

南华大学附属第二医院医学伦理审查表

项目名称：探讨 CD147 联合肿瘤免疫评分对肝癌预后的影响
项目负责人：许云吉 职称：主治医师 单位：南华大学附属第二医院
请求审查类型： ☒ 申请项目 ☐ 批准后项目 ☐ 延续项目 ☐ 委托项目
研究项目来源：湖南省卫健委科研计划项目
递交审查资料 ☒ 实验方案 ☐ 知情同意书 ☐ 其他资料 包括：试验用品安全性资料、生产企业资质证明、试验用品提供者的资质证明。
涉及人或动物的医学研究内容及研究方案摘要 研究内容： 1. 通过生物信息学分析原发性肝癌复发及预后相关基因：在 TCGA 数据库中利用仙桃学术分析原发性肝癌样品获得数据，发现 CD147 基因与其预后相关性。 2. 明确 CD147 是否与原发性肝癌复发、耐药相关：从临床角度出发，收集近 5 年原发性癌临床基线数据（肿瘤类型、分期、血清 AFP、血清 CEA、肝炎类型、肿瘤大小、转移情况、复发、耐药及生存时间等）。收集原发性肝癌及癌旁组织，通过其组织进行免疫组化及 Q-PCR 检测 CD147 表达及水平；结合临床基线数据评估 CD147 是否与原发性肝癌复发、耐药相关。 3. 明确 CD147 联合 TILs 是否能评价原发性肝癌的预后：利用生存曲线，明确 CD147 联合 TILs 系统评价原发性肝癌预后。 4. 细胞水平验证 CD147 是否与原发性肝癌耐药相关。 1) 以肝癌细胞 HepG2 细胞为模型，构建 HepG2 细胞耐药株，通过 Q-PCR 检测 CD147 表达水平，Western Blot 检测 CD147 和 MRD 相关蛋白表达来明确 HepG2 耐药株是否与 CD147 相关； 2) Transwell 检测细胞侵袭性，明确 HepG2 细胞耐药株侵袭性是否增加； 3) 流式细胞术检测 CD3 和 CD8，明确 CD3 和 CD8 是否与 CD147 相关； 4) 明确耐药后是明确敲低 CD147 表达进行验证，通过 cck-8 法检测 HepG2 及其耐

药株细胞活力，流式细胞检测法检测细胞凋亡，Q-PCR 检测 CD147 表达水平，Western Blot 检测 CD147 表达和 MRD 相关蛋白，以明确 CD147 是否能逆转耐药株耐药。Transwell 检测细胞侵袭性，验证 CD147 是否与 HepG2 侵袭性相关。流式细胞检测 CD3 和 CD8，验证明确 CD3 和 CD8 是否与 CD147 有关。

5. 动物实验验证 CD147 是否与原发性肝癌耐药相关及联合 TILs 系统预测预后：

1) 以裸鼠为模型，构建 HepG2 和 HepG2/5-fu 耐药株裸鼠模型，记录裸鼠瘤体大小及生存时间，Q-PCR 检测 CD147 表达水平，Western Blot 检测 CD147 和 MRD 相关蛋白表达来明确 HepG2 耐药株是否与 CD147 相关；TILs 系统进行评分，明确 TILs 是否能评估裸鼠耐药。

2) 敲低 CD147 表达进行验证，5-fu 干预，记录裸鼠瘤体及生存时间，Western Blot 检测 CD147 和 MRD 相关蛋白表达来明确裸鼠耐药后是否与 CD147 相关；TILs 系统进行评分，明确 CD147 联合 TILs 是否能评估裸鼠耐药。

研究方案

1 临床实验研究方法：

1) 临床基线数据收集：收集我院原发性肝癌临床数据：年龄、家族史、合并其他疾病、肿瘤类型、分期（TNM 分期）、血清 AFP、CEA 水平、肿瘤大小、复发及生存时间。

2) 纳入标准：①所有诊断明确原发性肝癌，临床数据保存完整者；②有手术指征，肿瘤组织完整切除；③预计生存时间 > 6 月。

3) 排除标准：①转移性肝癌；②不能手术切除肿瘤组织；③不能配合随访者。

4) 新鲜组织免疫组化及 Q-PCR 检测 CD147 表达：我院病理科进行 CD147 免疫组化，Q-PCR 检测 CD147 水平。

5) 临床数据分析 CD147 与原发性肝癌之间相关性：原发性肝癌临床数据结合 CD147 免疫组化和 Q-PCR 结果，明确 CD147 与原发性肝癌的相关性。

6) 肿瘤免疫评分系统（HadioDx）：基于肿瘤中心（CT）和浸润边缘（IM）处淋巴细胞群的定量，特别是 CD3+ 及 CD8+T 细胞。“免疫评分”提供了一个评分系统，从较低的免疫细胞密度 0 分（I0）到较高的免疫细胞密度 4 分（I4），免疫评分越高，患者的生存时间越长。

2 细胞实验研究方法：

1) HepG2 细胞株：由南华大学细胞库获取；

2) 构建肝癌细胞 HepG2/5-fu 耐药株: MTT 法检测 OD 值, 计算 IC50 值, 流式细胞术检测细胞凋亡; Transwell 检测细胞侵袭性。

3) 检测 CD147、CD3 及 CD8 在耐药株和非耐药株中表达: Western blot 检测 HepG2、HepG2/5-fu 耐药株中 CD147 表达及多药耐药相关蛋白表达 (MRD); Q-PCR 检测 CD147 表达水平; 流式细胞术检测 CD3 和 CD8 阳性率。

4) 评估 CD147 表达与肿瘤免疫评分关系: 耐药株和非耐药株中敲低 CD147 表达+5-fu, 用脂质体介导的转染方法将 CD147 特异性 siRNA 转入细胞, 进而将耐药株和非耐药株细胞中内源性 CD147 的 mRNA 表达水平敲低, MTT 法检测细胞活力、流式细胞术检测细胞凋亡和 CD3 及 CD8 细胞阳性率、Transwell 检测细胞侵袭性。western blot 检测多药耐药相关蛋白 (MRP)。

3 动物实验研究方法:

1) 构建 HepG2 和 HepG2/5-fu 裸鼠成瘤模型。

2) 每天记录肿瘤大小及裸鼠预后。

3) 检测 HepG2 和 HepG2/5-fu 裸鼠成瘤模型中 CD147 表达: 通过免疫组化、Q-PCR 及 Western blot 检测 CD147 表达及水平; 免疫组化进行肿瘤免疫评分进行评估。

4) 评估 CD147 表达与肿瘤免疫评分关系: 敲低 HepG2 和 HepG2/5-fu 裸鼠中, 加入 5-fu, 观察肿瘤大小及裸鼠预后。处理模型后, 取瘤, 测量瘤体大小, 进行肿瘤免疫评分 (免疫组化检测 CD3 和 CD8 阳性率)。Western blot 检测多药耐药相关蛋白 (MRP)。

项目负责人 (签字):

2022 年 6 月 17 日

伦理委员会审查意见

经审查, 探讨 CD147 联合肿瘤免疫评分对肝癌预后的影响 项目, 将采取研究对象 原发性肝癌患者、HepG2 和 HepG2/5fu 裸鼠、肝癌细胞 HepG2 细胞, 经医院伦理委员会审核, 此项目符合相关医学伦理和知情同意等问题的有关规定和要求, 同意开展研究。

南华大学附属第二医院医学伦理委员会章:

2022 年 6 月 17 日
医学伦理委员会