浦东新区科技发展基金

项目任务（合同）书

项目编号：PKJ2021-Y53

专项名称：事业单位民生科研专项：医疗卫生

项目名称：N6-甲基嘌呤(m6A)甲基识别蛋白IGFBP3在肺腺癌中的表达及其功能研究

承担单位：上海市第六人民医院（盖章）

项目负责人：夏前林　职务/职称：技师　手 机：13166002832

联 系 人：曹苗苗　手 机：18017579001　电 话：38297491

传 真：20953081　邮政编码：201306

通讯地址：上海市浦东新区环湖西三路222号

起止日期：2021年12月～2023年11月

开户银行：交通银行漕河泾支行

银行账户：310066632010149001093

上海市浦东新区科技和经济委员会

填写说明

一、 项目任务（合同）书各项内容，要求实事求是，逐条认真填写。表达要明确、严谨。外来语同时用原文和中文表达。第一次出现的缩写词，须注出全称。

二、 本项目任务（合同）书用A4纸打印，于左侧装订成册，各栏空格不够时，请自行加页。一式两份，送浦东新区科技和经济委员会。

三、 封面右上角的“项目编号”、“专项名称”由系统自动填写。任务（合同）书中的拨款计划及项目信息表中“批准资助金额”按浦东新区科技和经济委员会约定填写。

四、 正文第九项中“上级主管部门意见”是指申报项目的非企业单位（一般指事业单位和社会团体等单位）的上级主管部门提出批准意见。独立企业法人单位无需填写该项。

五、 本项目任务（合同）书签定后，即作为本项目实施的正式文件，具有法律约束力。

一、项目目标和主要研究内容

（一）本项目要达到的总体目标

①探究肺腺癌细胞、组织中IGFBP3及m6A甲基化修饰水平的改变及其对肺腺癌细胞恶性生物学行产生何种影响，并通过高通量测序技术进一步探讨其下游调控机制，从转录后表观遗传层面为肺腺癌的致病机理和诊断探索新的靶标；

②通过外周血中检测IGFBP3及m6A甲基化修饰水平的改变，结合临床参数，初探IGFBP3及m6A甲基化在肺腺癌中的诊断价值，为肺腺癌的早期诊断提供新的方向。

（二）项目主要研究内容与技术难点

1.研究内容：

本项目研究内容包括:①组织和细胞水平验证IGFBP3在肺腺癌中的表达及与m6A甲基化修饰的相关性；② IGFBP3在肺腺癌中的生物学功能及潜在m6A调控机制的探究；③外周血中评估IGFBP3的表达水平及其作为诊断标志物的临床价值。

具体研究内容如下：

（1）验证IGFBP3在细胞及组织中的表达水平及其与m6A修饰水平的相关性

①收集患者组织样本及细胞系：收集30例就诊于上海市第六人民医院并接受手术切除治疗的肺腺癌患者的肿瘤组织及配对的癌旁组织；购买4株肺腺细胞株，包括NCI-H1975、NCI-H157、Calu-3、A549以及1株人正常肺上皮细胞BEAS-2B，取生长状态良好的细胞进行实验，所有细胞株均需经过STR鉴定。

②检测组织及细胞中IGFBP3表达水平及m6A甲基化修饰水平：提取肺腺癌组织及细胞RNA及蛋白，采用m6A RNA甲基化试剂盒定量检测肺腺癌细胞及组织中m6A修饰水平；采用qPCR及western-blot实验检测IGFBP3 mRNA和蛋白表达水平，并分析与m6A甲基化水平的相关性。

③统计分析：以SPSS 19.0软件进行统计学分析，采用t检验分析肺腺癌患者组织及细胞中IGFBP3表达及m6A修饰水平是否有差异，运用Spearman等级相关性分析IGFBP3 mRNA和蛋白的表达水平与m6A修饰水平的相关性，$P<0.05$为差异有统计学意义。

（2）探究IGFBP3的生物学功能及在肺腺癌中通过m6A修饰发挥作用的潜在机制

①IGFBP3过表达和敲低细胞的构建：设计、合成并筛选针对IGFBP3基因的siRNA和过表达质粒靶向沉默和过表达IGFBP3基因，细胞转染后进行qPCR及Western Blot分别检测IGFBP3 mRNA和蛋白的表达水平验证干扰效率；

②IGFBP3蛋白水平变化与m6A修饰水平相关性的验证：m6A甲基化试剂盒检测肺腺癌细胞系中敲低或过表达IGFBP3后m6A水平的相应改变；

③IGFBP3在肺腺癌细胞中的生物学功能鉴定: 分别采用CCK-8实验、Transwell小室实验、平板克隆形成实验、Annexin V法及流式细胞仪检测敲低或过表达IGFBP3后对细胞增殖、侵袭、克隆能力、凋亡和细胞周期的影响。

④m6A-sep及RNA-seq联合生物信息学筛选及验证IGFBP3潜在的下游靶点：对过表达IGFBP3的肺腺癌细胞进行RNA甲基化免疫沉淀测序(m6A-seq)和转录组测序(RNA-seq)；联合分析测序数据，筛选同时存在m6Apeak峰且RNA-seq差异表达显著的基因；对以上基因进行GO分析注释后，绘制Emap图进行可视化分析，初步筛选IGFBP3的下游靶点。采用qPCR及Western Blot对上述分析得出的潜在作用靶点进行验证，探讨IGFBP3在肺腺癌中通过m6A修饰发挥的潜在作用机制；

⑤统计分析：采用SPSS 19.0软件对数据进行统计学分析。使用t检验分析两组间变量的差异，$P<0.05$表示具有统计学意义。利用exomePeak软件对实验组和对照组检测到的m6A甲基化位点(peaks)进行差异分析，并根据Ensembl数据库的信息对peaks进行注释。m6A-Seq中peak峰显著上调或下调的阈值设为fold change≥1.5，$P<0.05$；RNA-seq中基因表达显著上调或下调的阈值设为fold change≥2，$P<0.05$。利用Fisher精确检验计算GeneOntology(GO)富集分析，$P<0.05$表示具有统计学意义。

（3）初探IGFBP3在外周血中的表达水平及其作为肺腺癌早期诊断标志物可行性

①临床样本的收集：采集100例静脉血标本，包括50例肺腺癌患者以及50例年龄匹配的健康查体者。从每个参与者中收集1.5 ml EDTA抗凝的静脉血，离心后分离血细胞和血浆，并在4小时内于-80℃保存以确保RNA完整性。所有肿瘤患者均为初诊患者，未接受任何治疗，其最终诊断均经组织病理或细胞病理学确认。同时，收集病人相关的临床参数，包括年龄，性别，肿瘤分期，生存时间，生存状态，肺癌相关血清肿瘤标志物（CEA,NSE,SCC,CA125，CYFRA21-1）。

②外周血中IGFBP3蛋白表达水平的检测：收集并提取外周血血浆的中蛋白，western-blot检测IGFBP3蛋白表达水平。

③IGFBP3表达水平和m6A修饰水平的临床价值的评估：结合临床参数分析IGFBP3与年龄、性别、肿瘤分期、预后及肺腺癌相关肿瘤标志物的相关性。利用受试者工作曲线（ROC）分析评价IGFBP3表达水平对肺腺癌患者的预测能力，并分析与CEA，NSE，SCC，CA125，CYFRA21-1等常见肿瘤标志物的联合诊断效能。

④统计分析：采用SPSS19.0 进行分析。IGFBP3与临床参数的相关性分析采用Spearman相关性分析；以IGFBP3表达水平为检验变量，绘制ROC曲线，计算AUC、敏感度、特异度、最佳截断值。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2.技术难点

1) 拟明确IGFBP3在肺腺癌中的表达水平及与m6A甲基化调控的关系：课题组前期通过生物信息学分析及文献查阅，初步推测甲基化阅读蛋白IGFBP3在肺腺癌中表达增高，且并通过m6A甲基化调控肺腺癌的进展，为揭示肺腺癌的发病机制及早期诊断提供理论依据，但IGFBP3通过m6A甲基化调控的具体机制需进一步研究；

2）拟评估IGFBP3作为肺腺癌早期诊断标志物的可能性：前期文献调研发现甲基化阅读蛋白IGFBP3属于分泌蛋白，在外周血中表达丰度

高，且m6A甲基化在疾病的早期就显示出异常，本研究拟用临床外周血样本检测IGFBP3的表达，联合临床参数，分析IGFBP3与预后、临床分期等临床参数的相关性，并通过ROC曲线评估IGFBP3的诊断效能。

（三）项目研究的创新点和内容

本研究开展“N6-甲基嘌呤(m6A)甲基识别蛋白IGFBP3在肺腺癌中的表达及其功能研究”，从细胞、组织及外周血等不同层面揭示甲基化阅读蛋白IFGBP3在肺癌中的表达、功能及与m6A甲基化水平的相关性，并评估IGFBP3作为诊断指标的诊断效能；通过对过表达IGFBP3的肺腺癌细胞进行m6A-seq及RNA-seq联合生物信息学分析，预测IGFBP3参与肺腺癌调控的潜在通路和作用机制等方面未见公开出版物报道，具有新颖性和良好的临床应用价值（引自查新报告）。

二、项目的考核指标和成果形式

（一）核心指标

1. 理论成果：阐述IGFBP3通过m6A甲基化修饰参与肺腺癌进展的潜在功能机制，初探IGFBP3作为肺腺癌诊断标志物的诊断效能，为早期诊断提供新的理论依据；
2. 发表文章：在国际期刊发表SCI论文1-2篇，国内核心期刊1-2篇；
3. 人才培养：培养研究生1名；培养中级职称2名；提升检验科团队科研水平

（二）主要技术指标（如形成的知识产权、技术标准、新技术、新产品、新装置、论文专著等数量、指标及其水平等）

在国际期刊发表SCI论文1-2篇，国内核心期刊1-2篇

（三）主要经济指标（如技术及产品应用所形成的市场规模、效益等）

本研究通过对IGFBP3在肺腺癌N6-甲基腺嘌呤(m6A) 甲基化修饰中的作用及临床应用价值的探讨，可能为肺腺癌患者挖掘出与RNA的甲基腺嘌呤(m6A) 甲基化修饰相关的潜在新型分子诊断标志物；该项研究成果的应用意味着可能通过检测外周血IGFBP3蛋白水平，实现对肺癌进行早期诊断；且IGFBP3的m6A甲基化调控机制可能作为一个新的肿瘤治疗靶点，未来对肿瘤患者的病情监测和诊疗措施改进具有潜在应用价值

（四）其他指标（如形成的示范基地、中试线、生产线及其规模、人才队伍建设等）

培养研究生1名；培养中级职称2名；提升检验科团队科研水平

项目验收（结束）日期：2023年11月30日前

三、项目实施年度计划及目标

年度	项目计划进度及目标
2021.12-2022.6	课题开题汇报，人员间的协调和配合，耗材准备、知情同意书的发放等；制定样本收集方案，收集肺腺癌患者及正常对照组的组织样本及外周血样本；购买及培养肺腺癌及正常肺上皮细胞株；投稿综述性论文一篇
2022.7-2022.12	收集组织及外周血样本；预实验在细胞，组织和外周血中检测IGFBP3的表达；构建IGFBP3的敲低和过表达细胞；细胞功能实验检测IGFBP3在肺腺癌细胞中生物学功能；m6A甲基化试剂盒检测肺腺癌细胞系中敲低或过表达IGFBP3后m6A水平的相应改变
2023.1-2023.3	完成临床组织和外周血样本的收集； western-blot检测IGFBP3蛋白的表达水平；联合临床参数分析IGFBP3的临床诊断价值
2023.4-2023.6	完成RNA甲基化免疫沉淀测序和转录组测序及生物信息学分析;在过表达和敲除IGFBP3细胞中对潜在的下游靶点进行qPCR和western-blot验证；
2023.7-2023.12	数据资料整理；投稿研究论文一篇；准备结题材料

四、主要研究人员

	姓名	性别	年龄	工作单位	专业	职称（职务）	项目中的分工	签字

负责人	夏前林	男	31	上海市第六人民医院	临床检验诊断学	初级检验技师	临床样本的m6A甲基化水平及IGFBP3表达水平测定；m6A-seq及RNA-seq;数据整理分析	
主要成员	杜玉珍	女	49	上海市第六人民医院	临床分子诊断技术	主任技师	全面指导	
	韩坤	男	39	上海市第六人民医院	临床肿瘤学	副主任医师	临床指导	
	魏丽荣	女	31	上海市第六人民医院	细胞生物学	初级检验技师	细胞学实验	
	桂鹏程	男	23	上海市第六人民医院	医学检验	研究生	外周血和临床组织样本的采集及临床资料的收集	

五、项目经费预算(以项目预算审核报告审定的项目经费预算为准（详见附件）)

六、项目承担、合作单位分工

项目单位	主要承担任务
上海市第六人民医院	项目整体实施

七、拨款计划

	金额（万元）	备 注
第一次拨款（合同书下达后）	15	
第二次拨款（项目验收通过后）	0	
合计	0	

八、共同条款

上海市浦东新区科技和经济委员会（甲方）与项目承担单位（乙方）共同遵守以下条款：

1、各方一致同意本项目任务(合同)书中所列内容，并承担相应的责任。

2、甲方应按拨款计划如期拨款。如乙方未能按阶段计划进度执行的，甲方有权推迟拨款或停拨经费。

3、乙方应按本任务（合同）书规定的考核指标及项目实施年度计划目标，按期完成委托任务，并在项目实施中期，向甲方报送项目中期实施情况跟踪表。

4、本项目在执行过程中，如发现原定的内容、指标、执行期等确需作必要调整时，乙方须最迟在项目到期之前1个月向甲方提出书面申请，经甲方同意后，方可调整。如申请未获甲方批准，项目仍按原合同执行。

5、本项目在执行过程中，如乙方不能继续履行本任务（合同）书规定的任务时，须向甲方提出书面申请，经

甲方同意后，才能中止该项目。中止项目由甲方视情节轻重做出停拨尾款、追回已拨经费、取消乙方一定时限内申报科技发展基金项目资格等处置。甲方有权选择一种或者多种处置方式。

6、乙方应按本合同规定的资金使用范围使用项目资金。甲方有权监督经费的使用情况，凡不符合规定的开支，甲方有权提出调整意见。项目经费实际支出总额未达到预算投入总额的，按资助比例减扣项目尾款或追回全部（部分）已拨经费。

7、乙方根据需要，可与本项目的其它参加单位签订相关合同，但其经费统一由乙方与合同签订方按实结算。

8、对保密资料，各方均负有保密责任，不得公开或向外泄露应属保密的各项数据、成果内容或其它有关资料。

9、项目实施过程中，如乙方发生注册地、经营地变更、公司股权结构重大调整或项目主要研究人员变化等情况，应及时告知甲方，甲方将依据浦东新区科技发展基金有关管理办法及操作细则的相关规定作相应的处置。

10、乙方在项目执行过程中，获得重大项目进展或成果应及时通知上级立项部门和甲方；当乙方项目联系人信息发生变更时，应及时以电子邮件形式告知甲方联系人并电话确认。

11、乙方最迟应在执行期到期后1个月内向甲方提出本项目验收申请，甲方视本项目完成情况，给出通过验收、未通过验收等结论，并做出拨付尾款（部分尾款）、停拨尾款、追回已拨经费、取消乙方一定时限内申报科技发展基金项目资格等处置。甲方有权选择一种或者多种处置方式。

12、本项目执行期到期后1个月内乙方未提出验收申请的为逾期项目，做项目终止处理，由甲方视情节轻重做出停拨尾款、追回已拨经费、取消乙方一定时限内申报科技发展基金项目资格等处置。甲方有权选择一种或者多种处置方式。

13、乙方对有创新意义的新的技术方案，应及时办理专利申请手续或发表论文。本课题实施成果所发表的论文，需注明“浦东新区科技发展基金资助”。

14、本项目如涉及多家（包含两家）单位参加，乙方必须在签定本合同前与有关单位就合作任务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），作为本合同的附件。

15、自新区财政将所资助的科技发展基金资金划拨到项目单位之日起，如受资助的项目能实施产业化，则该项目应在浦东新区实施产业化。

16、乙方应配合甲方完成项目监督检查（包括审计调查等事项）、中期跟踪、验收、绩效评价等事项。如乙方违反本条款，由甲方视情节轻重做出停拨尾款、追回已拨经费、取消乙方一定时限内申报科技发展基金项目资格等处置。甲方有权选择一种或者多种处置方式。

17、合同在履行过程中发生争议的，缔约各方应通过协商的方式解决。如协商不成时，缔约各方有权向人民法院起诉，双方约定由甲方所在地浦东新区人民法院管辖。

国家自然科学基金资助项目批准通知

杜玉珍　先生/女士：

根据《国家自然科学基金条例》和专家评审意见，国家自然科学基金委员会（以下简称自然科学基金委）决定批准资助您的申请项目。项目批准号：81974315，项目名称：亲骨转移外泌体miR-22在肺癌骨转移前微环境形成中的作用及诊断价值，直接费用：55.00万元，项目起止年月：2020年01月至 2023年 12月，有关项目的评审意见及修改意见附后。

请尽早登录科学基金网络信息系统（https://isisn.nsfc.gov.cn），获取《国家自然科学基金资助项目计划书》（以下简称计划书）并按要求填写。对于有修改意见的项目，请按修改意见及时调整计划书相关内容；如对修改意见有异议，须在电子版计划书报送截止日期前向相关科学处提出。

电子版计划书通过科学基金网络信息系统（https://isisn.nsfc.gov.cn）上传，依托单位审核后提交至自然科学基金委进行审核。审核未通过者，返回修改后再行提交；审核通过者，打印纸质版计划书（一式两份，双面打印），依托单位审核并加盖单位公章后报送至自然科学基金委项目材料接收工作组。电子版和纸质版计划书内容应当保证一致。向自然科学基金委提交和报送计划书截止时间节点如下：

1、提交电子版计划书截止时间为**2019年9月11日16点**（视为计划书正式提交时间）；

2、提交电子修改版计划书截止时间为**2019年9月18日16点**；

3、报送纸质版计划书截止时间为**2019年9月26日16点**。

请按照以上规定及时提交电子版计划书，并报送纸质版计划书，未说明理由且逾期不报计划书者，视为自动放弃接受资助。

附件：项目评审意见及修改意见表

国家自然科学基金委员会

2019年8月16日

附件：项目评审意见及修改意见表

项目批准号	81974315	项目负责人	杜玉珍	申请代码1	H2005
项目名称	亲骨转移外泌体miR-22在肺癌骨转移前微环境形成中的作用及诊断价值				
资助类别	面上项目		亚类说明		
附注说明	常规面上项目				
依托单位	上海交通大学				
直接费用	55.00 万元		起止年月	2020年01月 至 2023年12月	

通讯评审意见:

<1>具体评价意见:

一、请针对创新点详细评述申请项目的创新性、科学价值以及对相关领域的潜在影响。

该项目发现外泌体miR-22是肺癌骨转移的标志物，并系统研究其在前微环境中的作用及临床诊断价值，具有较好的创新性和理论意义。选题紧密结合学科发展和实际应用需要，具有较好的潜在临床使用价值。

二、请结合申请项目的研究方案与申请人的研究基础评述项目的可行性。

研究方案和内容较翔实，设计较合理。标本和患者数据来源充足，保证了此课题的可行性。研究者研究基础较好，与本课题相关的基础较扎实。

三、其他建议

<2>具体评价意见:

一、请针对创新点详细评述申请项目的创新性、科学价值以及对相关领域的潜在影响。

本项目拟建立多价适体微流控技术筛选富集亲骨外泌体，探讨肺癌亲骨TDEs携带的miR-22通过调控HOXA4促进肺癌骨转移前微环境形成的机制，进一步检测肺癌患者血液亲骨TDEs，验证其作为肺癌骨转移分子标志物的可行性。项目具有很好的创新性，项目的实施可为肺癌骨转移早期诊断提供理论和技术支持，具有一定的科学意义及应用价值。

二、请结合申请项目的研究方案与申请人的研究基础评述项目的可行性。

项目研究方案涉及两个主要研究内容（1）核酸适体的筛选及多价适体微流控技术的建立及临床转化应用，（2）肺癌亲骨TDEs携带miR-22通过调控HOXA4促进肺癌骨转移前微环境形成的机制研究。两部分均可单独作为独立的课题研究。申请人将两部分内容整合在一起，研究内容稍显庞杂，如能聚焦其中一个方面开展更深入细致的论证和研究，科学问题会更明确，研究方案会更具可行性。

三、其他建议

<3>具体评价意见:

一、请针对创新点详细评述申请项目的创新性、科学价值以及对相关领域的潜在影响。

本项目前期研究发现肺癌源性外泌体（TDEs）携带的miR-22在骨转移患者血中升高，miR-22及其靶基因同源框A4（HOXA4）均与肿瘤转移的wnt/beta-catenin信号通路有关。提出肺癌亲骨TDEs携带的miR-22t通过调控HOXA4促进肺癌骨转移前微环境的形成。科学问题明确，有一定的创新性。项目的完成为肺癌骨转移的早期诊断和提高患者生存质量提供理论和技术支撑。

二、请结合申请项目的研究方案与申请人的研究基础评述项目的可行性。

申请人在临床实践和基础研究等方面积累了丰富的经验，有一定的基础。该项目研究内容详实具体，研究方案基本可行。建立基于核酸适体识别微流控技术的肺癌源性亲骨外泌体的快速检测新方法是项目核心，该方法的灵敏度和特异性将影响临床亲骨外泌体miR-22在肺癌骨转移的

诊疗价值的验证。

三、其他建议
无

修改意见：

医学科学部

2019年8月16日