



项目批准号	82060551
申请代码	H1609
归口管理部门	
依托单位代码	73003018C0035-3918



国家自然科学基金委员会 资助项目计划书

资助类别: 地区科学基金项目

亚类说明: _____

附注说明: _____

项目名称: sCLU通过CDC25A诱导胆管癌化疗耐药机制及其作为联合治疗靶点的潜在价值研究

直接费用: 34万元 执行年限: 2021.01-2024.12

负责人: 孟文勃

通讯地址: 甘肃省兰州市城关区东岗西路1号

邮政编码: 730000 电 话: 0931-8356697

电子邮件: ██████████

依托单位: 兰州大学第一医院

联系人: 王玉平 电 话: 0931-8356657

填表日期: 2020年10月05日

国家自然科学基金委员会制



国家自然科学基金委员会资助项目计划书填报说明

- 一、项目负责人收到《关于国家自然科学基金资助项目批准及有关事项的通知》（以下简称《批准通知》）后，请认真阅读本填报说明，参照国家自然科学基金相关项目管理办法及《国家自然科学基金资助项目资金管理办法》（请查阅国家自然科学基金委员会官方网站首页“政策法规”栏目），按《批准通知》的要求认真填写和提交《国家自然科学基金委员会资助项目计划书》（以下简称《计划书》）。
- 二、填写《计划书》时要求科学严谨、实事求是、表述清晰、准确。《计划书》经国家自然科学基金委员会相关项目管理部门审核批准后，将作为项目研究计划执行和检查、验收的依据。
- 三、《计划书》各部分填写要求如下：
 - （一）简表：由系统自动生成。
 - （二）摘要及关键词：各类获资助项目都必须填写中、英文摘要及关键词。
 - （三）项目组主要成员：计划书中列出姓名的项目组主要成员由系统自动生成，与申请书原成员保持一致，不可随意调整。如果批准通知中“项目评审意见及修改意见表”中“对研究方案的修改意见”栏目有调整项目组成员相关要求的，待项目开始执行后，按照项目成员变更程序另行办理。
 - （四）资金预算表：根据批准资助的直接费用，按照《国家自然科学基金项目预算表编制说明》填报资金预算表和预算说明书。国家重大科研仪器研制项目、重大项目还应按照预算评审后批复的直接费用各科目金额填报资金预算表、预算说明书及相应的预算明细表。
 - （五）正文：
 1. 面上项目、青年科学基金项目、地区科学基金项目：如果《批准通知》中没有修改要求的，只需选择“研究内容和研究目标按照申请书执行”即可；如果《批准通知》中“项目评审意见及修改意见表”中“对研究方案的修改意见”栏目明确要求调整研究期限和研究内容等的，须选择“根据研究方案修改意见更改”并填报相关修改内容。
 2. 重点项目、重点国际（地区）合作研究项目、重大项目、国家重大科研仪器研制项目：须选择“根据研究方案修改意见更改”，根据《批准通知》的要求填写研究（研制）内容，不得自行降低、更改研究目标（或仪器研制的技术性能与主要技术指标以及验收技术指标）或缩减研究（研制）内容。此外，还要突出以下几点：
 - （1）研究的难点和在实施过程中可能遇到的问题（或仪器研制风险），拟采用的研究（研制）方案和技术路线；
 - （2）项目主要参与者分工，合作研究单位之间的关系与分工，重大项目还需说明课题之间的关联；
 - （3）详细的年度研究（研制）计划。

3. 国家杰出青年科学基金、优秀青年科学基金和海外及港澳学者合作研究基金项目：须选择“根据研究方案修改意见更改”，按下列提纲撰写：
 - (1) 研究方向；
 - (2) 结合国内外研究现状，说明研究工作的学术思想和科学意义（限两个页面）；
 - (3) 研究内容、研究方案及预期目标（限两个页面）；
 - (4) 年度研究计划；
 - (5) 研究队伍的组成情况。
4. 国家自然科学基金基础科学中心项目：须选择“根据研究方案修改意见更改”，应当根据评审委员会和现场考察专家组的意见和建议，进一步完善并细化研究计划，作为评估和验收的依据。按下列提纲撰写：
 - (1) 五年拟开展的研究工作（包括主要研究方向、关键科学问题与研究内容）；
 - (2) 研究方案（包括骨干成员之间的分工及合作方式、学科交叉融合研究计划等）；
 - (3) 年度研究计划；
 - (4) 五年预期目标和可能取得的重大突破等；
 - (5) 研究队伍的组成情况。
5. 对于其他类型项目，参照面上项目的方式进行选择和填写。

简表

项目负责人信息	姓名	孟文勃	性别	男	出生年月	1978年03月	民族	汉族	
	学位	博士			职称	主任医师			
	是否在站博士后	是							
	电话	0931-8356697		个人网页					
	工作单位	兰州大学第一医院							
	所在院系所	特需外科							
依托单位信息	名称	兰州大学第一医院					代码	73003018C0035	
	联系人	王玉平		电子邮件					
	电话	0931-8356657		网站地址	http://www.ldyy.net.cn/				
合作单位信息	单位名称								
	兰州大学								
项目基本信息	项目名称	sCLU通过CDC25A诱导胆管癌化疗耐药机制及其作为联合治疗靶点的潜在价值研究							
	资助类别	地区科学基金项目			亚类说明				
	附注说明								
	申请代码	H1609:肿瘤化学药物治疗			H1617:消化系统肿瘤				
	基地类别								
	执行年限	2021.01-2024.12							
	直接费用	34万元							



项目摘要

中文摘要:

吉西他滨是胆管癌化疗的首选药物，但临床存在广泛耐药且机制不明，推测可能与肿瘤细胞周期阻滞的修复相关。我们前期基于CRISPR/Cas9的sgRNA文库筛选发现，sCLU为吉西他滨联合抑制胆管癌细胞增殖的潜在靶点，sCLU与细胞周期关键调控“开关”蛋白CDC25A存在互作，结合多组学分析提示sCLU可能通过稳定CDC25A，阻碍吉西他滨对细胞周期的抑制，从而诱导化疗耐药。为验证上述假设，本项目拟通过细胞实验验证sCLU与CDC25A的互作关系及对胆管癌细胞恶性表型和吉西他滨耐药的影响，从分子水平揭示sCLU通过CDC25A促进周期转化进程诱导吉西他滨耐药的机制，采用PDX动物模型探索sCLU特异性抑制剂OGX-011联合治疗胆管癌的有效性，明确sCLU作为联合治疗靶点的潜在价值，阐明胆管癌化疗耐药机制，为逆转胆管癌吉西他滨化疗耐药提供新的思路。

Abstract:

Although gemcitabine is the preferred agent of cholangiocarcinoma chemotherapy, the mechanism underlying extensive drug resistance is unknown. It is reported that repairing of the tumor cell cycle arrest may play a role. Our previous CRISPR / Cas9 sgRNA library screening revealed sCLU is a potential marker that can synergistically facilitate the anti-proliferation effect of gemcitabine, by interacting with CDC25A, which is a key cell cycle regulator "switch" protein. Results from multi-omics analysis suggest that through stabilizing CDC25A, sCLU diminishes the cell cycle-inhibiting effect of gemcitabine, thus inducing drug resistance. In order to verify this hypothesis, in vitro study will be applied to demonstrate the interaction pattern of sCLU and CDC25A: by interacting with CDC25A, sCLU can promote the cell cycle progress which can induce gemcitabine resistance. Corresponding cancer cell malignant phenotype change, as well as gemcitabine resistance, will be studied. Lastly, the PDX animal model will be used to study the effectiveness of sCLU-specific inhibitor OGX-011, to further clarify whether sCLU is a promising target, hence providing new therapeutic strategy for gemcitabine-resistant cholangiocarcinoma.

关键词(用分号分开): 胆管癌; 分泌型聚集素; 细胞分裂周期因子25A; 吉西他滨; 耐药

Keywords(用分号分开): Cholangiocarcinoma; sCLU; CDC25A; Gemcitabine; Drug resistance

项目组主要成员

编号	姓名	出生年月	性别	职称	学位	单位名称	电话	证件号码	项目分工	每年工作时间(月)				
1	孟文勃	1978.03	男	主任医师	博士	兰州大学第一医院	0931-8356697	[REDACTED]	项目负责人	9				
2	林延延	1985.05	男	主治医师	硕士	兰州大学第一医院			实验指导、基础实验	9				
3	白冰	1983.01	男	主治医师	博士	兰州大学第一医院			基础实验指导与实施	9				
4	曹洁	1991.02	女	医师	学士	兰州大学第一医院			基础实验实施	9				
5	张金铎	1991.11	男	医师	硕士	兰州大学第一医院			动物实验实施指导	10				
6	付文康	1996.01	男	硕士生	学士	兰州大学			基础实验实施	11				
7	蔡腾	1990.02	男	博士生	硕士	兰州大学			细胞与动物实验实施	11				
总人数			高级		中级		初级		博士后		博士生		硕士生	
7			1		2		2				1		1	



国家自然科学基金项目直接费用预算表 (定额补助)

项目批准号: 82060551

项目负责人: 孟文勃

金额单位: 万元

序号	科目名称	金额
1	项目直接费用合计	34.0000
2	1、设备费	0.0000
3	(1)设备购置费	0.00
4	(2)设备试制费	0.00
5	(3)设备升级改造与租赁费	0.00
6	2、材料费	21.6300
7	3、测试化验加工费	5.6500
8	4、燃料动力费	0.00
9	5、差旅/会议/国际合作与交流费	0.28
10	6、出版/文献/信息传播/知识产权事务费	2.20
11	7、劳务费	4.00
12	8、专家咨询费	0.24
13	9、其他支出	0.0000

预算说明书（定额补助）

（请按照《国家自然科学基金项目预算表编制说明》等的有关要求，对各项支出的主要用途和测算理由，以及合作研究外拨资金、单价 ≥ 10 万元的设备费等内容进行必要说明。）

一、直接费用 合计：34.00万元

1. 材料费：合计：21.63万元；

1.1 抗体：CLU, CDC25A, CDK2, CDK4, CDK6, 标签抗体等其它细胞周期信号通路抗体 0.35 万元 $\times 10=3.50$ 万元，鼠、兔二抗 0.05 万元 $\times 6=0.30$ 万元，共计 3.80 万元；

1.2 免疫组化组织芯片和试剂盒：组织芯片 0.60 万元 $\times 2=1.20$ 万元，免疫组化试剂盒及相关试剂耗材 0.63 万元，共计 1.83 万元；

1.3 生化实验试剂及试剂盒：CCK8试剂盒 0.05 万元 $\times 8=0.40$ 万元，Transwell小室 0.02 元 $\times 20$ 个 $=0.40$ 万元，Trizol试剂 0.10 万元 $\times 2=0.20$ 万元，western相关试剂 0.68 万元，PCR反转录试剂盒 0.10 万元 $\times 2=0.20$ 万元，PCR荧光定量试剂盒 0.10 元 $\times 4=0.40$ 万元，细胞周期检测相关试剂 0.30 元 $\times 4=1.20$ 万元，细胞转染相关试剂 1.00 万元，磷酸化phosind试剂盒 0.30 万元，蛋白A/G磁珠 0.21 万元 $\times 2=0.42$ 万元，共聚焦激光显微镜相关耗材 0.10 万元 $\times 2=0.20$ 万元，双分子荧光互补相关耗材 0.50 万元，免疫沉淀试剂盒 0.20 万元，共计 6.10 万元；

1.4 实验动物及饲养费用，裸鼠 0.015 万元 $\times 100$ 只 $=1.50$ 万元，NOD/SCID小鼠 0.20 万元 $\times 50$ 只 $=1.00$ 元，Matrigel基质胶 0.50 万元，饲养费用 0.50 万元，共计 3.50 万元；

1.5 化疗药与小分子抑制剂：吉西他滨 0.50 万元，CLU抑制剂（OGX-011） 0.50 万元，共计 1.00 万元；

1.6 实验相关耗材：96孔板、6孔板、24孔板、培养基、血清、抗体稀释液、枪头、离心管、8连管等共计 5.40 万元。

2. 测试化验加工费：合计：5.65万元；

2.1 测序及检测费：蛋白组学质谱检测及材料费 0.30 万元 $\times 4=1.20$ 万元，质粒构建 0.60 万元 $\times 6=3.60$ 万元，转录组学测序 0.10 万元 $\times 4=0.40$ 万元，共计 5.20 万元；

2.2 细胞STR鉴定费：本实验共计 5 株胆管癌细胞株，为保证细胞来源合格，均送往国家实验细胞资源共享平台鉴定，每株细胞约 0.15 万元，共计 $0.15 \times 3=0.45$ 万元。

3. 差旅/国际合作/会议与交流费：合计：0.28万元；

4. 出版/文献/信息传播/知识产权事务费：合计：2.20万元；

4.1 预计发表文献 3 篇，平均每篇 0.60 万元，共计 1.80 万元；

4.2 购买研究相关专业文献资料约需 0.4 万元。

5. 劳务费：合计：4.00万元；

项目组共有 2 名研究生参加本项目的研究工作，硕士研究生参与时间 10 月，每人劳务费 0.05 万元/月，共计 4.00 万元。

6. 专家咨询费：合计：0.24万元

计划请同行业内高级专业技术职称人员会议咨询指导，共计 0.24 万元。

二、合作单位经费说明：

本项目合作单位为兰州大学，合作人蔡腾、付文康不涉及该项目经费分配。



报告正文

研究内容和研究目标按照申请书执行。



国家自然科学基金资助项目签批审核表

本 栏 目 由 基 金 委 填 写	<p>我接受国家自然科学基金的资助，将按照申请书、项目批准意见和计划书负责实施本项目（批准号：82060551），严格遵守国家自然科学基金委员会关于资助项目管理、项目资金管理等各项规定，切实保证研究工作时间，认真开展研究工作，按时报送有关材料，及时报告重大情况变动，对资助项目发表的论著和取得的研究成果按规定进行标注。</p> <p style="text-align: right;">项目负责人（签章）： 年 月 日</p>	<p>依托单位科研管理部门：</p> <p style="text-align: right;">负责人（签章）： 年 月 日</p>														
	<p style="text-align: right;">项目负责人（签章）： 年 月 日</p>	<p>依托单位财务管理部门：</p> <p style="text-align: right;">负责人（签章）： 年 月 日</p>														
<p>我单位同意承担上述国家自然科学基金项目，将保证项目负责人及其研究队伍的稳定和研究项目实施所需的条件，严格遵守国家自然科学基金委员会有关资助项目管理、项目资金管理等各项规定，并督促实施。</p> <p style="text-align: right;">依托单位（公章） 年 月 日</p>																
本 栏 目 主 要 用 于 重 大 项 目 等	<p>科学处审查意见：</p>															
	<p>建议年度拨款计划（本栏目为自动生成，单位：万元）：</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">年度</th> <th style="width: 10%;">总额</th> <th style="width: 10%;">第一年</th> <th style="width: 10%;">第二年</th> <th style="width: 10%;">第三年</th> <th style="width: 10%;">第四年</th> <th style="width: 10%;">第五年</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>金额</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		年度	总额	第一年	第二年	第三年	第四年	第五年	金额						
	年度	总额	第一年	第二年	第三年	第四年	第五年									
金额																
<p style="text-align: right;">负责人（签章）： 年 月 日</p>																
<p>科学部审查意见：</p> <p style="text-align: right;">负责人（签章）： 年 月 日</p>																
<p>相关局室审核意见：</p> <p style="text-align: right;">负责人（签章）： 年 月 日</p>																
<p>委领导审批意见：</p> <p style="text-align: right;">委领导（签章）： 年 月 日</p>																

项目编号： 2019JSCX0092

兰州市城关区科技计划项目申报书

(技术创新类)

项目类别 (2)

- 1、电子信息； 2、生物医药； 3、新材料； 4、装备制造；
5、精细化工及医药中间体； 6、院地校企合作； 7、新能源与节能环保；
8、农业； 9、现代服务业； 10、民生科技； 11、公共技术服务平台；
12、其他

项目名称： 胆汁中 Clu 对胆管癌的临床诊断价值及其机制研究

申报单位： 兰州大学第一医院 (盖章)

项目负责人： 林延延

项目联系人： 曹洁

项目计划起止时间： 2019-03-01 至 2022-03-01

申报日期： 2019-03-20 09:10:34

兰州市城关区科学技术局
二〇一八年制

填 报 说 明

一、凡申请承担兰州市城关区科技计划项目的单位，应在城关地区注册且具有独立法人资格。申报单位须在认真阅读本年度申报指南的基础上，据实填报城关区科技计划项目申报书，并在申报书封面申报单位处加盖公章。

二、封面中“项目编号”由项目组织单位填写。

三、“项目计划起止时间”一般不超过三年。

四、凡不填内容栏目，均用“/”或“无”表示。

五、“主要经济指标”企业或营利性事业单位依据审计报告或财务决算填写。

六、“曾承担项目情况”距申报本项目最近 1 项倒推填写。

七、附件材料指与申报本项目所需的相关支撑材料，如：营业执照、高新技术企业认定证书、科技成果(新产品)鉴定证书、专利证书、获奖证书、技术合同(转让合同、合作合同等)、查新报告、企业专业资质证书、特殊产品生产许可证、临床批文、环保证明等，若项目为院地合作项目，还需提供双方的合作协议。

八、申报书一式四份，必须采用双面套印中缝骑马订装订，钉锯钉在折缝线上，钉脚平直、牢固（受理左边距平订），成册后 A4 幅面，申报单位签章；

九、申报书填写后需经区科技局项目部审查后再正式上报。

一、申报单位基本情况

单位名称	兰州大学第一医院			法人代表	李汛		
单位性质	<input type="checkbox"/> 事业型研究单位 <input checked="" type="checkbox"/> 其他事业单位 <input type="checkbox"/> 大专院校 <input type="checkbox"/> 转制为企业的科研院所 <input type="checkbox"/> 国有企业 <input type="checkbox"/> 集体所有制企业 <input type="checkbox"/> 合资企业 <input type="checkbox"/> 外商投资企业 <input type="checkbox"/> 港、澳、台投资企业 <input type="checkbox"/> 个体私营企业 <input type="checkbox"/> 其他企业						
通讯地址	甘肃省兰州市城关区东岗西路 1 号			邮编	730000		
成立时间	1948-09-01	注册资本	71790 万元		注册地址	兰州市城关区东岗西路 11 号	
统一社会信用代码 (或组织机构代码)	12620000438002676Q		办公地址	兰州市城关区东岗西路 11 号		办公面积	260000 平方米
生产地址	城关区东岗西路 11 号					面积	260000 平方米
						性质	自购
户名	兰州大学第一医院			账号	62001360025050302749		
开户行	建设银行开发区支行			行号	105821001408		
人员构成	职工总数	学历情况	硕士及以上	本科	大专	中专及以下	
			755	1448	782	342	
	3327	分工情况	管 理	研 发	营 销	生 产	
			221	3106	0	0	
主要产品及产量	医疗教学科研医疗急救工作妇幼保健预防医学						
所获科技相关奖励	卫生部全国百佳医院、国家级爱婴医院、全国百姓放心示范医院，全国卫生系统先进集体、全国精神文明建设先进单位、全国残疾人康复工作先进集体、全国五一劳动奖状、全国抗震救灾重建家园工人先锋号、全省教育系统先进单位、省级职业道德建设先进单位、甘肃省医德医风示范医院、甘肃省妇幼保健先进单位、全省思想政治工作先进集体、省级“文明单位”、“全省文明行业先进单位”、“甘肃省文化科技卫生三下乡先进集体”等一大批荣誉，几届医院领导班子中多人被评为“全国优秀党委书记”、“全国优秀院长”。						



主要经济指标 (万元)	总资产	净资产	上年度总收入	上年度净利润	上年度主营业务收入	上年度研发费用支出
	168399	95926	200910	5900	0	0
曾承担项目情况						
项目编号	项目名称	立项金额 (万元)	项目组织单位		起止时间	完成情况

二、项目基本情况

项目内容、意义及主要预期成果和技术指标概要 (限 100 字)	为解决因胆管癌早期诊断困难而影响患者预后的问题，本项目拟通过临床相关研究，评估胆汁 CLU 作为胆管癌标记物的价值；通过细胞及动物实验揭示 CLU 促进胆管癌发生发展的分子机制。为胆管癌临床早期诊断及靶向治疗药物研发提供理论依据。
是否院地校企合作项目	<input type="checkbox"/> 是 <input checked="" type="checkbox"/> 否
项目合作单位	无
所属技术领域	<input type="checkbox"/> 能源 <input type="checkbox"/> 资源 <input type="checkbox"/> 环境 <input type="checkbox"/> 农业 <input type="checkbox"/> 材料 <input type="checkbox"/> 制造业 <input type="checkbox"/> 交通运输 <input type="checkbox"/> 现代服务业 <input checked="" type="checkbox"/> 医疗卫生 <input type="checkbox"/> 生物医药 <input type="checkbox"/> 公共安全与其他社会发展事业 <input type="checkbox"/> 信息产业
项目现处阶段	<input checked="" type="checkbox"/> 研发阶段 <input type="checkbox"/> 中试阶段 <input type="checkbox"/> 示范推广阶段 <input type="checkbox"/> 批量（规模）生产阶段
项目已有知识产权情况	<input type="checkbox"/> 已授权 <input type="checkbox"/> 已公告 <input type="checkbox"/> 仅申请 <input checked="" type="checkbox"/> 未申请



(申请状态)	
项目已有知识产权情况(所获专利)	
名称	专利号或登记号
创新类型	<input checked="" type="checkbox"/> 原始创新 <input type="checkbox"/> 集成创新 <input type="checkbox"/> 引进消化吸收再创新 <input type="checkbox"/> 其他
预期成果	<input type="checkbox"/> 专利 <input type="checkbox"/> 技术标准 <input type="checkbox"/> 新产品(或农业新品种) <input type="checkbox"/> 新工艺 <input type="checkbox"/> 新装置 <input type="checkbox"/> 新材料 <input type="checkbox"/> 计算机软件 <input checked="" type="checkbox"/> 论文 <input type="checkbox"/> 论著 <input type="checkbox"/> 研究报告 <input type="checkbox"/> 其他
预期知识产权	获得国外发明专利 0 项, 国内发明专利 1 项, 其他 0 项。
成果转移转化的方式目标	<input type="checkbox"/> 自我转化 <input type="checkbox"/> 向他人转让 <input type="checkbox"/> 许可他人使用 <input checked="" type="checkbox"/> 合作转让 <input type="checkbox"/> 作价投资 <input type="checkbox"/> 其他
预期技术标准制定	<input type="checkbox"/> 国际标准 <input type="checkbox"/> 国家标准 <input type="checkbox"/> 行业标准 <input type="checkbox"/> 企业标准 <input checked="" type="checkbox"/> 无标准制定

三、项目成员

项目负责人	姓名	林延延	性别	男	出生年月	1985-05-24
	学位	<input type="checkbox"/> 博士后 <input type="checkbox"/> 博士 <input checked="" type="checkbox"/> 硕士 <input type="checkbox"/> 学士 <input type="checkbox"/> 其他				
	职称	<input type="checkbox"/> 高级 <input checked="" type="checkbox"/> 中级 <input type="checkbox"/> 初级 <input type="checkbox"/> 其他			专业	普外科
	所在单位	兰州大学第一医院				
	证件类型	身份证	证件号码	[REDACTED]		

参加课题人数	7 人, 其中:	高级 0 人, 中级 3 人, 初级 2 人, 其他 2 人。				
		博士 1 人, 硕士 3 人, 学士 3 人, 其他 0 人。				
项目 联系 人	姓名	曹洁	所在单位	兰州大学第一医院	性别	女
					族	汉
	职称	初级	从事专业	检验医学	职务	住院医师
	学位	学士	项目分工	基础研究	传真	无

项目组主要研究人员

序号	姓名	出生年月	学历	职称	从事专业	项目任务分工	所在单位
1	曹洁	1991-02	学士	初级	检验医学	基础实验	兰州大学第一医院
2	高龙	1995-01	学士	其他	普外科	基础实验	兰州大学第一医院
3	徐浩	1987-03	硕士	中级	普外科	临床试验	兰州大学第一医院
4	苏刚	1977-11	博士	中级	遗传学	实验指导	兰州大学基础医学院
5	米宁宁	1995-03	学士	其他	普外科	基础实验	兰州大学第一医院
6	张金铎	1911-11	硕士	初级	普外科	临床试验	兰州大学第一医院

四、项目投资预算及经济效益预测

(一) 投资计划及经济效益预测

计划总投资 (万元)	18.0	已完成投资	其中	自筹	申请经费	贷款	其他
		0		0	0	0	
		计划新增投资	其中	自筹	申请经费	贷款	其他
		18		9	9	0	0
项目预期效益 (万元)	新增销售额	新增产值		新增利税	出口创汇		

	0	0	0	0
--	---	---	---	---

(二) 拟申请经费支出预算

预算科目名称	拟申请经费支出预算	说明
(一) 直接费用	9.0	在项目实施过程中发生的与之直接相关的费用。
1. 设备费	0	在项目实施过程中用于购置或试制专用仪器设备, 对现有仪器设备进行升级改造, 以及租赁外单位仪器设备而发生的费用。
2. 材料费	5.37	在项目实施过程中消耗的各种原材料、辅助材料等低值易耗品的采购及运输、装卸、整理等费用。
3. 测试化验加工费	1.50	在项目实施过程中支付给外单位(包括承担单位内部独立经济核算单位)的检验、测试、化验及加工等费用。
4. 燃料动力费	0	在项目实施过程中直接使用的相关仪器设备、科学装置等运行发生的水、电、气、燃料消耗费用等。
5. 中试车间、实验室建设费	0	在项目研究开发过程中须建设的中试车间、实验室的建设费用。
6. 出版/文献/信息传播/知识产权事务费	1	在项目实施过程中需要支付的出版费、资料费、用软件购买费、文献检索费、专业通信费、专利申请及其他知识产权事务等费用。 专 申
7. 会议/差旅/国际合作交流费	0.14	在项目实施过程中发生的与项目相关的会议费、差旅费和国际合作交流费。
8. 劳务费	0.75	在项目实施过程中支付给参与项目的研究生、博士后、访问学者以及项目聘用的研究人员、科研辅助人员等的劳务性费用。
9. 专家咨询费	0.24	在项目实施过程中支付给临时聘请的咨询专家的费用。专家咨询费不得支付给参与本项目及所属课题研究和管理的有关人员。
10. 其他支出	0	在项目实施过程中除上述支出范围之外的其他相关支出。其他支出应当在申请预算时详细说明。不得超过项目经费的1%。
(二) 间接费用	0	是承担单位在组织实施项目过程中发生的无法在直接费用中列支的相关费用。主要包括: 承担单位为项目研究提供的房屋占用, 日常水、电、气、暖消耗, 有关管理费用的补助支出, 以及激励科研人员的绩效支出等。不得超过项目经费的10%。



合计	9.0
----	-----

五、项目背景、目的及意义

（一）、项目背景

胆管癌恶性程度高，起病隐匿，早期诊断困难，以 CA199 为代表的肿瘤标记物早期诊断价值低。寻求特异性强、灵敏度高的早期预警分子，仍是改善胆管癌预后的关键问题。因此，筛选高灵敏度和特异性的胆管癌诊断标志物，对于胆管癌的早期诊断显得尤为重要。

目前肿瘤生物分子的研究大多集中在血清和组织，但是直接利用血清作为研究对象受多种因素的制约：肿瘤细胞分泌入血的许多因子会在循环血液中被稀释，且部分因子是可以被其他器官同时分泌的，因此，血液中含有的肿瘤标志物常是一些低丰度生物分子，对肿瘤发生、发展监测的灵敏性和特异性都显著性降低。利用肿瘤组织作为研究对象鉴定到的很多蛋白，因其不是膜蛋白或分泌蛋白而很难在血清、唾液、尿液等体液中被检测到，故临床诊断价值还需进一步探究。相对于血清和组织而言，以胆管癌临近体液-胆汁作为胆管癌诊断标记物筛选的切入点，可能更为直接，因此，胆汁成为我们关注的焦点。

胆汁属于胆管癌临近体液，其与肿瘤组织及其周边微环境直接接触，在肿瘤生长、代谢过程中不断将一些肿瘤相关蛋白脱落或分泌至胆汁，其中可能富含胆管癌相关的蛋白，另外这些蛋白质多已完成细胞内组装、酶解、剪切等翻译后修饰过程，因此变异较小、检测的可重复性高。可见研究胆汁中存在的生物标志物，对提高胆管癌的早期诊断具有重要的潜在临床价值。课题组前期利用蛋白组学技术在胆管癌胆汁及组织中筛选发现新的靶点 CLU，下调 CLU 的表达可抑制胆管癌细胞的增殖。

聚集素 (CLU)，是异源二聚体硫酸化糖蛋白，具有多种生物学功能，如细胞周期调节、细胞凋亡等，CLU 的异常表达在前列腺癌等肿瘤的发生发展中发挥着重要作用。近年来研究显示，CLU 可能通过抗细胞坏死或抗凋亡机制发挥细胞保护作用，从而促进肿瘤生长。文献报道 CLU 在肝癌中参与 PI3K-AKT 信号通路的调控，但在胆管癌中的分子机理尚不明确。课题组预实验发现 CLU 表达与 PI3K-AKT 通路相关蛋白具有相关性，我们推测 Clu 可通过 PI3K-AKT 信号通路调控胆管癌细胞增殖和凋亡。本项目拟通过临床相关性研究，评估胆汁 CLU 作为胆管癌标记物的潜在价值，细胞功能实验验证 CLU 对胆管癌恶性表型的影响；通过慢病毒介导的 CLU 沉默体系，细胞及动物水平研究 CLU 在胆管癌发生、发展中的作用；揭示 CLU 通过 PI3K-AKT 信号通路促进胆管癌恶性表型的分子机制，为胆管癌早期诊断及靶向药物研发提供理论依据。

（二）、项目的目的及意义

研究目的：

1. 验证胆汁中 CLU 作为早期诊断胆管癌标记物的价值，为胆汁 CLU ELISA 诊断试剂的研发提供理论支持。

2. 揭示 CLU 在胆管癌发生发展过程中的临床意义及与预后的关系；阐明 CLU 通过 PI3K-AKT 通路促进肿瘤发生、发展的作用机制，为胆管癌的早期诊断及靶向治疗提供理论依据。

研究意义：

胆管癌是恶性程度极高的上皮细胞癌，早期诊断率低，预后差。根治性手术切除是目前治疗胆管癌最重要和有效的方法，但是胆管癌的预后并不理想。然而近年来我国胆管癌发病率的逐年增加，鉴于胆管癌的临床血清标志物存在特异性不强和敏感度不高等缺点，胆汁标志物的研究日益兴起。对胆汁中肿瘤相关蛋白进行分析，可以为胆管癌的诊断提供特异性生物标志物。通过基础研究探索胆管癌的精准确治疗，实现胆管癌的早诊早治，提高手术切除率，提高术后预后，挽救更多患者生命，延长患者生存时间，提高生活质量，具有重要的社会学价值及经济意义；对整体提高一带一路沿线人民健康水平，推进“一带一路”卫生合作，打造“健康丝绸之路及祖国实施健康中国战略宏伟目标具有重要战略意义。

六、项目已具备的基础、优势和风险

（一）、项目已具备的基础、优势

项目组相关研究基础

项目组近年来主要致力于肝胆恶性肿瘤早期诊断及发病机制的研究。课题组利用 miRCRYTM LNA Array 芯片分析发现肝癌病人血清中 miR-483-5p 水平显著高于慢肝病人组和健康人组，肝癌病人术后血清中 483-5p 水平显著降低。miR-483-5p 对肝癌诊断的特异性和灵敏度较高，对 AFP 不高的肝癌患者更诊断价值；受试者曲线 (ROC curves) 分析 483-5p 作为肝癌标记物的特异性和灵敏度分别为 74% 和 66%，结合甲胎蛋白 AFP 共同预测肝癌可以提高其特异性和灵敏度 (81% 和 83%) (林延延, et al. miR-483-5p 在肝细胞肝癌患者血清中的表达及临床意义[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2018(6).)。利用双向凝胶电泳技术分离不同分化组肝癌蛋白并对差异蛋白质进行质谱分析鉴定，证实膜联蛋白 A2 (ANXA2)、热休克蛋白 β -1 (HSPB1) 在低分化肝细胞肝癌组织的高表达提示高侵袭的特性，可能作为早期监测肝癌转移的生物学标志物；钙网织蛋白 (CALR) 在高分化肝细胞肝癌高表达其机制可能与 CALR 介导的免疫吞噬有关，并可能成为潜在的肝癌治疗靶点 (Technol Cancer Res Treat. 2017;16(6):1092. 申请人为参与作者)。进一步研究发现肝癌组织中过氧化物还原酶 2 (PRDX2) 的表达下调与患者不良预后相关，抑制肝癌细胞 PRDX2 的表达可促进细胞的增殖和侵袭能力。(Oncology Reports. 2019. 1539-1548.)。在胆管恶性肿瘤研究方面，课题组近期研究证实 CDKL3 在胆管癌组织中高表达，利用中药莪术醇干预后可下调 CDKL3 的表达进而抑制胆管癌细胞的增殖、迁移及侵袭。(Frontiers in Physiology, 2018, 9:234. 申请人为参与作者)。

项目组预实验研究基础

在上述研究基础上，项目组进一步从胆管癌患者胆汁和手术组织标本入手，开展胆管癌早期诊断标记物和分子靶标的筛选。课题组前期基于 iTRAQ 定量标记技术的蛋白质组学鉴定胆管癌患者胆汁和胆石症患者胆汁、胆管癌与癌旁组织的差异表达蛋白，其中 CLU 在胆管癌患者胆汁中与胆石症胆汁相比异常高表达，在癌组织中 CLU 表达亦高于癌旁组织，利用 Elisa 分别检测 20 份肝癌复发患者胆汁和

胆石症患者胆汁进一步发现胆管癌患者胆汁中 CLU 水平显著高于胆石症患者 ($p < 0.0001$), 连续监测胆汁 CLU 的表达发现术后一周胆汁 CLU 的表达较术前明显降低。WB 和组化检测 CLU 在癌组织的表达明显高于癌旁组织。应用慢病毒介导的 shRNA 干扰技术结合基因功能筛选实验发现在胆管癌细胞系 RBE 细胞中, 干扰 CLU 的基因表达可显著抑制癌细胞的增殖。WB 检测敲低 CLU 表达的 RBE 细胞 PI3K-AKT 信号通路相关蛋白发现 p-AKT、BCL-2 表达下调。该课题为前期课题的延续和深入, 已经具有一定的工作基础, 并且在该领域撰写和发表多篇论文, 良好的前期研究结果, 为课题进一步验证 CLU 通过 PI3K-AKT 通路促进胆管癌细胞增殖的作用机理提供了可行性。该项目既具有一定的延续性又具有较强的原始创新性。

项目申请者长期从事肝胆恶性肿瘤方面的临床和基础研究工作, 熟悉该领域研究基础及发展动态。项目组成员均接受过正规全面的科研训练, 熟练掌握该实验所涉及免疫组化、细胞培养、基因转染、荧光定量 PCR 及 Western Blot 等细胞生物及分子生物学实验技能。可顺利地开展工作。

研究组由具有丰富临床经验的医师和长期从事基础研究的科研工作者及研究生组成。林延廷主治医师一直致力于肝胆外科临床研究和相关基础研究, 在胆管癌研究方面具有一定的研究基础。申请者与主要参加人员, 已经合作课题研究多年, 具有良好的合作关系, 团队具有强大的凝聚力, 已发表多篇课题相关文章。项目团队共 8 名成员, 其中包括正高 1 名, 中级 3 名, 初级 2 名, 研究生 2 名, 研究梯队合理。

(二)、项目风险

①. 本项目研究涉及胆管癌胆汁、血清及癌组织的蛋白质组学研究、组织芯片检测及后期胆管癌动物模型的构建费用花费大, 面临费用不足问题。

解决对策: 多渠道筹集经费, 合理使用经费。

②. 本项目研究内容较多, 周期较长, 三年完成项目所有目标时间比较紧张。

解决对策: 协调团队成员, 高效工作, 争取 3 年时间完成课题任务。

③. 本项目样本量大, 后期病人随访过程中存在失访率增加问题

解决对策: 规范随访时间节点, 加强随访管理、加强与患者联系, 建立良好医患关系。

七、项目主要内容、预期成果及技术指标

(一)、项目主要内容

项目组前期研究发现, 在胆管癌患者胆汁中 CLU 异常高表达, 在癌组织中 CLU 表达亦高于癌旁组织; 利用慢病毒转染 shRNA 下调 CLU 的表达, 可明显抑制胆管癌细胞增殖; 在组织中 CLU 与 PI3K-AKT 通路相关蛋白的表达密切相关。我们推测 CLU 参与胆管癌的发生发展过程, 并且通过 PI3K-AKT 通路影响肿瘤细胞的增殖和凋亡; 胆汁 CLU 有潜力作为早期诊断胆管癌的生物标记物。本项目拟解决以下问题: 1、验证胆汁 CLU 作为诊断胆管癌的临床价值; 2、探索 CLU 的表达变化与 PI3K-AKT 通路的关系, 以及促进胆管癌发生发展的分子机制。

①临床样本验证胆汁 CLU 作为诊断胆管癌体液标记物的临床价值;

通过建立胆管癌前瞻性研究队列，明确胆汁中 CLU 早期预警胆管癌价值。

收集胆管癌患者癌胆汁和胆石症患者胆汁，详细记录临床背景资料，检测胆汁中 CLU 的表达，分析 CLU 与 CA199 等临床常用肿瘤标记物及病理特征的关系，探究 CLU 在胆管癌患者胆汁中的表达规律，通过大量样本验证 CLU 作为早期诊断胆管癌标记物的潜在价值。

②研究 CLU 与 PI3K-AKT 通路相关蛋白在胆管癌组织中的表达与胆管癌的病理特征及预后关系；

收集胆管癌临床组织样本，检测不同分化程度和不同分期的临床胆管癌、癌旁组织标本 CLU、PI3K、p-AKT 等蛋白的表达，并结合患者年龄、性别以及肿瘤大小、分化程度、淋巴结转移、CA199 等相关胆管癌临床病理因素进行综合分析，探究 CLU 在胆管癌表达的临床意义。

③研究 CLU 表达对胆管癌细胞增殖、凋亡、转移侵袭等恶性表型及耐药性的影响；构建 CLU 干扰和过表达体系，通过基因干扰技术调节 CLU 的表达，细胞系水平研究 CLU 对胆管癌细胞的生物学特性的影响情况，从细胞增殖速度（HCS 细胞增殖筛选试验）、细胞周期分布（PI 染色后 FACS 分析）、细胞凋亡情况（AnnexinV 染色后 FACS 分析）、克隆形成、细胞迁移能力（划痕实验，transwell）等方面进一步验证 CLU 具有促进胆管癌细胞增殖、转移侵袭的生物学功能；动物水平体内研究 CLU 的表达变化对裸鼠瘤体形成、生长及转移等恶性表现的影响，研究 CLU 具有促进胆管癌细胞增殖、生长及存活的能力。

胆管癌细胞对抗癌药物不敏感。前期研究也发现胆管癌细胞 RBE 对 5-氟尿嘧啶、顺铂、吉西他滨的敏感性不强。利用 5-氟尿嘧啶、顺铂、吉西他滨等处理下调 CLU 的胆管癌细胞和对照胆管癌细胞，研究 CLU 表达变化是否影响胆管癌细胞对各种化疗药物抑制肿瘤的敏感性。在细胞实验基础上，通过胆管癌细胞的裸鼠皮下成瘤实验，进一步研究 CLU 表达下调在体内对各种化疗药物抗癌敏感性的影响。

④研究 CLU 通过 PI3K-AKT 信号通路促进胆管癌发生发展的分子机制

利用慢病毒介导的胆管癌细胞 CLU 干扰体系及过表达体系，通过 qPCR Array 及 Western blot 技术验证胆管癌细胞 PI3K-AKT 信相关信号蛋白的表达水平。

在胆管癌细胞 CLU 干扰体系和过表达体系中，利用 PI3K 抑制剂 LY-294002 阻断该信号通路，验证对胆管癌细胞恶性表型（细胞周期、增殖、克隆形成、侵袭、转移能力）及耐药性的影响；动物水平体内进一步验证对小鼠成瘤速度、转移能力及对化疗药的敏感性的影响，探索 CLU 通过 PI3K-AKT 信号通路促进胆管癌发生发展的分子机制。

基于以上研究结果，利用免疫共沉淀、共聚焦荧光显微镜等技术进一步探讨胆管癌细胞 CLU 与 PI3K-AKT 信相关信号蛋白相互作用，从分子互作层面进一步证实 CLU 与 PI3K-AKT 相关信号蛋白调控关系。

（二）、项目预期成果

1. 论证胆汁 CLU 作为胆管癌早期肿瘤标志物的潜在价值；
2. 揭示 CLU 调控胆管癌发生和发展的分子机制，阐明 CLU 与 PI3K-AKT 信号通路及与 PI3K-AKT 信号通路关键蛋白之间相互作用关系，为胆管癌靶向治疗提供理论依据；
3. 发表 SCI 论文 2 篇，协助培养硕士研究生 1 名。

（三）、项目技术指标

1. CLU 在胆管癌胆汁中表达量范围为 500-2000ng/ml；CLU 值大于 500ng/ml 具有诊断胆管的价值（需进一步验证）；
2. CLU 胆管癌诊治试剂盒受众人群为胆红素、CA199 增高，影像学诊断为胆管狭窄，不能诊断胆管癌的患者。

八、项目的创新性、技术可行性分析

（一）、项目的创新性

本项目的特色与创新之处：

1. 本项目以胆管癌胆汁为切入点，率先研究胆管癌患者胆汁中 CLU 的表达与胆管癌的关系，发现 CLU 在胆管癌患者胆汁中的表达规律，揭示 CLU 诊断胆管癌的临床价值，为临床监测胆管癌提供新的手段。
2. CLU 通过 PI3K-AKT 信号通路调节胆管癌细胞的增殖和凋亡尚无报道，通过分析 CLU 表达及 PI3K-AKT 信号通路相关蛋白的表达与胆管癌的病理特征及预后的关系，利用细胞和动物实验及蛋白互作研究阐明 CLU 通过 PI3K-AKT 通路促进肿瘤发生的分子机制，为胆管癌靶向治疗提供理论依据。

（二）、项目技术可行性分析

本项目团队所在实验室为甘肃省肝胆胰外科研究所、甘肃省生物治疗与再生医学重点实验室、兰州大学医学院肿瘤防治中心。拥有分子生物学实验室、基因工程实验室、细胞生物学实验室、组织形态学实验室、免疫学实验室、PCR 实验室、生物样品制备室、DNA 序列分析室、流式细胞仪室、图像分析室、实验动物手术室等 20 多个功能实验室和仪器室。拥有 700 平方米通过 GMP 认证的层流实验室，及 1000 平米普通实验室。本实验室拥有二代基因测序仪、电穿孔仪、冰冻切片机、显微切割系统，qRT-PCR 仪、蛋白定量检测仪、凝胶成像系统、全波长酶标仪、激光共聚焦显微镜等仪器等大型科研设备共计约 1500 万元。

项目组依托甘肃省生物治疗与再生医学重点实验室、兰州大学基础医学院遗传学研究所，主要从事分子生物学、基因工程、免疫学和细胞生物学相关的基础及应用基础研究。课题参与人熟练掌握分子生物学技能，能胜任从事课题设计、实验操作到撰写论文等研究事宜。

上述工作条件，为本项目的开展提供了必须的实验研究设备和工作条件保障。具备了完成研究任务所必需的条件和基础。

九、计划进度安排及财务预算

（一）、项目计划进度安排

1. 2019.3-2020.3：主要围绕临床样本的检测，分析 CLU 在胆汁和组织中的表达与临床病理特征关系，验证胆汁 CLU 作为胆管癌早期诊断标记物临床价值；构建 CLU 干扰和过表达质粒；

2. 2020.3-2021.3: 主要围绕建立 CLU 稳定沉默、稳定表达的胆管癌细胞模型, 研究 CLU 的表达变化对胆管癌细胞增殖、凋亡、侵袭及耐药性等生物学特性的影响, 明确 CLU 在胆管癌发生发展中的作用; 撰写 SCI 论文 1 篇;
3. 2021.3-2022.3: 主要围绕在动物水平验证 CLU 的致癌性及其调控肿瘤增殖和凋亡的机制; 在蛋白水平和细胞水平验证 CLU 对 PI3K-AKT 信号通路的调控机制; CLU 与 PI3K-AKT 信号通路中关键蛋白之间的相互作用的研究; 撰写 SCI 论文 1 篇; 整理和补充前期缺陷实验数据, 完成项目结题。

(二)、项目财务预算

费用共计: 9 万元

1. 材料费: 共计: 5.37 万元;
CLU, PI3K, P-PI3K, AKT 等抗体 2000 元*6=1.2 万元, 鼠、兔二抗 1800 元*2=0.36 万元, 免疫组化试剂盒及相关试剂 0.8 万元, CCK8 试剂盒 1500 元*4=0.6 万元, 流式细胞仪试剂盒 2000 元*3=0.60 万元, PCR 反转录试剂盒 3000 元*5=1.50 万元, Transwell 小室 200 元*10 个=0.20 万元; 实验相关耗材 (96 孔板、6 孔板、24 孔板、培养基、血清、抗体稀释液、枪头、离心管、8 连管等) 0.11 万元。
2. 测试化验加工费: 共计: 1.50 万元;
标本采集材料及试验耗材 (肿瘤标记、生化检测试剂) 约 0.30 万元, 质粒构建 4000 元*3=1.20 万元。
3. 差旅/国际合作与交流费: 共计: 0.14 万元;
计划 1 人进行学术交流, 项目期间预计出访 1 次, 每次出访时间约 3 天, 预计每次往返车票 500 元, 每天住宿费 200 元、伙食补助等 100 元, 共计 0.14 万元;
4. 出版/文献/信息传播/知识产权事务费: 共计: 1.0 万元;
1): 预计发表文献 2 篇, 平均每篇 0.40 万元, 共计 0.80 元;
2): 购买研究相关专业文献资料约需 0.20 万元。
5. 劳务费: 共计: 0.75 万元;
项目组共有硕士研究生 1 人参与时间 10 月/年, 劳务费 250 元/月, 共计 0.75 万元
6. 专家咨询费: 共计: 0.24 万元
计划请同行业内高级专业技术职称人员会议咨询对研究思路、方法、技术进行指导: 每人每天 2400 元 (税前) 计算, 每人每次约 1 天, 预计咨询 1 人次, 共计 0.24 万元。
7. 其他支出 0.00 万元

十、项目的经济效益、社会效益分析

(一)、项目的经济效益

胆管癌是起源于胆管上皮的恶性肿瘤, 在肝脏恶性肿瘤中, 胆管癌的发病率仅次于肝细胞癌, 胆管癌恶性程度高, 起病隐匿, 早期诊断困难, 导致多数患者在确诊时已处于中晚期。在过去 40 年其发病率在世界范围内呈上升趋势, 在东亚更为常见, 在我国其发病率高达 10/10 万。可见胆管癌早期诊断试剂具有巨大市场

潜力。

(二)、社会效益分析

胆管癌是恶性程度极高的上皮细胞癌，早期诊断率低，预后差。根治性手术切除是目前治疗胆管癌最重要和有效的方法，但是胆管癌的预后并不理想。然而近年来我国胆管癌发病率的逐年增加，鉴于胆管癌的临床血清标志物存在特异性不强和敏感度不高等缺点，胆汁标志物的研究日益兴起。对胆汁中肿瘤相关蛋白进行分析，可以为胆管癌的诊断提供特异性生物标志物。通过基础研究探索胆管癌的精准治疗，实现胆管癌的早诊早治，提高手术切除率，提高术后预后，挽救更多患者生命，延长患者生存时间，提高生活质量，具有重要的社会学价值及经济意义；对整体提高一带一路沿线人民健康水平，推进“一带一路”卫生合作，打造“健康丝绸之路及祖国实施健康中国战略宏伟目标具有重要战略意义。

十一、项目合作单位意见

单位负责人(签章)： (公章) 年 月 日

十二、项目申请单位法人承诺

<p>本单位承诺：本申报书所有信息真实可靠，不存在违背《关于进一步加强科研诚信建设的若干意见》提出的科研诚信要求相关行为，若有失实和造假行为，本人愿承担一切责任。</p> <p style="text-align: right;">法人代表(签章)： 单位(公章) 年 月 日</p>

十三、附件列表

序号	名称
1	申请人发表论文 2. pdf
2	申请人发表论文 3. pdf
3	项目证明. jpg
4	申请人发表论文 1. pdf
5	医疗机构职业许可证. jpg



6	申请人发表论文 5. pdf
7	申请人发表论文 4. pdf

L

Z

C

G

K

J