

一、基本信息

申请人信息	姓名	周欢娣	性别	女	出生年月	1987-03	固定电话	
	学位	硕士	职称	研究实习员	民族	汉族	移动电话	
	证件名称	身份证	证件号码				电子信箱	huandizhou@126.com
	工作单位	河北医科大学第二医院						
	个人通信地址	石家庄市和平西路 215 号					邮政编码	050000
	主要研究领域	实验肿瘤学						
	依托单位	单位名称	河北医科大学					
联系人		安雯婷	联系电话	031166002811	电子邮箱	scitech_2h@188.com		
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						
		联系人				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 500 字内)	<p>我们前期采用新一代测序技术，进行全基因组和转录组测序，通过多组学分析的方法找到 7 个潜在的肝细胞癌预后标志物，其中一个因子 TTK 经过验证和后续机制研究已将发表 SCI 两篇 (Journal of hepatology, 11, 336; Scientific Reports, 4, 259)。本研究是在此基础上选择 7 个潜在预后标志物中另一因子 MCM4 进行验证和深入机制研究。第一，在临床标本水平，结合临床随访信息、生存分析，在 mRNA、蛋白质不同水平分析 MCM4 与 HBV-HCC 患者病理分级和预后的相关性。第二，细胞水平，一方面明确 MCM4 通过 PI3K/AKT 信号通路对细胞增殖、凋亡、迁移侵袭、抗失巢凋亡的作用，另一方面，揭示 MCM4 通过被 HCC 细胞外泌体携带转运到受体细胞促其增殖转移的关键角色。第三，小鼠体内水平，通过建立裸鼠皮下移植瘤模型，进一步证实 MCM4 促进肝细胞癌转移的作用。</p>							
关键词 (用分号分开, 最多 5 个)	肝细胞癌, 预后标志物, 微小染色体维持蛋白 4, 外泌体, 失巢凋亡							

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	1	3	0	0	1	0	4	0

河北省自然科学基金

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	4.00	4.00	0.00	0.00
二、经费支出	4.00	4.00	0.00	0.00
（一）直接费用	3.80	3.80	0.00	0.00
1、设备费	0.00	0.00	0.00	0.00
（1）购置设备费	0.00	0.00	0.00	0.00
（2）试制设备费	0.00	0.00	0.00	0.00
（3）设备改造与租赁费	0.00	0.00	0.00	0.00
2、材料费	2.00	2.00	0.00	0.00
3、测试化验加工费	0.30	0.30	0.00	0.00
4、燃料动力费	0.00	0.00	0.00	0.00
5、会议费/差旅费/国际合作与交流费	0.30	0.30	0.00	0.00
6、出版/文献/信息传播/知识产权事务费	0.80	0.80	0.00	0.00
7、劳务费	0.40	0.40	0.00	0.00
8、专家咨询费	0.00	0.00	0.00	0.00
9、其他支出	0.00	0.00	0.00	0.00
（二）间接费用	0.20	0.20	0.00	0.00
其中：绩效支出	0.00	0.00	0.00	0.00
省自然科学基金经费 拨付进度	第1年	第2年	第3年	
金额	4.00	0.00	0.00	

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	河北医科大学第二医院	承担单位	项目承担	周欢娜	4.00	4.00	0.20	0.00	0.00
2									
3									
累计					4.00	4.00	0.20	0.00	0.00

河北省省级预算项目绩效评价表

项目名称	MCM4 作为肝细胞癌预后标志物的鉴定及其调控机制的研究 MCM4 作为肝细胞癌预后标志物的鉴定及其调控机制的研究						
项目实施计划	1.项目目标: 临床、细胞、小鼠不同水平研究 MCM4 通过外泌体及 AKT 信号通路促 HCC 转移复发的机制; 2.预期发表核心期刊计划 3~5 篇, SCI 1~2 篇; 3.拟培养研究生 1~2 名。						
资金支出计划 (%)	第一季度	第二季度	第三季度		第四季度		
	0.00	0.00	15.00		20.00		
绩效目标	第一年,临床标本扩大样本分析 MCM4 与 HCC 预后相关性; 第二年,完成细胞水平 MCM4 促 HCC 转移具体机制的研究; 第三年,小鼠体内验证 MCM4 促转移; 去美国哈弗医学院, 肝脏移植中心(前期文章 J HEPATOL 合作者) 实验室交流学习。						
绩效指标分类	绩效指标	绩效指标描述	绩效指标评价标准				评价标准确定依据
			优	良	中	差	
产出指标	发表文章	预期发表核心期刊论文 3~5 篇, 或者 SCI 1~2 篇	≥3	≥2	≥1	<1	计划标准
效果指标	人才培养	拟培养研究生 1~2 名	≥3	≥2	≥1	<1	计划标准

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) 临床标本水平, 分析 MCM4 与 HCC 预后相关性

经医院伦理委员会批准, 患者知情同意, 收集 HBV-HCC 术后癌症组织和癌旁组织。结合临床随访信息, 受试者工作特征 (ROC) 曲线、单因素、多因素等分析 MCM4 mRNA 与 HBV-HCC 病理分级和预后的相关性。分析 MCM4 蛋白表达量与 HBV-HCC 患者病理分级, 生存率, 无复发生存率的关系。

(2) 细胞水平, MCM4 促转移机制研究

① 明确 MCM4 高表达对细胞增殖、周期凋亡、迁移侵袭、抗失巢凋亡作用

比较永生化肝细胞 MIHA、HCC 低转移细胞系 SMMC7721、HCC 高转移细胞系 MHCC97-H 中 MCM4 的表达量是否与转移程度正相关; 建立抗失巢凋亡细胞模型, 明确 MCM4 在抗失巢凋亡细胞中高表达; 通过过表达或敲低 MCM4, 探讨 MCM4 对细胞增殖、周期、凋亡、迁移侵袭、抗失巢凋亡的作用。

② 明确 MCM4 是否通过并如何激活 PI3K/AKT 信号通路。

HCC 低转移细胞系 SMMC7721、HCC 高转移细胞系 MHCC97-H 中过表达或者敲低 MCM4, 检测 PI3K/AKT 信号通路及其下游蛋白 (p-AKT、FOXO、PI3K、P53、GSK3 β 、bcl-2、bax 等) 和 PI3K/AKT 负调节因子 PTEN 的表达变化; 双荧光素酶报告基因系统检测在过表达 MCM4-SMMC7721 细胞中 PI3K/AKT 通路是否被激活。使用 AKT 抑制剂及激活剂处理过表达 MCM4-SMMC7721 细胞、si-MCM4-MHCC97-H 细胞前后中细胞增殖、周期、凋亡、迁移侵袭、抗失巢凋亡的变化。建立抗失巢凋亡细胞模型, 通过敲低 MCM4、使用 AKT 抑制剂, 分别比较 MCM4 和 PI3K/AKT 及细胞增殖、周期、凋亡、迁移侵袭、抗失巢凋亡的变化。利用 co-IP 确定 MCM4 是通过与 PI3K/AKT 通路哪个因子相互作用, 激活 PI3K/AKT 通路。

③ 探讨 MCM4 通过被 HCC 细胞外泌体携带转运到受体细胞促其增殖转移的关键角色;

检测 MHCC97-H 和 SMMC7721 外泌体中 MCM4 mRNA 的存在以及 PI3K/AKT 信号通路及其下游蛋白 (p-AKT、FOXO、PI3K、P53、GSK3 β 、bcl-2、bax 等) 和 PI3K/AKT 负调节因子 PTEN 的表达差异; 分别比较高转移 HCC 细胞

MHCC97-H 和低转移 HCC 细胞 SMMC7721 分泌物处理永生化细胞 MIHA 后, 增殖、周期与凋亡、侵袭转移、抗失巢凋亡、PI3K/AKT 的差异; MHCC97-H 和 SMMC7721 外泌体分别处理 MIHA 细胞及 siMCM4-MIHA 细胞后, 以及 MHCC97-H 和 siMCM4-MHCC97-H 细胞外泌体处理 MIHA 后, 检测 MIHA 细胞 MCM4 表达, 以及 MIHA 增殖、周期与凋亡、侵袭转移、抗失巢凋亡、PI3K/AKT 的变化。

(3) 小鼠体内水平, 验证 MCM4 促进肝细胞癌转移的作用

构建 MCM4 稳定过表达 SMMC7721 细胞株, 加 MHCC97-H 细胞外泌体的培养基培养 SMMC7721 七代以上获得 SMMC7721e 细胞, 过表达株、SMMC7721e 细胞、抗失巢凋亡株与亲本株, 分别接种建立裸鼠皮下移植瘤模型, 体内水平进一步验证 MCM4 的促转移作用。

2. 研究目标 (定量指标和定性指标相结合)

- (1) 临床标本水平, 明确 MCM4 作为 HCC 预后标志物的角色;
- (2) 细胞水平, 研究 MCM4 与 HCC 转移复发的分子机制;
- (3) 小鼠体内水平, 进一步验证 MCM4 对小鼠成瘤和瘤转移的作用;

3. 拟解决的科学问题

(1) MCM4 的表达水平与 HBV-HCC 患者病理分级, 生存率, 无复发生存率的相关。

(2) MCM4 可通过 PI3K/AKT 信号通路促进 HCC 细胞抗失巢凋亡的获得, 其 mRNA 可被供体细胞外泌体所携带转运到受体细胞并翻译成蛋白质起作用, 最终供体、受体细胞增殖加速, 凋亡降低, 促进 HCC 转移复发;

4. 项目的特色与创新之处

(1) 本项目中筛选的 HCC 预后标志物 MCM4, 国内外尚无文章报道与肝癌发生发展相关。

在测序比对之后, 进行富集分析并结合临床信息, 选取的具有预后标志物潜能的目的基因——MCM4, 除本研究从未有报道与肝癌发生发展相关。

(2) 本研究将研究 MCM4 作为预后标志物分子机制, 发现与抗失巢凋亡和外泌体有关, 均和肿瘤循环细胞 (CTC) 所在环境紧密相关, 更便于基础研

究成果向医学的转化应用。

(3) 多组学分析精确指导下的基础研究, 方向更精确可行, 为精准医学再添实例

本研究前期利用新一代测序技术, 通过多组学分析的方法证明了肝内播散和多中心转移的存在, 并建立高复发潜质和低复发潜质计算机模型, 筛选出有潜在预测能力的肝细胞癌标志物, 更加精确地指导基础研究。本项目的完成不仅可为精准医学发展提供一个思路, 而且并有利证实了精准医学的重要性。

5. 预期成果 (项目成果呈现形式及描述)

临床标本水平	确定 MCM4 表达与 HCC 预后紧密相关, 有预后标志物潜能;
细胞水平	MCM4 被供体细胞外泌体内含其 mRNA 转运到受体细胞, 通过激活 AKT 信号通路促细胞增殖、周期阻滞、凋亡率下降、迁移侵袭、抗失巢凋亡进而导致 HCC 复发转移;
小鼠体内水平	进一步验证 MCM4 促进肝细胞癌转移的作用;
发表文章	预期发表核心期刊论文 3~5 篇, 或 SCI 1~2 篇;
培养研究生	拟培养研究生 1~2 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: H2018206307)。

项目负责人签字: 周欢娣
2018年4月20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。



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: H2018206307)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)

2018年5月11日

