杭州市医药卫生科技项目
合 同 书

计划类别：

□重大项目

□重点项目

☑一般项目

课题名称：肿瘤相关巨噬细胞 Dectin-1/Syk 信号通路调节前列腺癌进展的作用及其机制研究

项目编号:A20220540

申请者： 付贤

申请单位：杭州市第一人民医院

联系手机：18205814852

申请日期：2021-11-22

杭州市卫生健康委员会

二０一八年制

杭州市卫健委科教管理系统

杭州市卫健委科教管理系统

一、项目情况

项目名称	肿瘤相关巨噬细胞 Dectin-1/Syk 信号通路调节前列腺癌进展的作用及其机制研究		
研究类别	基础研究		
一级学科	临床医学	二级学科	泌尿外科学
开始日期	2022-01-01	完成日期	2024-12-31

项目经费预算 （万元）

总计	向市卫生健康委申请	区县（市）卫健局配套	单位配套	其他
2.00	0.00		2.00	

专项项目经费开支预算（万元）		项目配套经费开支预算（万元）	
设备费		设备费	0
材料费		材料费	1
测试化验加工费		测试化验加工费	0.2
燃料动力费		燃料动力费	0
差旅费、会议费、合作协作研究与交流费		差旅费、会议费、合作协作研究与交流费	0
出版/文献/信息传播/知识产权事务费		出版/文献/信息传播/知识产权事务费	0.2
劳务费		劳务费	0.18
专家验收费		专家验收费	0.42
专家咨询费		专家咨询费	0
其他		其他	0
管理费用		管理费用	0
绩效支出		绩效支出	0
合计		合计	2

杭州市卫健委科教管理系统

二、预计成果

定量指标			
论文数	其中 SCI 数	其中发明专利数	著作数
1	1	1	0
新产品	技术标准	培养硕士数	培养博士数
0	0	1	0
定性指标			
预期目标 1	明确前列腺癌肿瘤微环境中模式识别受体-Dectin-1 的表达水平和细胞定位；明确前列腺癌肿瘤相关巨噬细胞上 Dectin-1 对肿瘤进展和肿瘤微环境中炎症和免疫的调节作用及其具体分子机制，为最终开发高效的前列腺癌分子靶向治疗药物奠定基础。		
预期目标 2	预计可以培养硕士研究生 1 人，发表 SCI 论文 1 篇，参加国内学术会议 1 次，申请实用新型发明专利 1 项，并积极推动专利知识产权应用转化。		
预期目标 3	在项目顺利完成基础上，申请杭州市科技进步奖或浙江省科技进步奖。在项目基础上，继续深入研究，申请省自然基金项目及国家自然科学基金项目。		
预期目标 4			
预期目标 5			

杭州市卫健委科教管理系统

三、承担单位

第一申请单位			
单位名称	杭州市第一人民医院	邮编	310006
联系电话	0571-56005600	联系人	汪暑萍

合作单位				
序号	单位名称	联系人	联系电话	职责
1				
合作单位盖章：				
合作单位盖章		合作单位盖章		
合作单位盖章		合作单位盖章		
合作单位盖章		合作单位盖章		

杭州市卫健委科教管理系统

四、项目组成员

负责人			
姓名	付贤	身份证号	360429198910091013
出身年月	1989-10-09	手机	18205814852
职务	在职医学博士；科室住院总；教学秘书	专业	泌尿外科；
学历	硕士研究生	学位	硕士
工作单位	杭州市第一人民医院		

其他成员					
序号	姓名	出生年月	职称	工作单位	项目分工
1	汪凯	1987-07-04	中级	杭州市第一人民医院	数据统计
2	王旭亮	1978-07-18	高级	杭州市第一人民医院	课题指导
3	李宁	1993-10-03	初级	杭州市第一人民医院	前列腺癌动物模型的建立，数据统计
4	刘海波	1996-09-29	初级	杭州市第一人民医院	负责 WB、PCR、免疫荧光以及流式细胞术等

杭州市卫健委科教管理系统

五、 附件信息

是否有查新检索报告：	
是否使用实验动物：	是
是否涉及伦理问题：	否
是否涉及实验室生物安全：	否
是否涉及干细胞：	否
是否是临床前新技术研究：	否
是否涉及病毒研究	否

杭州市卫健委科教管理系统

六、 承诺书

本单位（或个人）承诺：

本申请书中所填写的内容和资料真实、有效，如存在弄虚作假和与事实相违背的内容，由本单位（个人）承担全部责任。

申报单位（盖章）：

项目申报人签字：

年 月 日

七、 单位审核意见

申报单位意见：

单位（盖章）：

年 月 日

上级主管部门意见：

单位（盖章）：

年 月 日

八、 市卫健委终审意见

市卫健委审核意见：

市卫健委（盖章）：

年 月 日

杭州市卫健委科教管理系统

杭州市医药卫生科研项目可行性报告

肿瘤相关巨噬细胞 Dectin-1/Syk 信号通路调节前列腺癌进展的作用及其机制研究

1、立项的背景和意义

根据最新的全球癌症统计数据，前列腺癌已经成为男性发病率最高的泌尿系统肿瘤，具有高发病率和死亡率的特点，严重危害人类健康；国内的统计数据显示，前列腺癌在中国的发病率为 3.25%，居男性癌症的第 6 位，且前列腺癌的发病人数和死亡人数依然保持不断增长的趋势[1]。目前，关于前列腺癌的发病机制尚未完全阐明。近年来，学者们就肿瘤微环境、外泌体、非编码 RNA、基因突变等因素在肿瘤的发生、发展中的作用展开了大量研究，取得了部分成果，但仍无法明确阐明前列腺癌复杂的生物学过程[2-4]。

前列腺腺体内炎症-免疫级联反应是前列腺癌的关键致病因素，并在肿瘤进展的过程中发挥重要作用；炎症反应通过改变肿瘤微环境成分，影响前列腺癌的发生发展[5]。在炎症反应过程中，腺体内浸润的炎症细胞数量增加分泌大量的促炎细胞因子和氧自由基，加重局部损伤破坏 DNA 从而影响促癌基因和抑癌基因的变异，同时炎症细胞产生多种趋化因子（CCL2、CXCL1、CXCL2 等），进一步募集肿瘤相关巨噬细胞（Tumor-associated macrophage，TAMs）的浸润，两者协同改变肿瘤微

杭州市卫健委科教管理系统

环境的改变，诱导前列腺癌的发生[6]。肿瘤微环境是由多种细胞和相关结构组成的动态网络结构，其中 TAMs 是肿瘤微环境的重要组成成分，与肿瘤预后密切相关。TAMs 通过分泌 IL-10 和 TGF-β 影响机体的免疫功能，抑制机体抗肿瘤免疫反应，促进肿瘤的进展。TAMs 的功能状态具有高度可塑性，可分为 M1 型和 M2 型，M2 型巨噬细胞可促进肿瘤的进展，M1 型巨噬细胞则发挥抗肿瘤作用[7]。相关研究表明调节肿瘤微环境中巨噬细胞表型，促使其向 M2 型极化可加速前列腺癌的进展[8]；在膀胱癌研究中发现，Kdm6a 基因缺失通过细胞因子和趋化因子通路，调控 TAMs 表型向 M2 转变，进而增加肿瘤干细胞的分化活性促进肿瘤的进展[9]；在前列腺癌组织中，LINC00467 上调可通过 miR-494-3p/STAT3 信号通路调控 TAMs 的表型变化，促进肿瘤的发生发展[10]。**由此可见，肿瘤微环境中 TAMs 状态及其诱导产生的炎症反应是调控肿瘤进展的重要机制并可成为未来前列腺癌治疗的重要干预靶点。深入研究前列腺癌肿瘤微环境中 TAMs 的功能状态及其对炎症-免疫级联反应的调控机制，降低肿瘤的发病率和死亡率、并为前列腺癌的治疗提供新的思路和方向具有十分重要的意义。**

2、国内外现状和发展趋势

肿瘤巨噬细胞 Dectin-1 受体作为 C 型凝集素受体家族中的一员，主要表达于巨噬细胞、树突状细胞等髓系来源细胞膜表面，参与调节机体免疫反应过程并在多种疾病中发挥重要作用

杭州市卫健委科教管理系统

[11]。最初研究发现 Dectin-1 在真菌 β-葡聚糖的刺激下激活并通过下游的 Syk/Card9 信号通路发挥抗真菌作用[12]。肿瘤炎症-免疫级联反应受多种信号和不同机制的调节，近年来相关研究表明 Dectin-1 与肿瘤相关炎症免疫关系密切，涉及多种肿瘤的病变过程，2016 年 Nature Communication 报道发现激活黑色素瘤肿瘤微环境中树突状细胞表面的 Dectin-1 受体可促使 CD4+T 细胞向 Th9 细胞分化从而发挥抗肿瘤的作用[13]；而 2017 年 Nature medicine 研究发现在胰腺癌肿瘤微环境中巨噬细胞表面 Dectin-1 的激活可增加机体对肿瘤的免疫耐受，促进肿瘤的进展[14]；可见 Dectin-1 受体在肿瘤病变过程中所发挥的具体作用和机制仍存在争议。但目前 Dectin-1 是否表达于前列腺癌相关巨噬细胞表面，且 Dectin-1 在前列腺癌中发挥的作用尚无研究报道。**基于此，我们前期动物实验表明：与正常小鼠前列腺相比，前列腺癌原位种植瘤动物模型的前列腺组织中 Dectin-1 表达水平明显升高，且主要定位于巨噬细胞。由此我们猜测 Dectin-1 可能在前列腺癌的发生发展过程中发挥作用，但其具体作用机制需进一步研究探讨。**

Dectin-1 作为模式识别受体的之一，可在多种病理因素的刺激下启动下游信号通路，参与炎症免疫级联反应的发展和调控。研究发现 Syk 是 Dectin-1 发挥作用的直接下游，两者间相互作用参与多种疾病中的炎症反应并调节巨噬细胞表型的变化；激活肿瘤微环境中树突状细胞上 Dectin-1，作用于 Syk 增

杭州市卫健委科教管理系统

加 p50 和 ReIB 的核转位，从而使 CD4+T 细胞向 Th9 细胞转变，从而发挥抗肿瘤作用[13]；在胰腺癌的研究中发现阻断 Syk 可恢复机体对肿瘤的免疫反应，并促进 CD4+和 CD8+效应 T 细胞的激活，减缓肿瘤的生长[14]。**由此可见，Dectin-1/Syk 信号通路在肿瘤的进展过程中发挥重要作用，可能是治疗肿瘤的潜在靶点。我们前期动物实验已证明前列腺癌组织中 Dectin-1 表达水平明显升高，同时检测肿瘤组织中 Syk 的表达水平亦出现明显升高。但是，TAMs 中的 Dectin-1/Syk 信号通路调节前列腺癌的作用及具体机制尚缺乏深入研究。**

TAMs 作为肿瘤微环境的主要结构成分，在肿瘤发生、进展过程中挥发重要作用，同时也是肿瘤治疗的关键靶点[15, 16]。TAMs 除了产生分泌促血管生成因子和生长因子直接参与肿瘤的进展外，亦可通过相关免疫调节因子，影响肿瘤微环境中的包括 T 细胞在内的其他免疫细胞参与肿瘤的发生发展[17, 18]。不同类型的 T 细胞在肿瘤微环境中发挥的作用各异，CD4+T 细胞浸润增加可加速前列腺癌的进展和转移[19]；NKT 细胞通过重塑肿瘤微环境从而延缓肿瘤的进展[20]；CD8+T 细胞浸润增加往往提示预后不良[21]。由此可见，前列腺癌肿瘤微环境中 T 细胞的浸润同样是影响肿瘤发生和进展的重要因素。但是在前列腺癌的肿瘤微环境网络中，TAMs 与 T 细胞间的相互关系目前尚不清楚，既往在胰腺癌的研究中发现，TAMs 上的 Dectin-1 激活后通过相关的信号通路，调节肿瘤中浸润 T 细胞的免疫表型，从

杭州市卫健委科教管理系统

而调节肿瘤的进展，前期实验已证明 Dectin-1 参与前列腺癌的病程中，故我们猜想在前列腺癌中 Dectin-1 可以调节 TAMs 表型的变化，进而调节肿瘤微环境中浸润 T 细胞的表型，影响肿瘤的进展。

综上，申请人提出以下**实验假设：前列腺癌肿瘤微环境中 TAMs 上 Dectin-1 受体表达上调，使机体肿瘤免疫反应受到抑制，加速肿瘤的进展；药物干预阻断 Dectin-1，通过调节 TAMs 表型，可抑制肿瘤进展，其潜在机制与 Dectin-1/Syk 信号通路相关。**为证明上述假设，申请人拟通过构建小鼠前列腺癌模型结合蛋白免疫印迹、免疫荧光以及流式细胞术等技术，明确肿瘤微环境中 Dectin-1 和 Syk 的变化情况和细胞定位；然后，利用药物干预的方式分别抑制 Dectin-1 和 Syk，探究两者对肿瘤微环境和肿瘤进展的影响；探索 Dectin-1 通路调节前列腺癌进展的具体分子机制。本课题是申请人在既往对前列腺癌方向研究的基础上，结合当下热点方向进行的进一步探索，开展此项研究科较为深入的揭示 Dectin-1/Syk 信号通路再调节前列腺癌进展中的作用及具体的作用机制，期以为前列腺癌的治疗提供新的方向和思路。

参考文献：

[1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.

杭州市卫健委科研管理系统

[2] Zhang P, Yang X, Wang L, et al. Overexpressing miR-335 inhibits DU145 cell proliferation by targeting early growth response 3 in prostate cancer [J]. Int J Oncol, 2019, 54(6): 1981-94.
[3] Uegaki M, Kita Y, Shirakawa R, et al. Downregulation of RalGTPase-activating protein promotes invasion of prostatic epithelial cells and progression from intraepithelial neoplasia to cancer during prostate carcinogenesis [J]. Carcinogenesis, 2019, 40(12): 1535-44.
[4] Cutano V, Di Giorgio E, Minisini M, et al. HDAC7-mediated control of tumour microenvironment maintains proliferative and stemness competence of human mammary epithelial cells [J]. Mol Oncol, 2019, 13(8): 1651-68.
[5] Archer M, Dogra N, Kyprianou N. Inflammation as a Driver of Prostate Cancer Metastasis and Therapeutic Resistance [J]. Cancers (Basel), 2020, 12(10).
[6] De Bono J S, Guo C, Gurel B, et al. Prostate carcinogenesis: inflammatory storms [J]. Nat Rev Cancer, 2020, 20(8): 455-69.
[7] Cioni B, Zaalberg A, Van Beijnum J R, et al. Androgen receptor signalling in macrophages promotes TREM-1-mediated prostate cancer cell line migration and invasion [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 4498.
[8] Sullivan C, Brown N E, Vasiliauskas J, et al. Prostate Epithelial RON Signaling Promotes M2 Macrophage Activation to Drive Prostate Tumor Growth and Progression [J]. Mol Cancer Res, 2020, 18(8): 1244-54.
[9] Kobatake K, Ikeda K I, Nakata Y, et al. Kdm6a Deficiency Activates Inflammatory Pathways, Promotes M2 Macrophage Polarization, and Causes Bladder Cancer in Cooperation with p53 Dysfunction [J]. Clin Cancer Res, 2020, 26(8): 2065-79.
[10] Jiang H, Deng W, Zhu K, et al. LINC00467 Promotes Prostate Cancer Progression via M2 Macrophage Polarization and the miR-494-3p/STAT3 Axis [J]. Front Oncol, 2021, 11: 661431.
[11] Tone K, Stappers M H T, Willment J A, et al. C-type lectin receptors of the Dectin-1 cluster: Physiological roles and involvement in disease [J]. Eur J Immunol, 2019, 49(12): 2127-33.
[12] Chen J, Zhao Y, Chu X, et al. Dectin-1-activated dendritic cells: A potent Th9 cell inducer for tumor immunotherapy [J]. Oncoimmunology, 2016, 5(11): e1238558.
[13] Zhao Y, Chu X, Chen J, et al. Dectin-1-activated dendritic cells trigger potent antitumour immunity through the induction of Th9 cells [J]. Nat Commun, 2016, 7: 12368.
[14] Daley D, Mani V R, Mohan N, et al. Dectin 1 activation on macrophages by galectin 9 promotes pancreatic carcinoma and peritumoral immune tolerance [J]. Nat Med, 2017, 23(5): 556-67.
[15] Zhou K, Cheng T, Zhan J, et al. Targeting tumor-associated macrophages in the tumor microenvironment [J]. Oncol Lett, 2020, 20(5): 234.
[16] Noy R, Pollard J W. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy [J]. Immunity, 2014, 41(1): 49-61.

[17] Fujiwara T, Yakoub M A, Chandler A, et al. CSF-1/CSF-1R Signaling Inhibitor Pexidartinib (PLX3397) Reprograms Tumor-Associated Macrophages and Stimulates T-Cell Infiltration in the Sarcoma Microenvironment [J]. Mol Cancer Ther, 2021.
[18] Zhu Y, Knolhoff B L, Meyer M A, et al. CSF1/CSF1R blockade reprograms tumor-infiltrating macrophages and improves response to T-cell checkpoint immunotherapy in pancreatic cancer models [J]. Cancer Res, 2014, 74(18): 5057-69.
[19] Waning D L, Mohammad K S, Guise T A. Cancer-associated osteoclast differentiation takes a good look in the miR(NA)ror [J]. Cancer Cell, 2013, 24(4): 407-9.
[20] Cortesi F, Delfanti G, Grilli A, et al. Bimodal CD40/Fas-Dependent Crosstalk between iNKT Cells and Tumor-Associated Macrophages Impairs Prostate Cancer Progression [J]. Cell Rep, 2018, 22(11): 3006-20.
[21] Ness N, Andersen S, Valkov A, et al. Infiltration of CD8+ lymphocytes is an independent prognostic factor of biochemical failure-free survival in prostate cancer [J]. Prostate, 2014, 74(14): 1452-61.

3、研究内容、研究目标、拟解决的问题和今后研究思路

3.1 研究内容

3.1.1 前列腺癌肿瘤微环境中模式识别受体-Dectin-1 表达和分布情况探究：

通过原位种植前列腺癌细胞构建小鼠前列腺癌动物模型，模型构建成功后，通过 Western blot 和 PCR 技术，并于正常前列腺组织比较，从基因表达和蛋白水平探究 Dectin-1 在前列前癌中变化情况；同时通过免疫荧光手段探究前列腺癌中 Dectin-1 的主要表达细胞类型。

3.1.2 肿瘤相关巨噬细胞 Dectin-1 受体在前列腺癌进展的具体作用：

前期实验结果提示：Dectin-1 在前列腺癌与正常前列腺组织存在差异性表达，我们猜测 Dectin-1 可能涉及肿瘤的免疫反

杭州市卫健委科教管理系统

应，分别予以 Dectin-1 特异性的激动剂和抑制剂，从肿瘤大小、肿瘤细胞的增殖活力、肿瘤基因表达、肿瘤相关巨噬细胞表型、肿瘤微环境免疫及 T 细胞浸润情况等方面探究 Dectin-1 在前列腺癌中的作用。

3.1.3 肿瘤相关巨噬细胞 Dectin-1 受体调节前列腺癌进展具体分子机制探究：

明确 Dectin-1 在前列腺癌中的作用后，进一步探究其发挥作用的具体分子机制。Syk 是 Dectin-1 直接下游作用分子，通过 PCR 和 WB 探究 Syk 在前列腺癌组织中的表达情况，为进一步探究 Dectin-1/Syk 在前列腺癌中的作用，在前列腺癌动物模型构建成功后，予以 Syk 特异性抑制剂抑制 Syk，从肿瘤大小、肿瘤细胞的增殖活力、肿瘤基因表达、肿瘤相关巨噬细胞表型、肿瘤微环境免疫及 T 细胞浸润情，验证 Dectin-1/Syk 信号通路在前列腺癌中的作用。

3.2 研究目标

3.2.1 明确前列腺癌肿瘤微环境中模式识别受体-Dectin-1 的表达水平和细胞定位

3.2.2 明确前列腺癌肿瘤相关巨噬细胞上 Dectin-1 对肿瘤进展和肿瘤微环境中炎症和免疫的调节作用。

3.2.3 探究前列腺癌中肿瘤相关巨噬细胞上 Dectin-1 对肿瘤进展和肿瘤微环境中炎症和免疫的调节作用的具体分子机制。

3.3 拟解决的问题

杭州市卫健委科教管理系统

3.3.1. 明确 TAMs 中 Dectin-1 在前列腺癌中的作用，阐明 Dectin-1 对肿瘤生长、微环境炎症的影响

3.3.2. 揭示 TAMs 中 Dectin-1 通过 Syk 受体调控前列腺癌进展的具体作用机制。

3.4 今后研究思路

本项目申请人从事泌尿系统肿瘤的基础工作 近十年，主要致力于前列腺炎及前列腺腺癌发病机制、耐药机制、转移机制以及治疗的研究；其研究工作同时涉及到 miRNA、树突状细胞、免疫治疗等相关内容。通过本课题实施，能更好地了解 TAMs 中 Dectin-1 在前列腺癌发生、发展及治疗中的作用，了解 Dectin-1 通过 Syk 受体调控前列腺癌进展的具体作用机制，为最终开发高效的前列腺癌分子靶向治疗药物奠定基础。

为更好地支持本项目，课题组在前期工作中已获得关键数据 (详见前期工作基础)。因此，通过前期工作积累，本课题组已经获得开展课题所需的技术和基础，有可能资助下在该领域取得一些突破性成果。

4、研究方法、技术路线和进度安排

4.1 研究方法

4.1.1 前列腺癌肿瘤微环境中模式识别受体-Dectin-1 表达和分布情况探究

(1) 实验分组：

空白对照组和前列腺癌组

杭州市卫健委科教管理系统

(2) 前列腺癌小鼠模型的构建：

随机挑选 6～8 周龄 C57BL／6 雄鼠 3 只，将 RM-1 前列腺癌肿瘤细胞株传代 3 次后注射(细胞浓度为 2×107 个／mL)到小鼠背部皮下(每只注射 0.1 mL。)，次日起观察肿瘤生长情况。待模型鼠皮下肿瘤长至长径为 1 cm 左右时随机取出 2 只模型鼠作为小鼠原位肿瘤种植模型的材料。

模型鼠施以用 1%戊巴比妥钠麻醉后剥离肿瘤组织。将取出的瘤组织块浸泡在生理盐水中，用眼科剪剪成约 1 mL 注射器针头针眼大小(用 1 mL 注射器针头将其吸住且不至于将其轻易漏掉为准)备用，组织块浸泡时间≤30 min。随机挑取同周龄 1 只小鼠施以用 1%戊巴比妥钠麻醉，然后将小鼠仰卧位硬纸板固定，常规备皮消毒，沿小鼠下腹部腹白线作长 1．0～1．5 cm 切口，显露腹腔。在 10 倍镜下，找到膀胱并将其向头端翻转，将脂肪组织推向两侧，显露前列腺，镜下呈粉红色岛状结构，有明显的腺体组织特征。1 人在显微镜下主导找到前列腺的准确位置，另一操作者在主导人的引导下将瘤组织块注射到前列腺组织包膜下，然后将脏器归位，用 6-0 可吸收肠线关腹，待小鼠苏醒后回笼。自肿瘤种植完成起每天观察小鼠的精神状态、饮食、活动等一般生命体征，小鼠每 3 d 称重 1 次。第 12d 将存活模型鼠处死并取出瘤组织，游标卡尺测量瘤组织最大长径。将瘤组织经 4％多聚甲醛溶液固定，石蜡包埋，制片后行 HE 染色，显微镜观察肿瘤组织的病理形态学情况。

杭州市卫健委科教管理系统

(3) 前列腺癌动物模型构建成功后，留取正常前列腺组织和前列腺癌组织提取蛋白，比较两组间 Dectin-1 蛋白水平差异；同时取上述两组间组织，提取总 RNA，后进行 PCR 从基因水平探究前列腺癌组织中 Dectin-1 表达情况变化；

(4) 前列腺癌动物模型构建成功后，留取两组前列腺组织进行冰冻切片，通过免疫荧光方法探究在前列腺癌中 Dectin-1 的细胞定位：使用 F40/80 标记巨噬细胞、Ly-6G 标记中性粒细胞、CD3 标记 T 细胞，染色完成后利用荧光显微镜观察 Dectin-1 在前列腺癌组织中的细胞定位。

4.1.2 肿瘤相关巨噬细胞 Dectin-1 受体在前列腺癌进展的具体作用

在上一步实验结果的基础上，本部分通过构建前列腺癌动物模型，并通过相应的干预手段，探究 Dectin-1 对前列腺癌的具体调节作用。

(1) 实验分组：

空白对照组、前列腺癌组、前列腺癌+Curdlan 组和前列腺癌+Laminaria 组

(2) Dectin-1 对前列腺癌进展的调节作用：

在小鼠原位肿瘤种植手术成功后，前列腺癌+Curdlan 组小鼠予以 Curdlan(Dectin-1 特异性激动剂)治疗，前列腺癌+Laminaria(Dectin-1 特异性抑制剂)，前列腺癌组小鼠予以相应溶剂予以治疗，空白对照组为正常健康小鼠；在治疗后 14 天

杭州市卫健委科教管理系统

后从微观和宏观的角度评估肿瘤的进展情况：包括腺体超微结构的改变和肿瘤实体的大小；同时通过 Ki67 染色评估不同组间肿瘤细胞的增值活力。

(3) Dectin-1 对前列腺癌肿瘤微环境中巨噬细胞表型的调节作用：

在小鼠原位肿瘤种植手术成功后，不同组间的治疗同上述；在治疗后 14 天后评估肿瘤微环境中炎症因子和 TAMs 表型的变化情况：i. PCR 探究炎症因子的变化情况（TNF-α、IL-1β、IL-6）；ii. 免疫荧光染色探究 TAMs 表型标志物的改变：M1 型巨噬细胞 (iNOS、CD16/32、CD68)和 M2 型巨噬细胞 (CD206、TGF-β、Arg1)；iii.流式细胞术检测肿瘤微环境中不同状态巨噬细胞比例变化：M1 型 TAMs ($CD45^{low}CD11b^{+}CX3CR1^{+}CD68^{+}$)和 M2 型 TAMs ($CD45^{low}CD11b^{+}CX3CR1^{+}CD206^{+}$)。

(4)Dectin-1 对前列腺癌肿瘤微环境中 T 细胞的调节作用：

在小鼠原位肿瘤种植手术成功后，不同组间的治疗同上述；在治疗后 14 天后评估肿瘤微环境 T 细胞浸润的影响：i. 免疫荧光染色探究前列腺癌肿瘤微环境中总的 T 细胞的浸润情况即 $CD3^{+}$细胞总数；ii.流式细胞术检测肿瘤微环境中不同亚型 T 细胞比例变化 CD4T 细胞($CD45^{+}CD3^{+}CD4^{+}$)、CD8T 细胞 ($CD45^{+}CD3^{+}CD8^{+}$)和调节性 T 细胞 ($CD45^{+}CD3^{+}CD8^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$)。

杭州市卫健委科研管理系统

4.1.3 肿瘤相关巨噬细胞 Dectin-1 受体调节前列腺癌进展具体机制探究

明确 Dectin-1 在前列腺癌中发挥的具体作用后，本部分实验探究 Dectin-1 在影响前列腺癌病程进展中的具体作用机制。

(1) 实验分组：

空白对照组、前列腺癌组、前列腺癌+Curdlan 组和前列腺癌+Curdlan+Piceatannol 组

(2)Syk 对前列腺癌进展的调节作用：

在小鼠原位肿瘤种植手术成功后，前列腺癌 + Curdlan 小鼠予以 Curdlan(Dectin-1 特异性激动剂)治疗，前列腺癌 + Curdlan + Piceatannol 组(Syk 特异性抑制剂)，前列腺癌组小鼠予以相应溶剂予以治疗，空白对照组为正常健康小鼠；在治疗后 14 天后从微观和宏观的角度评估肿瘤的进展情况：包括腺体超微结构的改变和肿瘤实体的大小；同时通过 Ki67 染色评估不同组间肿瘤细胞的增值活力。

(3) Syk 对前列腺癌肿瘤微环境中巨噬细胞表型的调节作用：

在小鼠原位肿瘤种植手术成功后，不同组间的治疗同上述；在治疗后 14 天后评估肿瘤微环境中炎症因子和 TAMs 表型的变化情况：i. PCR 探究炎症因子的变化情况（TNF-α、IL-1β、IL-6）；ii. 免疫荧光染色探究 TAMs 表型标志物的改变：M1 型巨噬细胞 (iNOS、CD16/32、CD68)和 M2 型巨噬细胞 (CD206、TGF-β、Arg1)；iii.流式细胞术检测肿瘤微环境中不

杭州市卫健委科教管理系统

同状态巨噬细胞比例变化：M1 型 TAMs ($CD45^{low}CD11b^{+}CX3CR1^{+}CD68^{+}$)和 M2 型 TAMs ($CD45^{low}CD11b^{+}CX3CR1^{+}CD206^{+}$)。

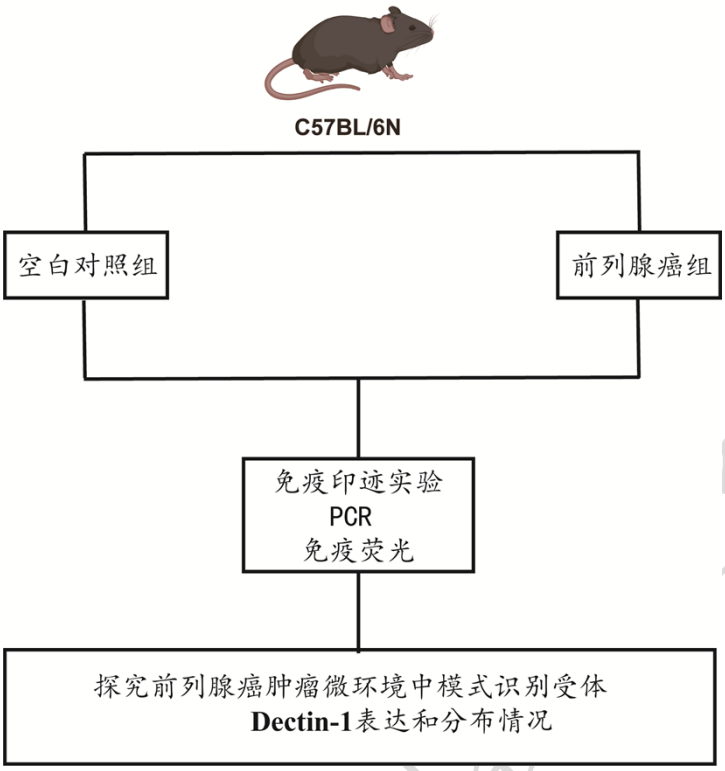
(3) Syk 对前列腺癌肿瘤微环境中 T 细胞的调节作用：

在小鼠原位肿瘤种植手术成功后，不同组间的治疗同上述；在治疗后 X 天后评估肿瘤微环境 T 细胞浸润的影响：i.免疫荧光染色探究前列腺癌肿瘤微环境中总的 T 细胞的浸润情况即 $CD3^{+}$细胞总数；ii.流式细胞术检测肿瘤微环境中不同亚型 T 细胞比例变化：CD4T 细胞($CD45^{+}CD3^{+}CD4^{+}$)、CD8T 细胞($CD45^{+}CD3^{+}CD8^{+}$)和调节性 T 细胞 ($CD45^{+}CD3^{+}CD8^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$)。

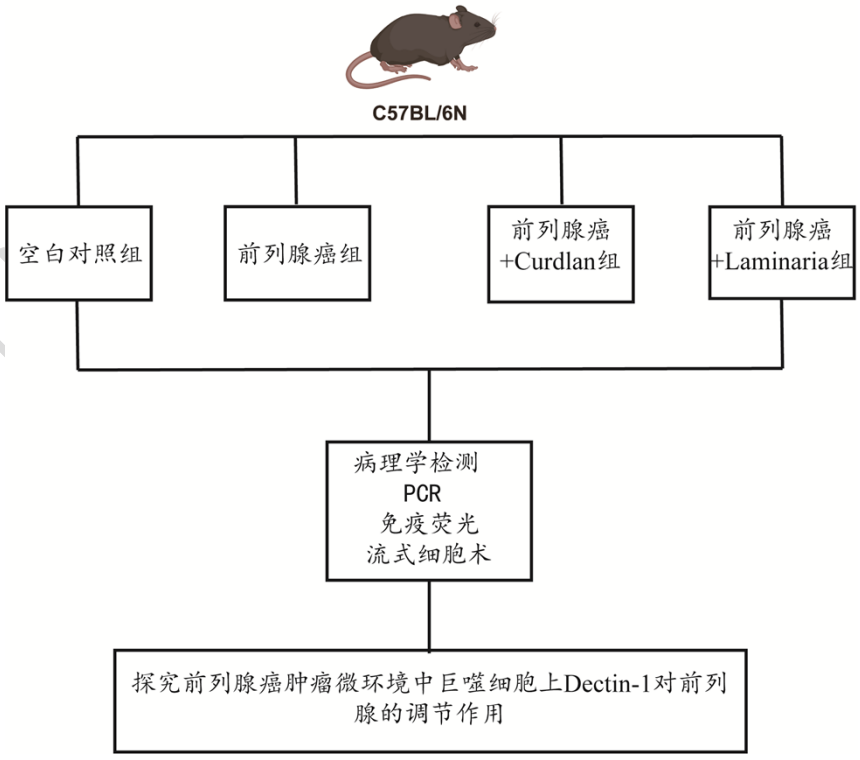
4.2 技术路线

4.2.1 技术路线 1

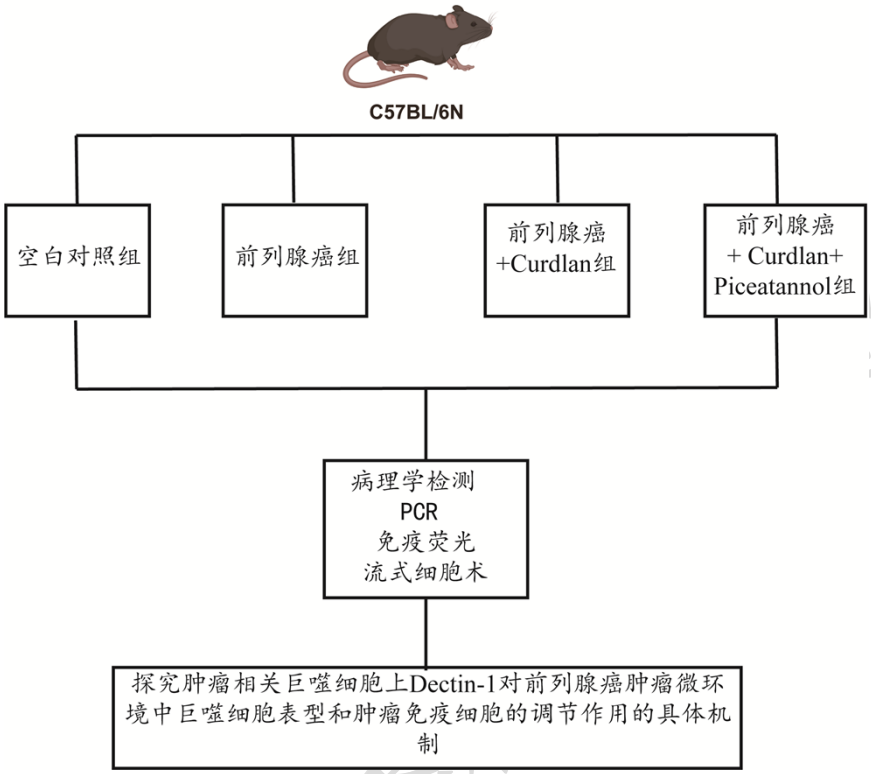
杭州市卫健委科教管理系统


C57BL/6N
空白对照组
前列腺癌组
免疫印迹实验
PCR
免疫荧光
探究前列腺癌肿瘤微环境中模式识别受体
Dectin-1表达和分布情况

4.2.2 技术路线 2


C57BL/6N
空白对照组
前列腺癌组
前列腺癌
+Curdlan组
前列腺癌
+Laminaria组
病理学检测
PCR
免疫荧光
流式细胞术
探究前列腺癌肿瘤微环境中巨噬细胞上Dectin-1对前列
腺的调节作用

4.2.3 技术路线 3



4.3 进度安排：

本项目预期研究期限为 3 年：

2022-01-01——2022-12-31

构建小鼠前列腺癌动物模型，确定前列腺癌肿瘤微环境中模式识别受体-Dectin-1 表达和分布情况

2023-01-01——2023-12-31

确定肿瘤相关巨噬细胞 Dectin-1 受体在前列腺癌进展的具体作用及具体分子机制 Dectin-1/Syk 信号通路在前列腺癌中的作用

2024-01-01——2024-12-31

总结研究成果，发表文章，撰写验收报告，准备验收。

5、主要创新点

5.1 本项目的开展将首次阐明前列腺癌肿瘤微环境中巨噬细胞可通过模式识别受体 Dectin-1 调控前列腺癌的进展。

5.2 本项目依据前期扎实的工作基础开拓性地提出肿瘤相关巨噬细胞 Syk 受体是 Dectin-1 的直接下游成分，创新性地探索 Dectin-1 通过 Syk 受体调控前列腺癌肿瘤微环境中巨噬细胞表型和肿瘤免疫的作用和潜在分子机制，有望为前列腺癌患者的治疗提供新思路和理论依据。

6、项目预期成果、考核指标

6.1 理论成果：明确肿瘤相关巨噬细胞上 Dectin-1 受体参与前列腺癌的进展；抑制 Dectin-1 可调节 TAMs 表型和肿瘤微环境中炎症的变化，从而发挥抗肿瘤进展的作用；揭示 TAMs 上 Dectin-1 通过 Syk 受体调节前列腺癌肿瘤微环境中炎症反应和免疫应答作用。

6.2 论文发表及专利发明：发表论文 1-2 篇，其中包含 1 篇 SCI 论文；申请实用新型发明专利 1 项，并积极推动专利知识产权应用转化。

6.3 人才培养：培养硕士研究生 1 名。

6.4 学术交流：参加国内学术交流 1 次。

杭州市卫健委科教管理系统

6.5 在项目顺利完成基础上，申请杭州市科技进步奖或浙江省科技进步奖。在项目基础上，继续深入研究，申请省自然基金项目及国家自然科学基金项目。

7、现有工作基础和条件

7.1 工作基础

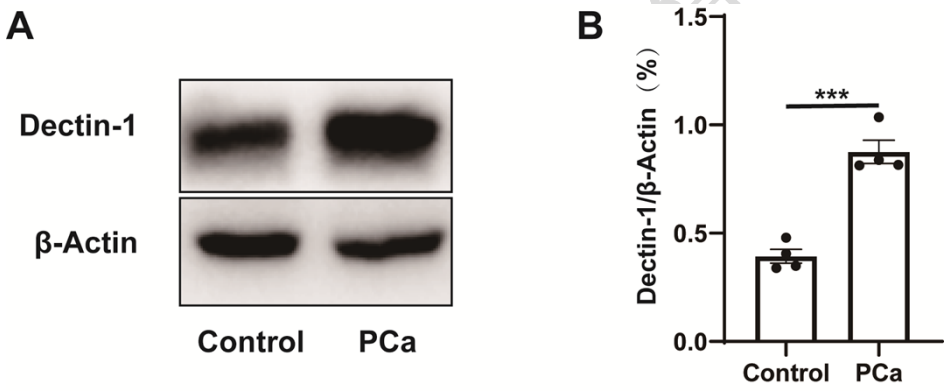
申请者长期从事前列腺癌方面临床与基础研究，研究生阶段接受了良好的科研训练，具有很强的创新能力和严密的科研逻辑思维，熟练掌握多项基础实验技术如：Western Blot 技术、冰冻切片、免疫组化技术、动物灌注固定、组织冰冻切片及免疫组化技术、流式细胞术、RT-PCR、裸鼠移植瘤模型建立、真核表达载体构建、细胞转染、细胞培养等技术，并在浙江中医药大学接受了动物实验的培训，接受了小鼠、大鼠的前列腺癌模型的显微外科训练，掌握了各种医学统计分析方法和生信分析软件。2012-2015 年期间参与研究了浙江省自然科学基金（一般）项目《负载存活素与粘蛋白 1 的 DC 激活免疫效应细胞治疗去势抵抗前列腺癌》（编号：Y13H050024）；2017-2020 年期间参与研究了浙江省科技计划公益技术应用研究（动物实验）项目 《MicroRNA-155 调控 Th17 细胞分化及功能在慢性前列腺炎形成机制中的作用研究》（编号：2017C37145）。目前作为第一作者或共一作者发表 SCI 期刊论文 3 篇，第一作者或共一作者发表中文核心期刊 5 篇。申请人对前列腺炎及前列腺癌的发病机制及治疗具有深入的研究，前

杭州市卫健委科教管理系统

期已经深入探究了 miRNA、树突状细胞、免疫治疗等相关内容，相关成果已经在 Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology （IF:2.601）、KAOHSIUNG J MED SCI （IF:2.744）及中华实验外科杂志上发表正式发表。本项目正是在这些前期工作的基础上进一步的深入研究，这也是本项目科学假说可靠的重要依据。

课题预实验结果：

7.1.1 前列腺癌组织中 Dectin-1 表达量的变化



图一.与正常前列腺相比，前列腺癌组织中 Dectin-1 表达量明显升高。

7.1.2 前列腺癌组织中 Syk 表达量的变化

杭州市卫生管理系统

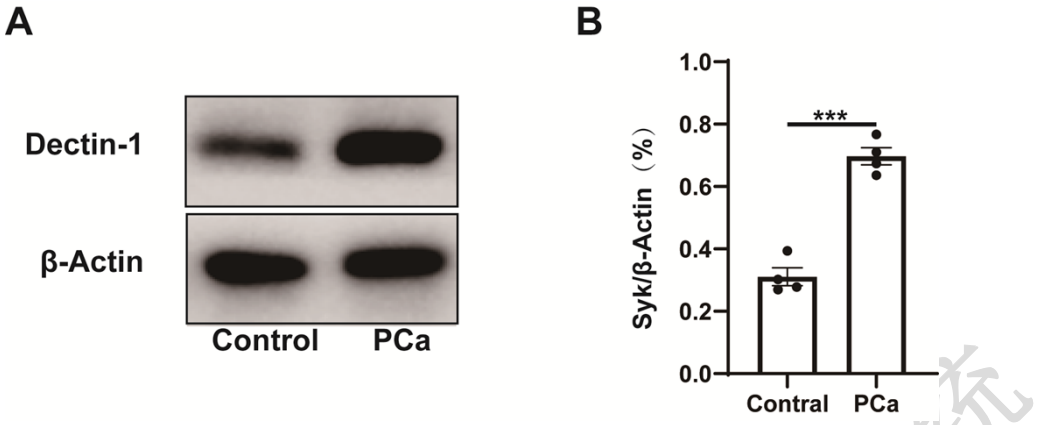


图 2. 与正常前列腺相比，前列腺癌组织 Syk 表达量明显升高。

7.1.3 Dectin-1 可明显抑制前列腺癌 DU-145 肿瘤细胞的生长

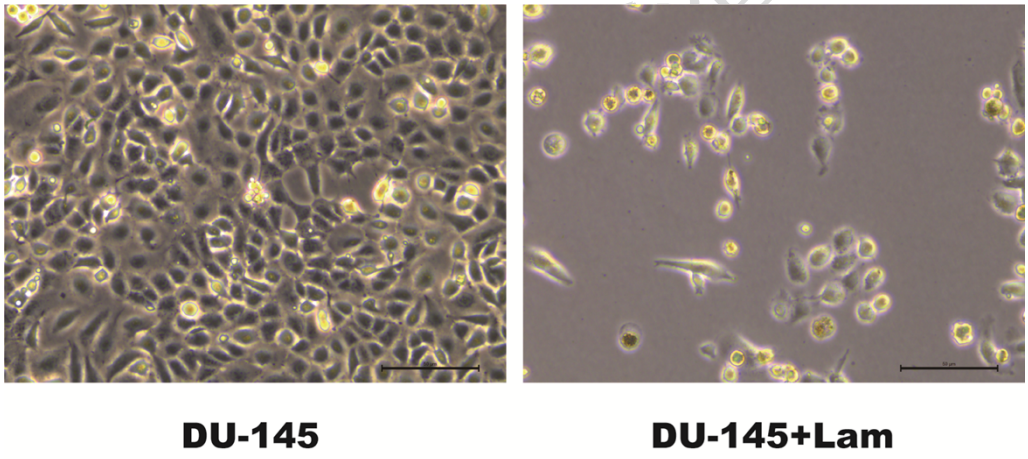


图 3. Dectin-1 特异性抑制剂-Lam 可明显抑制 DU-145 细胞的增殖活性。

7.1.4 激动 Dectin-1 对可促进小鼠前列腺癌进展

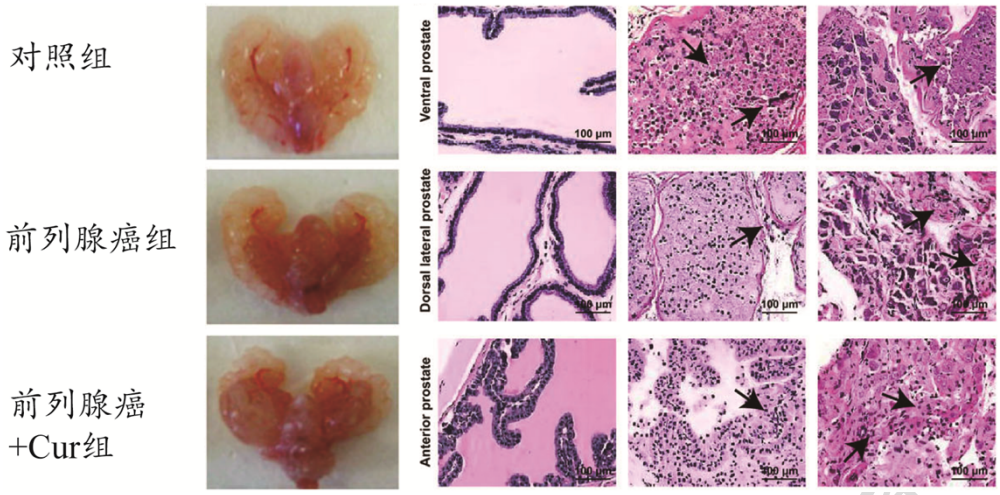


图 4. 前列腺癌小鼠动物模型构建成功后，予以 Dectin-1 特异性激动剂治疗 14 天后取前列腺癌组织，从大体观和 HE 染色检测前列腺癌微结构的变化，结果显示激动 Dectin-1 受体可明显促进前列腺癌的进展。

7.2 工作条件

7.2.1 实验条件可行

申请人工作所在医院是一所学科设置齐全的浙江省内大型三级甲等综合性医院，医院拥有能够满足泌尿外科发展与亚专业建设的各类辅助科室和技术力量。本院与泌尿外科相关的主要科室如肿瘤放疗、麻醉与重症医学科、肿瘤放疗放射科、核医学科、超声科等整体实力雄厚。依托单位设立癌症中心：为拥有肿瘤放射治疗学市级一类重点医学学科，配备了一批世界领先的高尖端放疗设备，先后引进了国内多名肿瘤学著名专家，严格遵循“科学规范治疗、重视个体差异”原则，大力推行肿瘤多学科合作诊治模式，已成立多个多学科疾病诊治协作

杭州市卫健委科教管理系统

组（MDT），形成了肿瘤的放疗、化疗、热疗、介入治疗、生物治疗及中医中药等多种治疗手段相结合的综合治疗中心，为肿瘤患者术后后续治疗提供保障。肿瘤放射科与泌尿外科密切协作，采用手术结合放射技术，治疗前列腺癌、肾癌、膀胱癌等。学科带头人现但任中华医学会放疗分会副主任委员，浙江省医学会放疗分会主任委员，杭州市医学会肿瘤分会主任委员，多所高校硕博导师。

本项目组所在的动物中心实验室为国家重点实验室，该研究中心下设细胞生物学实验室、分子生物实验室、细胞培养室、SPF 级动物实验室等多个部门，能开展肿瘤、非编码 RNA、干细胞等方面研究，曾承担多项国家和省市级自然科学基金的研究，具有完善的实验配套设施以及健全的科研人员配制。研究中心的工作条件完全能满足本项目的需要。研究中心还配备了先进的细胞生物学、分子生物学等方面的仪器设备，主要仪器设备包括流式细胞仪、小动物 IVC 饲养系统、二氧化碳培养箱、超净工作台、荧光定量 PCR 扩增仪、倒置显微镜、荧光显微镜、蛋白质纯化装置、凝胶成像系统、深低温冰箱。本研究中心完全具备开展本项目的实验条件。这些完备的基础设施能够保证本研究的顺利实施。

7.2.2 人才组成可行:

本团队人员组成合理，有高级职称医师、主治医师、住院医师及在读硕士研究生，有在职博士及硕士。项目组成员有丰

杭州市卫健委科研管理系统

富的课题研究经验，并在国内外顶级杂志发表多篇论著。其中项目负责人和主要成员曾主持和参与省部级、厅级课题的经验，发表多篇高质量研究论文，有申请数十项实用新型专利和项发明专利经历。

8、经费预算与说明

经费预算 2 万元：

预算科目名称	经费来源（万）	
	拨款	单位配套
材料费		1.0
测试化验加工费		0.2
差旅费、会议费		0
出版/文献/信息传播/知识产权事务费		0.2
劳务费		0.18
专家验收费		0.42
管理费		0
合计	0	2

预算说明：

项目预算总计 2 万元，其中 1.0 万材料费，用于的购买动物实验小鼠、WB 实验、PCR 实验耗材；0.2 万元测试加工费，用于做流失细胞学检测、免疫荧光检测等；专家验收结题需要课题经费约 0.42 万；研究生等人员劳务需要课题经费约 0.18

杭州市卫健委科教管理系统

万；申请专利、发表论文需要课题经费约0.2万。以上所有预算费用由单位配套经费支出。

杭州市卫健委科教管理系统