

申报编号: 22ZDYF1966

立项编号: 2022YFS0337

四川省科技计划项目 任务合同书 (重点研发项目)

项目名称: 阿帕替尼对结直肠癌的作用机制研究

承担单位: 四川大学华西医院 (盖章)

项目负责人: (签字)

推荐单位: 四川大学

立项经费: 20 (万元)

项目起止年限: 2022-01-01 至 2023-12-31

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。



一、项目信息表

项目名称	阿帕替尼对结直肠癌的作用机制研究		
起始时间	2022-01-01	终止时间	2023-12-31
知识产权	☒ 申报单位独占 ☐ 相关单位共享		

第一承担单位

单位名称	四川大学华西医院	社会信用代码	12510000450756139Y
单位地址	国学巷37号四川大学华西医院行政办公区域水塔楼	邮编	610041
职工人数	0 人	单位性质	事业单位
单位负责人	李为民	推荐单位	四川大学
联系人	吴琼	联系部门	
联系人手机	18980605674	联系人电话	(028)85422068

科研财务助理

姓名	李志贵	身份证号	51102#####718
手机号	18382009059	工作单位	四川大学华西医院

合作单位

社会信用代码	单位名称	在本项目中分工
121000004000091949	四川大学	基础实验

项目负责人

姓名	李志贵	性别	男	出生年月	1977-06-01
学历/学位	博士/ 博士	职称	主治医师	手机	18382009059
从事专业	胃肠外科				

项目组人数

项目组人数	总计__4__人，其中：高级职称__1__人， 中级职称__1__人，初级职称__1__人，其他__1__人。
-------	---

项目概述

阿帕替尼是一种最新研发的口服分子靶向药物，前期临床研究证实在晚期胃癌中取



得良好的治疗效果，国家食品药品监督管理局已批准在临床使用。结直肠癌与胃癌一样同属于腺癌，阿帕替尼是否也可以应用于结直肠癌？其具体的作用机制是什么呢？目前尚未阐述清楚。本课题将从细胞实验、移植瘤模型、临床试验研究阿帕替尼在结直肠癌中的作用机制。培养结肠癌细胞株，分别给予5-FU、阿帕替尼、5-FU+阿帕替尼处理，检测肿瘤细胞增殖、凋亡、侵袭能力。建立移植瘤模型，分别给予生理盐水、5-FU、阿帕替尼、5-FU+阿帕替尼处理，检测移植瘤大小，微血管密度，细胞增殖及凋亡，肾脏组织行病理切片检查功能受损情况。将不同处理组的细胞及移植瘤行液相色谱-质谱分析，并行生物信息学分析，筛选出差异表达基因及信号传导通路。采用shRNA及双荧光素酶报告系统等方法研究阿帕替尼对Ras/Raf/MEK/ERK信号通路的影响。结直肠癌新辅助化疗患者分别给予化疗药物，或者化疗药物联合阿帕替尼治疗，比较两组患者新辅助化疗有效率，以及TRG、微血管密度、细胞增殖情况有无差异。通过以上研究，证明阿帕替尼可抑制结直肠癌细胞增殖、新生血管生成、促进肿瘤细胞凋亡，与氟尿嘧啶协同作用可增强其抗肿瘤效果，为临床合理使用分子靶向药物提供理论支持及实践依据。



二、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) 主要目标

本项研究的主要目标是明确阿帕替尼在结肠癌细胞中的抗肿瘤活性,并明确阿帕替尼与氟尿嘧啶(5-FU)的协同作用;进一步研究其发挥协同作用的信号传导通路。通过细胞实验、移植瘤模型、蛋白质组学分析证明阿帕替尼与5-FU可协同增强抗肿瘤活性,并阻止VEGF/VEGFR-2下游信号传导通路Ras/Raf/MEK/ERK的促进肿瘤增殖作用。临床试验采用与单独药物化疗相比较,药物化疗+阿帕替尼可以提高治疗效果。通过以上研究为CRC患者使用阿帕替尼提供理论依据和数据支持。包括以下几方面内容。

细胞实验:将结肠癌细胞株分别采用5-FU、阿帕替尼、5-FU+阿帕替尼联合处理,观察癌细胞增殖活性、凋亡及转移、侵袭能力的变化,证明5-FU+阿帕替尼联合处理能抑制结肠癌细胞增殖活性,促进细胞凋亡,抑制其转移、侵袭能力。

移植瘤模型:通过建立移植瘤裸鼠模型,分别给予盐水、5-FU单药(10mg/kg)、阿帕替尼单药(2.6mg/20g)、5-FU+阿帕替尼(1.3mg/20g)联合处理,观察比较移植瘤大小,肿瘤微血管密度,细胞增殖情况,比较裸鼠肾脏功能受损情况。通过以上证明5-FU+阿帕替尼能协同抑制肿瘤生长,促进凋亡,降低微血管密度,并不明显增加肾功能损害。

蛋白质组学分析:收集药物处理细胞及移植瘤组织,提取总蛋白质行液相色谱-质谱(LC-MS)检测,并进行生物信息学分析,筛选出差异表达蛋白质。选择其中的Ras/Raf/MEK/ERK信号通路做进一步验证。

临床试验:收集120例CRC新辅助化疗患者,随机分为单独药物化疗组(奥沙利铂+卡培他滨)、化疗药物联合靶向药物治疗组(奥沙利铂+卡培他滨+阿帕替尼),术前新辅助化疗四周期后行手术治疗,证明阿帕替尼可以提高化疗药物效果。

(2) 研究内容

本项研究旨在研究阿帕替尼联合5-FU抑制结肠癌细胞增殖的作用机制,并进一步探寻其下游的Ras/Raf/MEK/ERK信号通路。本项研究采用细胞实验、移植瘤模型观察阿帕替尼对结肠癌细胞株增殖、凋亡、侵袭、微血管密度的影响,采用shRNA及双荧光素酶报告系统等方法研究阿帕替尼对Ras/Raf/MEK/ERK信号通路的影响。临床研究观察阿帕替尼联合化疗药物治疗效果及毒副作用。具体从以下几个方面逐层深入。

细胞实验:将结肠癌细胞株SW620和HT-29培养后分别给予5-FU单药、阿帕替尼单药、5-FU+阿帕替尼联合处理。采用CCK-8检测肿瘤细胞活性,流式细胞术(Flow Cytometry, FCM)



检测细胞周期, 采用 transwell 实验检测肿瘤细胞侵袭能力, qRT-PCR 及 western blot 检测 bax、caspase-3、bcl-2 基因及蛋白表达情况。

移植瘤模型: BALB/C 裸鼠建立移植瘤模型, 用生理盐水制备 HT-29 细胞悬液成 $10 \times 10^7/\text{ml}$, 右侧腋下注射细胞悬液 0.1ml, 观察成瘤情况, 当移植瘤增长至 100mm^3 时分为四组 (每组 4 只), 分别是盐水处理组, 5-FU 单药处理组, 阿帕替尼单药处理组, 5-FU+阿帕替尼联合处理组。每三天测量裸鼠重量, 移植瘤的长度和宽度。待移植瘤增长到 21 天时处死裸鼠, 分别测量各组肿瘤大小、重量, 采用免疫组化 CD31 检测微血管密度, Ki-67 检测细胞增殖情况, qRT-PCR 及 western blot 检测 bax、caspase-3、bcl-2 基因及蛋白表达情况, 肾脏组织行病理切片检查功能受损情况。体积计算公式为: 体积 = $1/2 \times (\text{长度} \times \text{宽度}^2)$ 。

蛋白质组学分析: 将不同处理组的细胞及移植瘤行 LC-MS 分析, 并行生物信息学分析, 筛选出差异表达基因及信号传导通路。采用 shRNA 技术沉默 VEGFR-2 基因表达, 再给予阿帕替尼处理, 采用 CCK-8 比较其增殖情况, FCM 检测细胞周期, 采用 transwell 实验检测肿瘤细胞侵袭能力, 采用 qRT-PCR 和 western blot 检测下游信号传导通路 Ras、MEK、ERK1/2 的基因及蛋白表达情况。通过以上研究证明沉默 VEGFR-2 后可降低阿帕替尼的抗肿瘤活性, 并促进 Ras、MEK、ERK1/2 基因及蛋白的表达。培养 239T 细胞株, 采用双荧光素酶报告系统验证 VEGFR-2/Ras 是否相互作用, 验证阿帕替尼能否阻止 VEGFR-2/Ras 信号的传导。

临床试验: 收集 120 例 CRC 新辅助化疗患者, 签署化疗同意书及临床研究同意书, 记录一般临床资料, 如住院号、年龄、性别、体表面积、生命体征、血常规、凝血功能、心脏功能、肝肾功能, 炎性指标 (IL-2、IL-6、IL-8、IL-10、TNF- α), 临床 TNM 分期, 有无高血压、糖尿病等。患者随机分为单独药物化疗组 (奥沙利铂+卡培他滨)、化疗药物联合靶向药物治疗组 (奥沙利铂+卡培他滨+阿帕替尼), 术前新辅助化疗四周期后再次监测生命体征, 完善血常规、凝血功能、心脏功能、肝肾功能、炎性指标 (IL-2、IL-6、IL-8、IL-10、TNF- α), 临床 TNM 分期, 并行手术切除, 比较术后标本肿瘤退缩等级 (TRG), 采用免疫组化 CD31 检测微血管密度, Ki-67 检测细胞增殖情况。比较两组患者新辅助化疗有效率, 以及 TRG、微血管密度、细胞增殖情况有无差异, 证明阿帕替尼可提高化疗药物疗效。化疗药物剂量为: 奥沙利铂 $125\text{mg}/\text{m}^2$, d1, 卡培他滨 $2000\text{mg}/\text{m}^2$, 分两次口服, d1-14, 三周重复。阿帕替尼药物剂量为: 0.25g, 口服, 每天一次。

(3) 技术关键

从细胞水平上验证阿帕替尼可增强 5-FU 的抗肿瘤活性, 促进细胞凋亡, 降低其转移、侵



衰能力。从移植瘤模型上验证阿帕替尼能增强 5-FU 的抗肿瘤活性，促进细胞凋亡，降低微血管密度，抑制肿瘤扩散，无明显肾脏毒副作用。在进一步的信号通路验证中，证明 VEGF/VEGFR-2 通路的下游信号传导通路为 Ras/Raf/MEK/ERK，沉默 VEGFR-2 可抑制阿帕替尼的抗肿瘤活性，不能抑制下游的信号传导通路。本项研究的技术关键是药物处理时浓度的掌握，解决的办法是根据相关文献，采用不同梯度的药物浓度进行预实验，避免浓度过低时观察不到药物疗效，浓度过高时导致细胞和裸鼠死亡。临床研究中主要观察患者毒副作用，避免严重不良事件的发生。

(4) 技术路线：

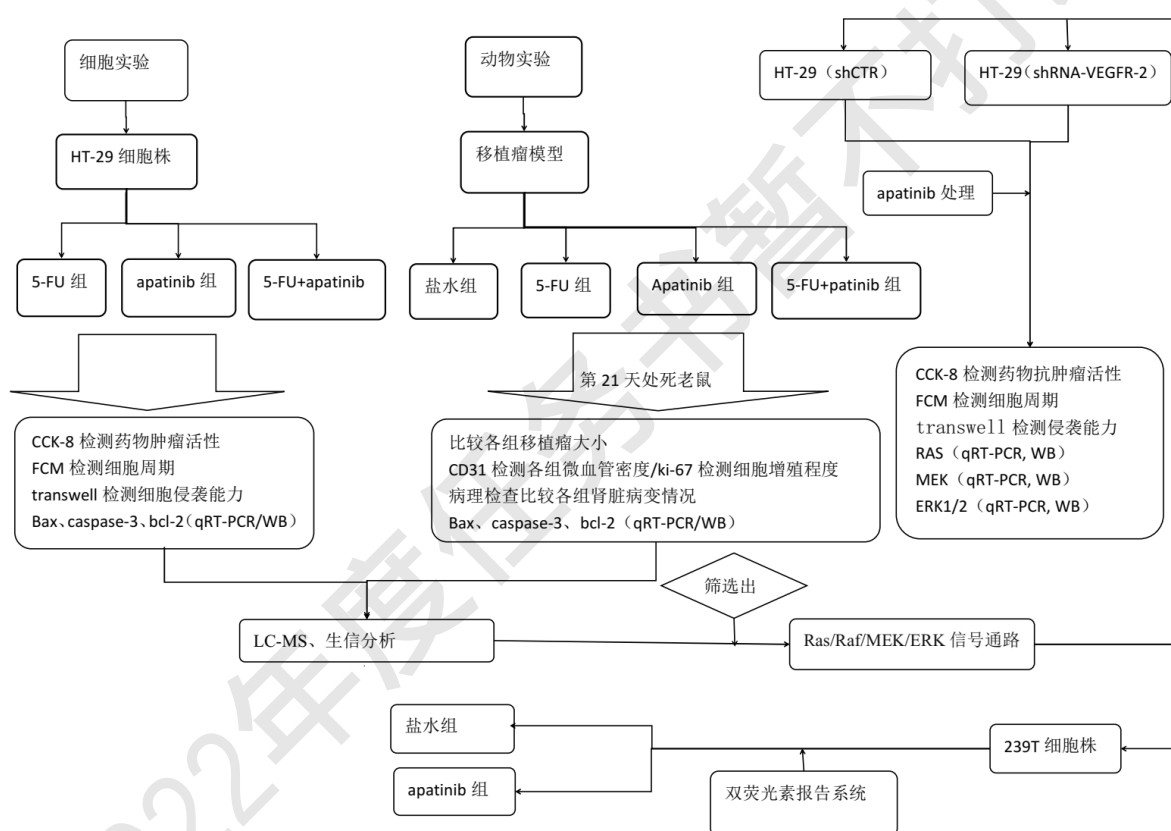


图 1 技术路线图（基础部分）



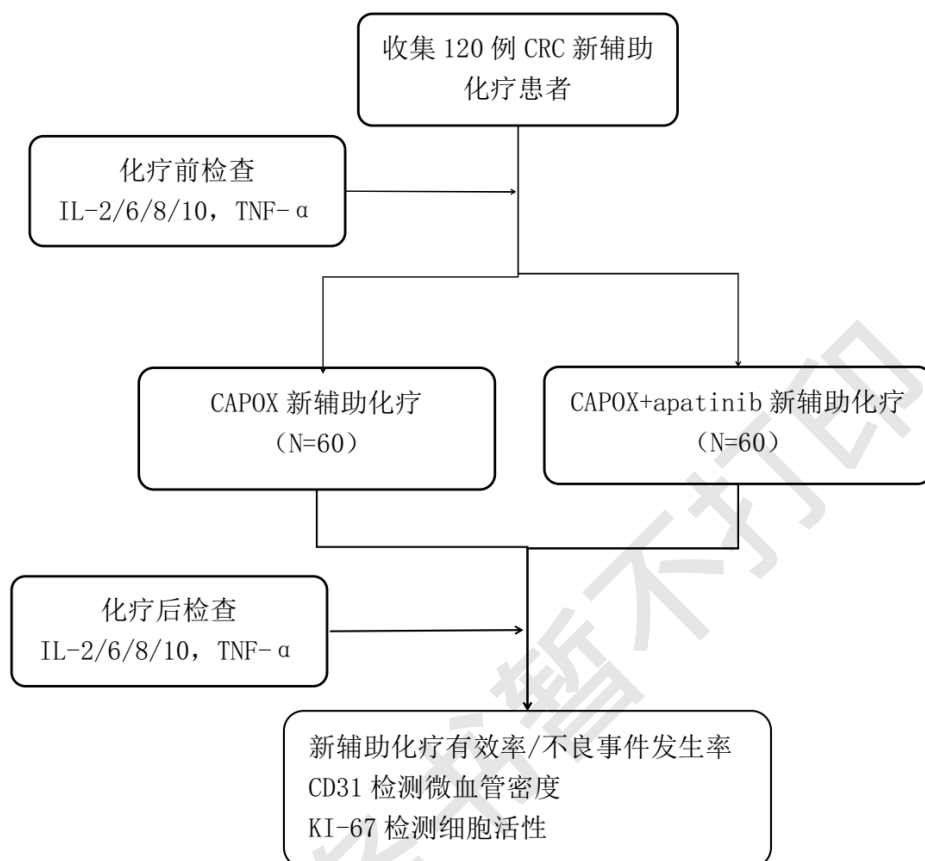


图 2 技术路线图（临床部分）

