共同遵守的依据。

第二条 甲方的权利义务：

1. 按合同书规定进行经费核拨的有关工作协调。
2. 根据甲方需要，在不影响乙方工作的前提下，定期或不定期对乙方项目的实施情况和经费使用情况进行检查或抽查。
3. 根据《广东省科技计划项目信用管理办法(试行)》对乙方进行科技计划信用管理。

第三条 乙方的权利义务：

1. 确保落实自筹经费及有关保障条件。
2. 按合同书规定，对甲方核拨的经费实行专款专用，单独列账，并随时配合甲方进行监督检查。
3. 使用财政资金采购设备、原材料等，按照《广东省实施〈中华人民共和国招标投标法〉办法》有关规定，符合招标条件的须进行招标。
4. 项目实施完成或实施到一定程度，须按照《广东省省级科技计划项目结题管理的实施细则（试行）》提出验收或终止结题的申请，并按甲方要求做好项目结题工作。
5. 在每年规定时间内向甲方如实提交上年度工作情况报告，报告内容包含上年度项目进展情况、经费决算和取得的成果等。
6. 按照国家和省有关规定，提交科技报告及其他材料。

第四条 在履行本合同的过程中，如出现广东省相关政策法规重大改变等不可抗力情况，甲方有权对所核拨经费的数量和时间进行相应调整。

第五条 对分年度拨款（滚动资助）项目，甲方有权利根据项目研究进展或中期考核情况变更或中止项目后续资助经费数额。

第六条 在履行本合同的过程中，当事人一方发现可能导致项目整体或部分失败的情形时，应及时通知另一方，并采取适当措施减少损失，没有及时通知并采取适当措施，致使损失扩大的，应当就扩大的损失承担责任。

第七条 本项目技术成果的归属、转让和实施技术成果所产生的经济利益的分享，除双方另有约定外，按国家和广东省有关法规执行。

第八条 根据项目具体情况，经双方另行协商订立的附加条款，作为本合同正式内容的一部分，与本合同具有同等效力。

第九条 本合同一式三份，各份具有同等效力。甲、乙方及课题负责人各执一份，三方签字、盖章后即生效，有效期至项目结题后一年内。各方均应负合同的法律责任，不应受机构、人事变动的影响。

第十条 乙方必须接受甲方聘请的本项目合同监理单位的监督和管理。监理单位按照甲方赋予的权利对本项目合同的履行进行审核、进度调查，对项目合同变更、经费使用情况进行监督管理及组织项目验收。

说明：1. 本合同书中，凡是当事人约定无需填写的内容，应在空白处划（/）。

2. 委托代理人签订本合同书的，应出具合法、有效的委托书。

2018A0303130165

## 八、本合同签约各方

管理单位（甲方）：广东省自然科学基金管理委员会（盖章）

法定代表人（或法人代理）：\_\_\_\_\_（签章）

年 月 日

依托单位（乙方）：中山大学（盖章）

法定代表人（或法人代理）：罗俊\_\_\_\_\_（签章）

联系人（项目主管）姓名：中山大学胡菁\_\_\_\_\_（签章）

Email: kjcgxkb@mail.sysu.edu.cn

电话：020-84113181

开户单位名称：中山大学

开户银行名称：工行广州中山大学支行

开户银行帐号：\_\_\_\_\_

年 月 日

联系人（课题负责人）姓名：龙健婷（签名）

Email: longjianting@163.com

电话：\_\_\_\_\_

年 月 日

项目编号：201904010046

# 广州市科技计划项目 合同书

项目名称：miR-589-5p通过STAT3通路促进肝癌干细胞特性的机制研究

计划类别：科学研究计划(2019)

专题名称：一般项目专题

起止时间：2019年04月01日 至 2021年03月31日

承担单位：中山大学附属第一医院

组织单位：中山大学

责任处室：基础研究处

填表日期：2019年04月01日

广州市科学技术局  
(2019年版)

# 填写说明

一、本合同书的项目编号由市科学技术局（以下简称“市科技局”）统一确定。

二、本合同书由申报书在后台自动转换生成，如有错漏之处需修正，请联系市科技局项目责任处室退回承担单位修正。

三、项目经费分为直接费用（主要包括劳务费/人员费、设备费、材料费、燃料动力费、测试化验加工费、会议/差旅/国际合作与交流费、出版/文献/信息传播/知识产权事务费、专家咨询费和其他直接费用等）和间接费用。

（一）劳务费/人员费：指在项目研究开发过程中支付给参与研究的研究生、博士后、访问学者以及项目聘用的研究人员、科研辅助人员等的人力资源成本费、事业单位参与科技计划项目并与项目承担单位签订劳动合同的编外人员的工资性支出、相关人员的社会保险补助。项目组成员为事业单位在编人员的，其人员费可以从劳务费/人员费开支，用于补足本单位参与本科技计划项目的在编人员工资性支出。

（二）设备费：指项目研究开发过程中所必需的专用仪器、设备、样品、样机购置费及设备试制费，不得用于购置通用与办公用品。项目研发过程应尽量使用广州地区大型科学仪器协作共用网的仪器设备，避免重复购置。确需购置的，需经专家评审论证其必要性。对单项10万元以上设备仪器和软件的购建费用应重点说明其主要用途和测算理由，并严格执行国家关于政府采购、招投标等规定。

（三）材料费：指在项目实施过程中需要消耗的各种原材料、辅助材料、低值易耗品、元器件、试剂、实验动物、部件、外购件、包装物的采购、运输、装卸、整理等费用。

（四）燃料动力费：指在项目实施过程中相关大型仪器设备、专用科学装置等运行发生的可以单独计量的水、电、气、燃料消耗费用等。

（五）测试化验加工费：指在项目实施过程中由于承担单位自身的技术、工艺和设备等条件的限制，必须支付给外单位（包括项目承担单位内部独立经济核算单位）的检验、测试、设计、化验及加工等费用。

（六）会议/差旅/国际合作与交流费：指项目实施过程中发生的会议费、差旅费和国际合作与交流费。在编制预算时，本科目支出预算不超过直接费用预算10%的，不需要编制测算说明。承担单位和科研人员应当按照实事求是、精简高效、厉行节约的原则，严格执行国家、本市和单位的有关规定，统筹安排使用。

（七）出版/文献/信息传播/知识产权事务费：指在项目实施过程中需要支付的出版费、资料费、专用软件购买费、文献检索费、专业通信费、专利申请及其他知识产权事务等费用。

（八）专家咨询费：指在项目实施过程中支付给临时聘请的咨询专家的费用。专家咨询费不得支付给参与项目研究及其管理相关的工作人员。专家咨询费的开支标准应当按照国家及本市有关规定执行。

（九）其他直接费用：指在项目实施过程中发生的除上述费用之外的其它直接支出。

（十）间接费用：指项目承担单位在组织实施项目过程中发生的无法在直接费用中列支的相关费用。主要包括承担单位为项目研究提供的现有仪器设备及房屋、水、电、气、暖消耗，有关管理费用的补助支出，以及绩效支出等。其中绩效支出是指项目承担单位为提高科研工作绩效安排的相关支出。绩效支出安排应当与科研人员在项目工作中的实际贡献挂钩。项目承担单位属事业单位的，绩效支出纳入单位奖励性绩效单列管理，不计入单位绩效工资总量调控基数。

四、本项目如涉及多家（包含两家）单位参加，乙方应在签定本合同书前与合作单位就任务分工、经费和知识产权分配等问题签订有关合同或协议（仅委托其他单位进行常规试验、提供社会化科技服务和少量辅助科研工作的情况除外），作为本合同书的附件。

五、项目承担单位是具有独立法人资格的企业、高等院校、科研院所或其他单位，高等院校、科研院所不具备独立法人资格的二级单位不得作为项目承担单位。

六、项目组织单位是指项目承担单位的上级主管部门。项目组织单位包括广州市各区科技行政主管部门，以及其他经市科学技术局同意作为项目组织单位的行政事业单位、企业集团、高等院校、科研院所等。除经市科学技术局同意或科技计划类别另有规定的外，项目组织单位为项目承担单位注册地所属的区科技行政主管部门。

七、项目基本信息表中单位特性指项目承担单位的资质或获得的称号，如高新技术企业、软件企业、技术先进型服务企业、创新型企业、科技小巨人企业等。单位类型按以下类型填写：高等院校、科研院所、国有企业、民营企业、股份制企业、中外合资企业、港/澳/台商投资企业、外商投资企业等。

八、本合同书适用于广州市事前资助类科技计划项目，有特殊要求另行制定的除外。

## 一、项目基本信息

项目名称	miR-589-5p通过STAT3通路促进肝癌干细胞特性的机制研究			
研究类别/ 所属技术领域	生物、医药-临床医学-肿瘤内科			
承担单位	名 称	中山大学附属第一医院		
	通信地址	越秀区中山二路58号		
	邮政编码	510080	传 真	
	单位特性		单位类型	医疗机构
	统一社会信用代码 或组织机构代码	12100000455416029H		
	法定代表人	肖海鹏	电子邮箱	xiaohp@mail.sysu.edu.cn
	联系人	姜橙	联系电话	020-87334871



二、项目组人员信息

项目负责人	姓名	龙健婷		证件类型		身份证		证件号码	██████████		性别	女	
	出生年月	1978年09月16日		民族		汉族		国籍			学历	博士研究生	
	学位	博士		学位授予国家（或地区）		中国		职务	专科副主任		职称	副主任医师	
	所学专业	外科学		手机号码		██████████		办公电话	020-87755766-8576		电子邮箱	longjianting@163.com	
项目组成员（含项目负责人）													
序号	姓名	证件类型	证件号码	年龄	性别	职务	职称	学历	现从事专业	分工	所在单位	签名	
1	龙健婷	身份证	██████████	39	女	专科副主任	副主任医师	博士研究生	肿瘤内科	项目负责人	中山大学附属第一医院		
2	刘保娴	身份证		32	女	无	副主任医师	博士研究生	超声介入	细胞培养，动物实验	中山大学附属第一医院		
3	花蕊熙	身份证		31	女	无	主治医师	博士研究生	肿瘤内科	载体构建，分子生物学实验	中山大学附属第一医院		
4	姜春林	身份证		32	男	无	医师	硕士研究生	介入超声	组织标本检测，肝癌预后分析	中山大学附属第一医院		
5	邹莹	身份证		24	女	无	未取得	本科	肿瘤内科	稳定转染细胞系建立、细胞生物学实验	中山大学附属第一医院		

### 三、项目实施内容

#### (一)项目概述

预实验示，上调miR-589-5p促肝癌细胞成球，增加侧群比例，促干细胞因子表达，增加成瘤性。靶基因中包括STAT3的负调控SOCS家族，造成STAT3通路激活。本研究拟回答：1、miR-589-5p是否通过靶向下调SOCS激活STAT3通路？2、miR-589-5p表达是否与肝癌干细胞表型相关？

#### (二)项目研究内容

##### 研究目标和内容

一、本研究所要达到的研究目标是：1、进一步证实miR-589-5p表达水平与肝癌细胞恶性行为以及干细胞表型确切相关；2、获得miR-589-5p靶向调控STAT3通路关键分子的直接证据；3、获得STAT3通路持续性激活与肝癌细胞恶性行为及干细胞表型之间相关关系的直接证据；4、探讨miR-589-5p调控肝癌干细胞表型其他可能机制，为将来更全面阐明miR-589-5p促癌作用机制以及开发新的治疗靶点提供理论依据。

二、基于以上研究目标，本研究的主要内容如下：

1、以癌症基因组数据库The Cancer Genome Atlas (TCGA) 作为参考，结合前期研究中基因芯片实验结果，我们已发现在肝细胞癌组织及细胞系中高表达包括miR-589-5p在内的一组microRNA，同时根据结果选择转染实验所需的目标细胞系。我们将搜集新的细胞系及组织标本通过实时定量RT-PCR再度验证miR-589-5p在肿瘤组织中的异常表达。

2、运用多种生物信息学分析平台如TargetScan、miRNA.ORG并参考既往文献，再次验证前期研究中所发现的miR-589-5p的潜在靶基因（如SOCS2、SOCS5、PTPN1、PTPN11等基因）。

3、构建稳定表达外源性miR-589-5p的肝癌细胞模型以及针对miR-589-5p的小分子干扰RNA，通过细胞生物学实验观察miR-589-5p表达与否对细胞恶性行为及干细胞表型的影响。

4、以STAT3通路关键分子为主要目标，通过荧光素酶报告基因系统验证miR-589-5p与靶基因启动子之间的相互作用，并采用免疫沉淀实验验证miR-589-5p是否与靶基因转录复合物结合。

5、通过检测STAT3核聚集、STAT3下游基因表达验证稳定表达miR-589-5p细胞中STAT3通路的激活情况。

6、通过检测miR-589-5p高表达或沉默情况下细胞球形生长能力、多能干细胞标志物、裸鼠体内成瘤能力验证干细胞表型与STAT3通路活化之间的关系。

7、为进一步证实临床标本中miR-589-5p表达与靶基因表达之间的关系，我们将搜集一定数量的新鲜肝细胞癌组织标本并检测miR-589-5p及其靶基因、STAT3下游基因的表达水平，结合临床资料得出miR-589-5p表达与预后关系的初步结果。

##### 拟解决的关键技术问题

1、证实miR-589-5p表达水平与肝癌细胞恶性行为以及干细胞表型确切相关并获得miR-589-5p靶向调控STAT3通路关键分子的直接证据。

2、获得STAT3通路持续性激活与肝癌细胞恶性行为及干细胞表型之间相关关系的直接证据。

##### 主要创新点

首次论述miR-589-5p通过靶向沉默SOCS基因的表达使STAT3持续激活从而维持肝癌干细胞特性的机制，率先揭开miR-589-5p介导肝癌发生发展的“癌基因”面纱，为开发以miR-589-5p为靶标清除肝癌干细胞样细胞的治疗方法提供理论基础。

##### 采用的方法、技术路线以及工艺流程

##### 研究方法：

1、质粒构建以及稳定转染细胞系的建立

采用pMSCV-puro (Clontech Laboratories Inc.) 构建反转录转染系统，构建pMSCV-miR-589-5p质粒，并与pIK包装质粒共转染至细胞进行装配。转染目标细胞后，以嘌呤霉素进行克隆筛选。

2、报道基因系统

扩增SOCS2、SOCS5、PTPN1和PTPN11基因的3' UTR并克隆至经基因修饰后的pGL3质粒荧光素酶基因下游，采用Promega的双荧光报道基因分析试剂盒。针对miR-589-5p的拮抗剂、小分子干扰RNA等均由RiboBio合成并纯化，利用报道基因系统验证miR-589-5p对各3' UTR的相互作用。

3、侧群细胞分析

细胞悬液以Hoechst 33342染料标记，胞核以Propidium iodide染色，采用FACS AriaI (Becton Dickinson) 进行细胞分选和分析。

#### 4、miRNP免疫沉淀

把HA-Ago1与miR-589-5p共转染到细胞内，以HA抗体对HA-Ago1进行免疫沉淀，并以实时定量PCR检测沉淀物中DKK1及RISC复合物的mRNA。

#### 5、动物移植瘤模型

6周大BALB/c-nu裸鼠的腹股沟皱褶处皮下接种肝癌细胞悬液，并每3天检测移植瘤体积，接种后35天处死小鼠，移植瘤用于病理检查。

### (三) 项目预期风险及规避措施

本课题所采用的实验方法均为分子生物学常规成熟实验方法，用于转染细胞的载体为具有整合复制缺陷的病毒载体，安全可靠。实验对象采用组织标本、细胞系以及裸鼠，符合伦理委员会相关规定，课题组将严格遵循中山大学实验动物管理规定，保护患者隐私，对基因信息实行保密，按医院及实验室规定对医疗废物进行妥善处理。综上，预期不存在风险。

#### 四、项目主要验收指标

##### (一) 主要技术指标

- 1、获得miR-589-5p表达水平与肝癌细胞恶性行为以及干细胞表型之间相关关系的直接证据；
- 2、获得miR-589-5p靶向调控JAK/STAT3通路关键分子的直接证据；
- 3、获得JAK/STAT3通路持续性激活与肝癌细胞恶性行为及干细胞表型之间相关关系的直接证据；
- 4、探讨miR-589-5p调控肝癌干细胞表型其他可能机制，为将来更全面阐明miR-589-5p促癌作用机制以及开发新的治疗靶点提供理论依据。

201904010046

(二) 主要技术成果			
序号	成果形式		成果数量
1	新产品（或新材料、新装备、新品种/系）	0	0
2	新工艺（或新方法、新模式、新技术、新服务）	0	0
3	发明专利（件）	申请	0
		授权	0
4	实用新型专利（件）	申请	0
		授权	0
5	外观设计专利（件）	申请	0
		授权	0
6	国外专利（件）	PCT受理	0
		授权	0
7	技术标准制定（个）	牵头	0
		参与	0
8	软件著作权（项）		0
9	论文论著（篇）	SCI/EI/ISTP	1
		其他	1
10	创新平台（载体）项目	技术服务数量（项）	0
		服务企业数量（家）	0
11	获得国家级奖项（项）		0
12	获得省级奖项（项）		0
13	科技人才奖励（人）		0
14	引进人才（人）		0
15	培养人才（人）	博士	0
		硕士	2
其他成果及形式说明（创新特色、成果宣传推介措施等）			
发表研究型论文1-2篇，其中SCI论文1篇，培养硕士生1-2名。			

(三) 主要经济指标及社会效益		
序号	指标名称	指标值
1	实施期内项目销售收入（万元）	0.00
2	实施期内项目利税（万元）	0.00
3	实施期内项目出口创汇（万美元）	0.00
4	实施期内项目新增就业人数（人）	0
其他经济指标及社会效益说明		

本研究的成果为开发针对肝癌干细胞的分子靶向药物提供新的靶点，有助于实现治疗方案的个性化设计，预防肝癌复发转移，具有重大的临床价值。

201904010046

## 五、项目经费预算

(单位: 万元)

项目经费： 20.00					
资金来源	小计	市科技局经费		自筹资金	其他财政经费
2019年	20.00	20.00		0.00	0.00
2020年	0.00	0.00		0.00	0.00
2021年	0.00	0.00		0.00	0.00
合计	20.00	20.00		0.00	0.00
支出预算明细					
支出科目	小计	市科技局经费		自筹资金	
		经费额	用途说明	经费额	用途说明
一、劳务费/人员费	3.00	3.00	用于直接参与课题的研究生生活补助	0.00	无
二、设备费	0.00	0.00	无	0.00	无
1. 购置费	0.00	0.00	无	0.00	无
2. 试制费	0.00	0.00	无	0.00	无
三、材料费	9.00	9.00	细胞实验、动物实验、一次性耗材	0.00	无
四、燃料动力费	0.00	0.00	无	0.00	无
五、测试化验加工费	2.80	2.80	基因测序及生物信息学分析	0.00	无
六、会议/差旅/国际合作交流费	0.50	0.50	参加国内/国际会议的差旅费	0.00	无
七、出版/文献/信息传播/知识产权事务费	1.40	1.40	发表论文所需版面费、文献检索费	0.00	无
八、专家咨询费	0.00	0.00	无	0.00	无
九、其它直接费用	0.00	0.00	无	0.00	无
十、间接费用	3.30	3.30	承担单位为项目研究提供的现有仪器设备及房屋、水、电、气、暖消耗	0.00	无
合计	20.00	20.00	\	0.00	\

注: 自筹资金由项目申报单位自身筹措, 不包含来自各级政府部门财政资金, 参照事前资助类项目经费管理, 经费预算按项目申报单位实际需要进行编制。

## 六、工作进度安排

序号	起止时间	阶段目标主要内容及成果
1	2019-04-01至2020-03-31	<p>搜集肝癌细胞系及肝癌组织通过实时定量RT-PCR 再度验证miR-589-5p 在肿瘤组织中的异常表达。并运用多种生物信息学分析平台再次锁定miR-589-5p的潜在靶基因。</p> <p>构建稳定表达miR-589-5p 的细胞模型以及小分子干扰RNA，通过细胞生物学实验观察miR-589-5p 表达与否对细胞恶性行为及干细胞表型的不同影响。荧光素酶报告基因验证miR-589-5p 与靶基因启动子之间的相互作用，采用免疫沉淀实验验证miR-589-5p 是否与靶基因转录复合物结合。检测STAT3 核聚集、STAT3 下游基因表达验证稳定表达miR-589-5p 细胞中STAT3 通路的激活。</p>
2	2020-04-01至2021-03-31	<p>检测miR-589-5p 高表达或沉默情况下细胞球形生长能力、多能干细胞标志物、裸鼠体内成瘤能力验证干细胞表型与STAT3 通路活化之间的关系。搜集一定数量的新鲜肝细胞癌组织标本并检测miR-589-5p 及其靶基因、STAT下游基因的表达水平，结合临床资料得出miR-589-5p表达与预后间关系的初步结果。整理实验结果，统计数据，发表论文。</p>



## 七、共同条款

第一条 甲、乙、丙三方根据《中华人民共和国合同法》及国家有关法规和规定，经协商一致，特订立本合同，作为甲、乙、丙三方在合同执行中共同遵守的依据。

第二条 甲、乙、丙三方应当严格履行《广州市科技计划项目管理办法》中规定的职责，严格按照《广州市科技创新发展专项资金管理办法》实施项目经费管理。

第三条 甲方应在项目执行期满（执行期以本《合同书》“六、工作进度安排”为准，下同）时按相关管理办法组织项目验收。

1. 对通过验收的项目，签发《验收证书》；

2. 对未通过验收的项目，要求其承担单位限期整改，整改后仍不能通过验收的，终止合同，收回尚未使用和使用不符合规定的财政经费。

第四条 乙方应：

1. 按照《合同书》规定的内容组织实施项目，接受并配合甲方、丙方以及各级财政、审计部门，或上述部门委托的机构进行评估、稽查、审计、检查和绩效评价，并按要求提供项目任务与预算执行情况和有关财务资料；

2. 保证自筹资金按时到位和其它配套条件的落实；

3. 在项目研究开发过程中优先考虑使用“广东省科技资源共享服务平台”的仪器设备，项目购置的设备仪器若符合入网条件应及时办理入网手续对社会共用共享，提高设备仪器的使用率。按照《中华人民共和国采购法》要求，对符合政府采购范围的设备仪器，执行政府采购；

4. 项目合同执行期内确需进行变更的，须按照《广州市科技计划项目管理办法》、《广州市科技创新发展专项资金管理办法》相关程序办理；

5. 项目合同执行期满3个月内向甲方提出验收申请，提前完成合同规定任务的可提前申请验收；

6. 项目未通过验收的，按相关管理办法限期整改并重新提出验收申请；

7. 办理《验收证书》和科技成果登记手续；

8. 按照科技经费管理相关要求对项目资金单独设帐，按照预算专款专用；

9. 项目验收时，须提交科技报告；

10. 对合作单位承担监管责任，与合作单位签署合作协议，作为本合同的附件，因合作单位违反合作协议或其他导致本合同书项目建设未能按约定完成的行为，应向甲方承担违约责任。

第五条 乙方因某种原因（如技术或市场情况发生变化，项目所依托的技术、资金、设备仪器或人力条件不能落实，原定技术方案及路线不合理等）或不可抗力因素，致使项目计划无法执行，须终止合同的，应向甲方提出申请，经丙方同意，由甲方审核批准，收回尚未使用和使用不符合规定的财政经费；如乙方没有提出终止申请，甲方根据项目研究开发过程监督检查情况，有权终止项目，收回财政经费；乙方在执行期满无故不提交验收申请，经甲方催办仍不提交的，甲方有权终止项目，收回财政经费，因乙方不及时报告或申请所导致的各方损失，由乙方承担。乙方违反约定造成项目工作停滞、延误或失败，未能通过验收的，应承担违约责任。

第六条 丙方应：

1. 协助甲方对项目的实施过程进行跟踪、检查和提供相关信息，并对所提供信息的客观真实性负责；

2. 负责监管乙方严格遵守《合同书》规定的任务；

3. 督促乙方按时到位自筹资金并保证和落实其他配套条件。

第七条 在履行本合同的过程中，当事人一方发现可能导致项目失败或部分失败的情形时，应及时通知另一方，并采取适当措施减少损失，没有及时通知并采取适当措施，致使损失扩大的，应当就扩大的损失承担责任。

第八条 在履行本合同的过程中，如遇到市财政计划改变等不可抗力情况，甲方对所核拨经费的数量和时间可进行相应变更。

第九条 本项目技术成果及知识产权的归属、转让和实施技术成果所产生的经济利益的分享，除另有约定外，按国家和省、市有关规定执行；正式发表的论文、论著应标注“广州市科技计划项目资助”字样及项目编号；项目所取得的技术成果和知识产权应优先广州产业化或推广转让；需向外地转让或产业化的，须事先以书面形式征得甲方同意。

第十条 属技术保密的项目，经协商订立如下技术保密条款：

1. 本合同书保密内容范围为：本合同及其补充协议和附件、乙方因履行本合同所接触或知晓的甲方工作秘密（包括但不限于甲方的任何技术性资料、以及甲方为完成本合同提供的任何其他信息资料并且在提供时未说明是公开信息的）；

2. 本合同书保密期限为：\；

3. 乙方（包括但不限于乙方雇员、代理人、顾问等人员，下同）采取有效的保密措施以避免泄露给任何第三方；在本合同有效存续期间及合同终止后，未经甲方事先的书面同意，不得以任何方式公布、发表、公开、披露、散播、复制此种保密信息的任何部分，或对其加以任何形式的利用或使用；如甲方要求，乙方必须签署甲方提供的保密协议。乙方应与可能知悉保密内容的人员签订技术保密保护协议，保密义务不得低于本合同书的约定；

4. 双方应建立技术保密制度；

5. 属技术保密的项目必须经市负责技术保密部门审查后，方可确定可否发表或用于国际合作与交流。

第十一条 根据项目具体情况，经协商订立如下附加条款作为本合同正式内容的一部分：

1. 甲方同意给予乙方人民币（¥20.00万）的资助，立项后一次性拨付；

2. \

第十二条 违约责任

乙方无正当理由造成项目工作停滞、延误或失败，未能通过验收的，甲方有权终止项目，收回财政经费，由此造成的经济损失由乙方承担；经检查确认项目计划进度不符合合同书约定的，甲方有权警告并责令乙方整改，由此产生的损失由乙方负担；情节严重的，甲方有权终止项目，收回财政经费。

第十三条 廉洁责任

乙方应严格遵守国家、省、市关于科技专项经费使用的有关法律、法规，相关政策以及廉洁建设的各项规定，积极开展人员廉洁从业教育，防范科技项目组成员在科研活动中出现下列违法违规行为：

1. 向甲方、组织单位、评审机构及其工作人员赠送礼金、有价证券、任何形式的贵重物品和回扣、好处费、感谢费等；

2. 为甲方、组织单位、评审机构及其工作人员报销应由对方或个人支付的费用；

3. 为甲方、组织单位、评审机构工作人员个人装修住房、婚丧嫁娶、配偶子女的工作安排以及出国（境）、旅游等提供方便；

4. 为甲方、组织单位、评审机构及其工作人员组织有可能影响公正执行公务的宴请、健身、娱乐等活动；

5. 其他：\

乙方及其工作人员有上述行为之一的，一经查实，甲方有权按照相关规定采取终止项目合同、不拨付财政经费、限制项目申报等处理；涉嫌犯罪的，移交司法机关追究刑事责任。甲方、组织单位、评审机构及其工作人员有涉及上述行为之一的，乙方应及时向甲方或其上级机关或纪检监察、司法等有关机关检举举报。

#### 第十四条 科研诚信和科研伦理要求

乙方应建立健全促进科研诚信和科研伦理的规章制度，落实以下职责：

1. 建立健全本单位学术论文发表诚信承诺制度、科研过程可追溯制度、科研成果检查和报告制度等成果管理制度。对本项目形成的科研成果的署名、研究数据真实性、实验可重复性等进行诚信审核和学术把关。防范科技项目组成员在项目申报、研发过程中提供虚假信息或材料，抄袭、剽窃他人科研成果，捏造、变造或篡改科研数据；

2. 加强对科技项目参加人员的科研诚信和科研伦理教育，督促科技项目组成员恪守科学道德准则，遵守科研活动规范。对在科研诚信和科研伦理方面存在问题情节较严重的，应及时调整出项目团队并及时以书面形式报告甲方；

3. 加强对项目合作单位的科研诚信管理，正确履行管理、指导、监督职责，全面落实科研诚信和科研伦理要求；

4. 乙方或项目合作单位及其相关人员被纳入科研严重失信行为记录或相关社会领域信用“黑名单”，乙方应及时以书面形式报告甲方；

5. 其他：\

在项目实施过程中，对乙方或项目合作单位及其相关人员有严重违背科研诚信和科研伦理要求的行为，甲方和相关部门可对乙方采取约谈主要负责人、停拨或核减经费、记入科研诚信严重失信行为数据库、将不良行为向社会公开、移送至有管理权限的纪检监察部门等处理处罚措施。

#### 第十五条 争议解决

因本合同书所产生的争议，各方应友好协商解决；协商不成的，各方同意由本合同签订地人民法院管辖。

#### 第十六条 通知与送达

甲方在本合同履行过程中向乙方或丙方发出或者提供的所有通知、文件、文书、资料等，均以本合同所列明的乙方或丙方地址送达。乙方或丙方如果迁址，应当书面通知甲方；未履行书面通知义务的，甲方按原地址邮寄相关材料即视为已履行送达义务。当面交付上述材料的，在交付之时视为送达。

本合同一式五份，各份具有同等效力。甲方、市财政局和丙方各存一份，乙方存二份。本合同签订各方均负有相应的法律责任，不受机构、人事变动而影响。

说明：本《合同书》中，凡是三方约定无需填写的条款，在该条款的空白处划（\）。

## 八、合同书各方签章

签订地点：广州市越秀区

广州市科学技术局（甲方）：广州市科学技术局

项目经办人（签章）：

联系电话：

责任处室负责人（签章）：

（公 章）

年 月 日

项目承担单位（乙方）：中山大学附属第一医院

二级部门：无

项目负责人（签章）：

项目经费汇入账号

帐户名：中国工商银行广州中山大学支行

帐号：

开户银行：中山大学

财务负责人（签章）：

财务负责人联系电话：020-87766335

法定代表人（签章）：

（公 章）

年 月 日

组织单位（丙方）：中山大学

项目经办人（签章）：

（公 章）

年 月 日

附件：项目承担单位（乙方）及项目负责人承诺书

承诺书

本单位/本人作为广州市科技计划项目承担单位/项目负责人，将严格遵守广州市科技计划管理相关规定，严格履行自身责任，加强对项目组人员及合作单位的管理，在此郑重承诺：

（一）严格遵守《广州市科技计划项目管理办法》相关规定，积极推动项目实施，按时完成项目并按规定提交验收材料；

（二）严格遵守《广州市科技创新发展专项资金管理办法》及相关财经法规规定，实施项目经费管理，确保财政经费使用合法合规；

（三）严格遵守国家、省、市关于科研诚信和科研伦理的有关法律、法规，相关政策以及各项规定，加强项目实施过程中的科研诚信及科研伦理管理，恪守科研道德准则。

如有违反，本单位/本人愿意接受相关部门做出的各项处理决定，包括但不限于终止项目，停拨或核减经费，追回项目经费，取消一定期限广州市科技计划项目申报资格，记入科研诚信严重失信行为数据库，将不良行为向社会公开以及主要责任人接受相应党纪政纪处理等。

项目承担单位签章：

日期：

项目负责人签章：

日期：