

河北省自然科学基金资助项目

计划书

项目名称	IL-17/IL-17R 通过抑制细胞周期下调肝癌化疗敏感性的作用机制研究		
项目编号	H2016209007		
项目类别	面上项目		
所属学科 1	医学	学科代码	H1609
所属学科 2	医学	学科代码	H1604
负 责 人	吴景华		
依托单位	华北理工大学		
起止年月	2016 年 01 月至 2018 年 12 月		
申请时间	2015 年 06 月 15 日		

河北省自然科学基金委员会制

一、基本信息

申请人信息	姓名	吴景华	性别	男	出生年月	1976-08	固定电话	0315-2592091
	学位	博士	职称	副教授	民族	汉族	移动电话	13832852811
	证件名称	身份证	证件号码	130227197608214413			电子信箱	tswujinghua@163.com
	工作单位	华北理工大学						
	个人通信地址	河北省唐山市建设南路 73 号华北理工大学附属医院					邮政编码	063000
	主要研究领域	肿瘤免疫学						
依托单位	单位名称	华北理工大学						
	联系人	王震	联系电话	0315-2592091	电子邮箱	kycjkh@heut.edu.cn		
	上年度单位研发投入		上年度单位销售收入		上年度单位研发投入/销售收入			
	万元		万元		%			
	性质				规模			
	其他特征							
合作单位	合作单位 1	单位名称	河北医科大学第二医院					
		联系人	曹青	联系电话				
	合作单位 2	单位名称						
		联系人		联系电话				
项目内容摘要 (限 800 字内)	IL-17/IL-17R 是介导炎症发生和发展的重要分子,其在肿瘤发生发展中的作用也日益受到关注。我们在前期试验中发现, IL-17/IL-17R 可以介导肝癌细胞自噬,并抑制其细胞周期,由此推断 IL-17/IL-17R 通过自噬来抑制细胞周期可能在下调化疗敏感性中发挥着重要作用。本研究拟利用抗体阻断、siRNA、细胞转染等技术确立 IL-17/IL-17R 通过介导细胞自噬下调化疗敏感性的作用及机制,应用免疫荧光、免疫共沉淀、激光共聚焦等技术探讨 JAK/STAT 及 PI3K/AKT/ GSK-3β 信号通路在诱导自噬中的作用与相互关系,并建立耐药细胞株及基因敲除动物模型对此推断进一步验证。本研究的成功立项及预期目标的完成,将有助于丰富对 IL-17/IL-17R 与肝癌耐药产生及机制的认识,加深对 IL-17/IL-17R 通过诱导自噬而导致肿瘤耐药的理 解,从而有益于抗肿瘤耐药措施的建立。							
关键词 (用分号分开, 最多 5 个)		肝癌, IL-17/IL-17R, 细胞自噬, 细胞周期, 化疗敏感性						

二、课题组成员及分工

序号	姓名	性别	年龄	职称	学位	现从事专业	证件号码	单位名称	分工
1	吴景华	男	38	副教授	博士	肿瘤免疫学	130227197608214413	华北理工大学	项目负责人
2	曹青	女	52	其他中级	学士	实验诊断学	130105196303300689	河北医科大学第二医院	临床标本的采集处理与检测
3	郭佳培	女	24	其他	学士	实验诊断学	130637199102061521	华北理工大学	动物学实验
4	陈俊卯	男	38	副教授	硕士	肿瘤诊断学	133024197610052612	华北理工大学	信号通路检测
5	王沂	女	35	讲师	硕士	实验诊断学	120224197911280922	华北理工大学	基因检测
6	蔡永冉	女	26	其他	学士	实验诊断学	13043119900902214X	华北理工大学	蛋白质检测
7									
8									
9									
10									

总人数	高级	中级	初级	其它	博士后	博士	博士生	硕士	硕士生
6	2	2	2	0	0	1	0	2	0

三、项目经费来源与支出预算

单位：万元

预算科目名称	合计	专项经费	自筹经费	配套经费
一、经费来源	6.00	6.00	0	0
二、经费支出	6.00	6.00	0	0
（一）直接费用	5.50	5.50	0	0
1、设备费	0.00	0.00	0	0
（1）购置设备费	0.00	0.00	0	0
（2）试制设备费	0.00	0.00	0	0
（3）设备改造与租赁费	0.00	0.00	0	0
2、材料费	4.00	4.00	0	0
3、测试化验加工费	0.20	0.20	0	0
4、燃料动力费	0.00	0.00	0	0
5、差旅费	0.30	0.30	0	0
6、会议费	0.00	0.00	0	0
7、国际合作与交流费	0.00	0.00	0	0
8、出版/文献/信息传播/知识产权事务费	1.00	1.00	0	0
9、劳务费	0.00	0.00	0	0
10、专家咨询费	0.00	0.00	0	0
11、其他支出	0.00	0.00	0	0
（二）间接费用	0.50	0.50	0	0
其中：绩效支出	0.00	0.00	0	0
省自然科学基金费 拨付进度	第 1 年	第 2 年	第 3 年	
金额	6.00	0.00	0.00	

详细列示其他支出：

河北省自然科学基金

承担单位、合作单位经费预算明细表									
序号	单位名称	单位类型	任务分工	研究任务 负责人	合计	专项经费		自筹 经费	配套 经费
						小计	其中：间 接费用		
1	华北理工大学	承担单位	项目负责人	吴景华	6	6	0.5	0	0
2	河北医科大学第二医院	合作单位	临床标本的采集与 处理	曹青	0	0	0	0	0
3					0	0	0	0	0
累计					6	6	0.5	0	0

四、研究内容、研究目标、拟解决的关键科学问题、创新点及预期成果

1.研究内容

1.1 IL-17/IL-17R 在肝癌中表达的检测

- (1) 临床肝癌组织的取材：选取河北联合大学附属医院肿瘤科经皮肝穿刺奥沙利铂化疗前后的肝癌标本。
- (2) 正常肝组织取材：外伤致肝损伤后切除的正常肝脏组织。
- (3) 传代细胞系的选择：L02，SMMC7721，HepG2 细胞。
- (4) ELISA 法测定奥沙利铂化疗前后肝癌患者血清中 IL-17 的浓度。
- (5) RT-PCR 检测肝癌组织及传代细胞系中 IL-17R mRNA 的表达情况；Western blot 及流式细胞术检测肝癌组织及传代细胞 IL-17R 蛋白的表达情况。

1.2 IL-17/IL-17R 下调化疗敏感性的检测

(1) 化疗对肝癌细胞 IL-17R 蛋白表达的影响

MTT 法确定奥沙利铂作用肝癌细胞的最佳条件；分别于奥沙利铂在最佳条件下作用肝癌细胞前后，Western Blot 检测细胞表面 IL-17R 的变化情况。

(2) IL-17R 对肝癌细胞凋亡敏感性的影响

奥沙利铂分别联合细胞因子 IL-17 及 IL-17R 特异性阻断剂作用肝癌细胞后，western blot 检测凋亡相关蛋白 Bcl-2、BAX 和 caspase-3 的表达情况，流式细胞术检测凋亡情况。

1.3 IL-17/IL-17R 通过诱导自噬下调化疗敏感性及其机制

1.3.1 IL-17/IL-17R 上调肝癌细胞自噬的表达

奥沙利铂作用肝癌细胞后，提取蛋白检测自噬相关蛋白 Beclin-1，LC3，P62 的表达情况。奥沙利铂分别联合 IL-17 及 IL-17R 特异性阻断剂作用肝癌细胞后，western blot 检测自噬相关蛋白 Beclin-1，LC3，P62 的变化情况。

1.3.2 IL-17/IL-17R 上调肝癌细胞自噬的机制研究

(1) IL-17/IL-17R 信号传导的活化通路

奥沙利铂作用肝癌细胞后，western blot 检测检测 JAK/STAT 信号通路及 PI3K/AKT 信号通路关键节点蛋白的活化情况（JAK，p-JAK，STAT，

p-STAT, PI3K, p-PI3K, AKT, p-AKT, GSK-3 β , p-GSK-3 β)。siRNA 阻断肝癌细胞 IL-17R 表达, 经奥沙利铂作用后, western blot 检测 JAK/STAT 信号通路及 PI3K/AKT 信号通路关键节点蛋白的活化情况 (JAK, p-JAK, STAT, p-STAT, PI3K, p-PI3K, AKT, p-AKT, GSK-3 β , p-GSK-3 β)。

(2) 阻断 JAK/STAT 通路后检测自噬的情况

JAK/STAT 通路的特异阻断剂 AG490 阻断细胞 JAK/STAT 通路后, 奥沙利铂作用细胞, western blot 检测自噬相关蛋白 (Beclin-1, Lc3, P62) 的变化情况。

(3) 阻断 PI3K/AKT 通路后检测自噬的情况

PI3K/AKT 通路的特异阻断剂 LY294002 阻断细胞 PI3K/AKT 通路后作用, 奥沙利铂作用细胞, western blot 检测自噬相关蛋白 (Beclin-1, LC3, P62) 的变化情况。

1.3.3 PI3K/AKT 与 JAK/STAT 信号通路的 Crosstalk 作用

(1) 阻断 JAK/STAT 信号通路后, 奥沙利铂作用肝癌细胞, 检测 PI3K/AKT 信号通路关键节点蛋白 (PI3K, p-PI3K, AKT, p-AKT, GSK-3 β , p-GSK-3 β) 的变化情况。同样, 阻断 PI3K/AKT 信号通路后, 检测 JAK/STAT 通路的关键节点蛋白 (JAK, p-JAK, STAT, p-STAT) 的表达及活化情况。

(2) 免疫荧光及免疫共沉淀, 激光共聚焦方法检测 PI3K/AKT 信号通路中 GSK-3 β 与 JAK/STAT 信号通路中 JAK, STAT 蛋白的结合情况。

1.4 IL-17/IL-17R 诱导自噬对细胞周期的抑制作用

特异性阻断 IL-17/IL-17R 诱导的自噬通路后, 检测细胞周期蛋白 D1 的表达情况, 应用流式细胞术检测细胞周期的情况。

1.5 细胞周期的抑制对化疗敏感性的调控作用

分别通过肝癌细胞过表达 CyclinD1 与干扰 CyclinD1 表达来改变细胞周期 G1 期的比例后, 加入奥沙利铂作用, western blot 检测凋亡相关蛋白 Bcl-2, BAX, caspase 3 的表达情况, 流式细胞术检测凋亡情况。

1.6 动物学实验

(1) 肝癌动物模型的建立

野生 C57BL/6 小鼠 (WT) 和基因敲除 IL-17R C57BL/6 (IL-17R^{-/-}) 的小鼠, 联合采用二甲基亚硝胺 (DEN)/四氯化碳 (CCl₄)/乙醇诱导成瘤。

(2) 药物处理后肝脏肿瘤的检测

取肝癌小鼠模型 WT 和 IL-17R^{-/-}，奥沙利铂治疗 2 周后，脱颈处死小鼠，检测肝脏表面可见肿瘤的体积及数量。

(3) 将(2)中的部分肿瘤组织，提取蛋白，进行凋亡及自噬相关蛋白的检测。

2. 研究目标

2.1 通过应用包括临床组织标本、传代细胞系及实验动物模型等多种实验对象，了解肝癌细胞通过 IL-17/IL-17R 诱导细胞自噬的特征和机制，丰富对肝癌细胞通过自噬下调化疗药物敏感性机制的了解，并以此延缓甚至消除肝癌化疗药物耐药性的产生。

2.2 在确定肝癌细胞通过 IL-17/IL-17R 诱导细胞自噬的前提下，应用 JAK/STAT 信号通路的特异性阻断剂及 siRNA 技术，进一步探讨 JAK/STAT 信号通路在诱导细胞自噬中所发挥的作用。

2.3 通过特异性抗体阻断、siRNA 技术，初步确定 PI3K/AKT-GSK-3 β 信号通路与肝癌细胞自噬的关系。了解肝癌细胞 PI3K/AKT/GSK-3 β 与 JAK/STAT 通路间的 Crosstalk 作用。

2.4 通过特异性敲除肝癌细胞 IL-17R 的表达，研究其对细胞周期的调控作用，进而探讨其对化疗耐药的预防与逆转。

3. 拟解决的科学问题

3.1 随着临床化疗药物的大量应用，肿瘤细胞对化疗药物产生抵抗和耐药现象也日渐突出，为肿瘤的治疗带来了重重困难，但其产生耐药的机制目前还没有明确的定论。因此，本研究将对这方面的内容加以探究，若取得预期结果，将丰富对这一领域的了解。

3.2 IL-17/IL-17R 在肿瘤发生及发展中的作用及其机制已有大量研究，但其在诱导耐药方面还未见报道，本研究将力图阐明 IL-17/IL-17R 诱导肿瘤细胞自噬产生、抑制细胞周期及与此相关的耐药机制。

3.3 不同的信号通路可以调节相同目标蛋白的表达，实现了信号通路间的 Crosstalk，以此确保细胞内信号的适时准确传递。本研究将对 JAK/STAT 及 PI3K/AKT/GSK-3 β 两条信号通路在同时诱导肝癌细胞自噬及下调化疗敏感性中的相互调节作用加以探究，并希望在自噬的诱导及调节信号网络系统

方面有所建树。

4.项目的特色与创新之处

4.1 本课题首次对肝癌细胞通过 IL-17/IL-17R 下调化疗敏感性进行探索，并试图通过阻断肝癌细胞 IL-17/IL-17R 表达，对肝癌细胞耐药的延缓甚至逆转进行研究，从而有益于临床肝癌的治疗与控制。因此，本研究具有很强的原始创新性和临床应用前景。

4.2 自噬在肝癌中的产生机制及作用方式还有很多未知之处，本课题首次尝试将 JAK/STAT 信号通路与自噬的诱导产生进行关联。同时，利用信号通路间的 Crosstalk 调控自噬表达也将是本课题进行的全新尝试，是在总结自身工作基础上进行的大胆设想与创新。

5.预期成果

5.1 了解肝癌细胞化疗后高表达 IL-17/IL-17R 与化疗敏感性之间的关系，丰富对肝癌细胞产生耐药机制的了解。

5.2 确定 IL-17/IL-17R 诱导自噬的信号传导通路及多信号通路间的 Crosstalk 作用。

5.3 在整体动物水平验证 IL-17/IL-17R 诱导自噬进而阻滞细胞周期是造成肝癌细胞产生耐药的重要机制之一，丰富对自噬与耐药机制的认识。

5.4 发表 SCI 论文 2-3 篇；培养硕士研究生 3-4 名。

项目负责人承诺：

我接受河北省自然科学基金的资助，遵守《河北省自然科学基金管理办法》及相关规定，严格按照任务合同书实施本项目（项目编号：H2016209007）。

项目负责人签字：

年 月 日

依托单位、承担单位及合作单位承诺：

我单位同意承担上述河北省自然科学基金资助项目，遵守《河北省自然科学基金管理办法》及相关规定，保证项目实施所需的条件。

依托单位公章

日期：

承担单位公章

日期：

合作单位公章

日期：

河北省自然科学基金委员会意见：

同意对项目（项目编号：H2016209007）进行资助，严格按《河北省自然科学基金管理办法》及相关规定履行管理职责。

河北省自然科学基金委员会（公章）

年 月 日