



申请代码	H1603
受理部门	
收件日期	
受理编号	

国家自然科学基金 申 请 书

(2014 版)

资助类别：面上项目

亚类说明：

附注说明：

项目名称：DNMT1 通过与 RNA 聚合酶 pol II 相互作用而导致抑癌基因启动子区域异常甲基化的机制研究

申 请 人：李志广 电话：0411-86118952

依 托 单 位：大连医科大学

通 讯 地 址：辽宁省大连市旅顺南路西段 9 号蓝湾院区 208

邮 政 编 码：116044 单位电话：0411-86110146

电子邮箱：zhiguangli2013@126. com

申 报 期 限：2014 年 3 月 4 日

国家自然科学基金委员会

基本信息

申请 人 信 息	姓 名	李志广	性别	男	出生年月	1976 年 1 月	民族	汉族	
	学 位	博士	职称	教授	每年工作时间(月)	9			
	电 话	0411-86118952		电子邮箱	zhiguangli2013@126.com				
	传 真	0411-86118952		国别或地区	中国				
	个人通讯地址	辽宁省大连市旅顺南路西段 9 号蓝湾院区 208							
	工作单位	大连医科大学 / 肿瘤干细胞研究院							
主要研究领域	肿瘤生物学, 表观遗传学, 生物信息学								
依托 单 位 信 息	名 称	大连医科大学							
	联系人	潘艳		电子邮箱	panyan999@126.com				
	电 话	0411-86110146		网站地址	www.dlmedu.edu.cn				
合作 研究 单 位 信 息	单 位 名 称								
项 目 基 本 信 息	项目名称	DNMT1 通过与 RNA 聚合酶 polII 相互作用而导致抑癌基因启动子区域异常甲基化的机制研究							
	英文名称	Machanistic Investigation of the establishment of aberrant methylation at tumor suppressor gene promoters via DNMT1 and polII							
	资助类别	面上项目			亚类说明				
	附注说明								
	申请代码	H1603: 肿瘤遗传与表观遗传			H1602: 肿瘤发生				
	基地类别								
	研究期限	2015 年 1 月 — 2018 年 12 月			研究方向	肿瘤基因组学			
	申请经费	92.1000 万元							
中 文 关 键 词		肿瘤发生;DNA 甲基化;基因组学;生物信息学;二代测序技术							
英 文 关 键 词		Tumorigenesis;DNA Methylation;Genomics;Bioinformatics;Next-Generation Sequencing Technology							



中 文 摘 要	(限 400 字): 抑癌基因的失活与肿瘤的发生发展密切相关。启动子区域异常甲基化是多种肿瘤抑癌基因失活的重要方式,但这种异常甲基化的形成机制一直不清楚。DNMT1 是重要的 DNA 甲基化酶。我们前期的研究表明该酶与 RNA 聚合酶 polII 存在直接相互作用,且两者在染色体上的结合位点有很大程度的重叠。polII 的主要功能之一是识别并结合基因的启动子。据此本项目提出假说,认为 DNMT1 通过与 polII 结合作用于抑癌基因启动子区域,从而导致其异常甲基化。本项目拟确定 polII 与 DNMT1 直接结合的蛋白结构域;将该结构域定点突变后,观察在致癌条件下抑癌基因启动子区域甲基化的动态变化;运用深度测序技术,对该变化在全基因组内进行分析,以验证我们的假说。最后我们还尝试筛选能够通过特异阻断 DNMT1 与 polII 结合而抑制抑癌基因启动子异常甲基化的药物。本项目能够揭示抑癌基因失活的表观调控机制,为抗肿瘤药物的开发提供新的理论依据。
英 文 摘 要	(限 3000 Characters): The inactivation of tumor suppressor gene (TSG) is closely associated with tumor incidence and development. Aberrant methylation at promoter regions is one of important ways for TSG inactivation in many types of tumor. However, the underlying mechanism remains elusive. Our previous studies indicate there exist direct interaction between DNMT1 and RNA polymerase polII and these two proteins are co-precipitated in immuno-precipitation experiments. Moreover, the binding regions on chromosomes of these two proteins are mostly overlapped. Based on these observations, we propose that DNMT1 is brought to gene promoters by interacting with polII and lead to the aberrant promoter methylation of TSG with the assistance of other carcinogenic factors. Here, we will first determine the protein domain necessary for their binding, and mutate such domain in polII. Then, we will transfet mutated and wild type polII genes into cells repectively and investigate promoter methylation alterations under carcinogenic conditions. Finally, BS-seq and ChIP-seq will be employed to reveal the changes of DNA methylation, as well as DNMT1 and polII binding, within the whole genome. We will also try to screen drugs that can specifically suppress abbarrent methylation at TSG promoters via blocking the interaction between DNMT1 and polII. This project will illucidate the epigenetic mechanims leading to TSG inactivation, and guide the development of new anti-tumor drugs.



项目组主要参与者 (注: 项目组主要参与者不包括项目申请人)

编号	姓名	出生年月	性别	职称	学位	单位名称	电话	电子邮箱	项目分工	每年工作时间(月)
1	吕德康	1983-11-23	男	讲师	博士	大连医科大学	0411-861186 36	dekanglv@126.com	BS-seq 数据分析	5
2	张霞	1983-11-27	女	讲师	博士	大连医科大学	0411-861186 36	zhangxia864@126.com	构建测序库, 细胞培	5
3	范文君	1988-3-8	男	博士生	硕士	大连医科大学	0411-861105 09	1949mj@gmail.com	RNAseq 数据分析	6
4	徐岭植	1986-6-23	男	博士生	硕士	大连医科大学	0411-861105 09	xvlingzhi@sina.com	构建突变载体, 转染	8
5	康志杰	1979-10-6	女	博士生	硕士	大连医科大学	0411-861105 09	cathie1997@sina.com	蛋白质沉淀实验	4
6	谢佳君	1988-5-22	女	博士生	硕士	大连医科大学	0411-861105 09	Xie.JJun@gmail.com	药物处理	4
7	吕东维	1987-12-14	男	硕士生	学士	大连医科大学	0411-861189 52	275339603@qq.com	ChIPseq 分析	8
8	邓佳	1988-8-21	女	硕士生	学士	大连医科大学	0411-861189 52	649101944@qq.com	ChIP-seq 实验	6
9	庄艳	1990-4-28	女	硕士生	学士	大连医科大学	0411-861189 52	1317791046@qq.com	细胞培养, 药物处理	6

总人数	高级	中级	初级	博士后	博士生	硕士生
10	1	2	0	0	4	3

说明: 高级、中级、初级、博士后、博士生、硕士生人员数由申请人负责填报 (含申请人), 总人数由各分项自动加和产生。



经费申请表

(金额单位: 万元)

科目	申请经费	备注(计算依据与说明)
一. 研究经费	72.5000	
1. 科研业务费	35.0000	
(1) 测试/计算/分析费	30.0000	BS-seq、RNA-seq、ChIP-seq 等的测序费用
(2) 能源/动力费	1.0000	能源动力费
(3) 会议费/差旅费	2.0000	会议差旅费, 参加国内外会议 2-3 次
(4) 出版物/文献/信息传播费	2.0000	出版, 文献检索发表费
(5) 其他		
2. 实验材料费	25.0000	
(1) 原材料/试剂/药品购置费	25.0000	Illumina TruSeq 等相关试剂盒, 分子生物试剂, 抗体及磁珠, 血清等用品
(2) 其他		
3. 仪器设备费	4.5000	
(1) 购置	4.5000	微量加样器三套(3 万), 电动移液器 4 支(1.5 万)
(2) 试制		
4. 实验室改装费	4.0000	细胞间及大型计算机放置室改装费用
5. 协作费	4.0000	同 Johns Hopkins 的表观遗传学中心及其他深度测序中心合作
二. 国际合作与交流费	7.0000	
1. 项目组成员出国合作交流	3.0000	2-3 名项目组成员出国交流
2. 境外专家来华合作交流	4.0000	邀请 2-4 名境外知名专家来华交流
三. 劳务费	8.0000	支付研究生劳务费用
四. 管理费	4.6000	按申请经费的 5%由单位扣除
合 计	92.1000	
与本项目相关的 其他经费来源	国家其他计划资助经费	
	其他经费资助(含部门匹配)	
	其他经费来源合计	0.0000



申请者在撰写报告正文时，请遵照以下要求：

- 1、请先选定“项目基本信息”中的“资助类别”，再填写报告正文；
- 2、在撰写过程中，不得删除系统已生成的撰写提纲（如误删可点击“查看报告正文撰写提纲”按钮，通过“复制/粘贴”恢复）；
- 3、请将每部分内容填写在提纲下留出的空白区域处；
- 4、对于正文中出现的各类图形、图表、公式、化学分子式等请先转换成 JPG 格式图片，再粘贴到申请书正文相应位置
- 5、本要求将作为申请书正文撰写是否规范的评判依据，请遵照要求填写。

报告正文

报告正文：参照以下提纲撰写，要求内容翔实、清晰，层次分明，标题突出。

（一）立项依据与研究内容（4000-8000 字）：

1. 项目的立项依据（研究意义、国内外研究现状及发展动态分析，需结合科学科学发展趋势来论述科学意义；或结合国民经济和社会发展中迫切需要解决的关键科技问题来论述其应用前景。附主要参考文献目录）；

1.1 抑癌基因的失活对肿瘤的发生发展至关重要

抑癌基因（cancer/tumor suppressor genes，也称肿瘤抑制基因）在调节细胞增殖，促进细胞分化，和抑制细胞迁移中发挥重要作用[1]。抑癌基因的失活会导致细胞生长无法抑制，DNA 损伤不能修复，或凋亡过程不能启动，最终引起肿瘤发生[2]。第一个抑癌基因 Retinoblastoma(RB 基因)是从家族性儿童视网膜母细胞瘤的患者身上发现的[3]。第二个发现的抑癌基因是 p53，其失活与 50%以上人类肿瘤的发生相关[4]。以后发现的抑癌基因都与肿瘤发生密切相关[1]。p16 (又叫 INK4a) 的失活与黑色素瘤及食管癌的发生相关，APC 的失活与结直肠癌的发生相关，VHL 的失活与肾细胞癌的发生相关，而著名的 BRCA 基因的失活则与乳腺癌及卵巢癌的发生相关[1]。因此，阐明抑癌基因失活的机制对于肿瘤的防治非常重要。

1.2 启动子区域异常甲基化是抑癌基因失活的重要方式

抑癌基因启动子区域大都有一个 CpG 岛（CpG island），就是 CpG 二核苷酸连续高密度出现的长度大于 200bp 的 DNA 区域[5]。CpG 岛具有重要的调节基因转录表达的功能[6]。在大多数正常细胞里，抑癌基因启动子区域的 CpG 岛都没有甲基化[5]。而在肿



瘤组织中，这些 CpG 岛则表现为异常的高水平的甲基化[7]。这些异常甲基化导致抑癌基因无法转录，不能发挥抑制肿瘤细胞生长的功能[8]。RB 基因是最早发现的通过启动子区域 CpG 岛异常甲基化而失活的抑癌基因[9]。随后发现多种抑癌基因，包括 p16[10]，APC[11]，VHL[12]，及 BRCA[13]等，都可以通过这种方式而失活。在 109 份乳腺癌样品中对 12 个抑癌基因的调查表明，所有的肿瘤样品都在 3 个以上抑癌基因的启动子区域表现出比周围正常组织明显的高水平的甲基化[14]。为了检测整个基因组到底有多少个 CpG 岛有异常的 DNA 甲基化，Joseph 等运用了一个系统性检测方法，叫做 Restriction Landmark Genomic Scanning (RLGS)，检测了 98 个肿瘤样品中 1184 个 CpG 岛的甲基化水平。这 98 个肿瘤样品涵盖了多种肿瘤类型，包括乳腺癌，结肠癌，神经胶质瘤，鳞状细胞癌，急性髓细胞样白血病，原发性神经外胚层瘤，及睾丸癌。他们发现在整个人类基因组中的 45000 个 CpG 岛中，每个肿瘤样品平均有 600 个 CpG 岛表现出异常的甲基化[15]。这些 CpG 岛大多分布在基因启动子附近[5]。由此可见，启动子区域 CpG 岛异常甲基化是导致抑癌基因失活的重要而普遍的方式。

1.3 抑癌基因启动子区域异常甲基化的形成机制尚不清楚

关于抑癌基因启动子区域异常甲基化的形成机制，人们一直在寻找，但都没能给出让人满意的解释[8, 16-18]。这种解释上的困难部分是因为肿瘤还存在另外一种甲基化特征，即总体的低甲基化（global hypomethylation）[19]。这种特征早在上世纪 80 年代初就被观察到[20]。在将多种肿瘤与肿瘤旁的正常组织做对比时，总是发现肿瘤的总体甲基化水平明显偏低[19-20]。总体上的低甲基化对肿瘤的发展与恶化也起着很大的推动作用[21]。它通过激活内源性逆转录病毒的跳跃及隐蔽性启动子的转录等而引起肿瘤基因组的不稳定[19, 21]。目前认为总体低甲基化的形成与肿瘤细胞中 DNMT3a 的突变及 DNMT 在细胞周期中不正确的表达时相有关[22-23]。但在这种总体低甲基化的背景下，如何造成了启动子区域特异的高甲基化，一直给人们造成困扰。

1.4 本项目组的前期研究显示启动子区域的异常甲基化可能是通过 DNMT1 与 polII 的结合而实现

本项目组的前期研究表明，DNMT1 与 RNA 聚合酶 polII 存在相互作用。运用免疫共沉淀技术，我们发现识别 DNMT1 的抗体在沉淀 DNMT1 的时候，能够把 polII 也沉淀下来。而识别 polII 的抗体在沉淀 polII 的时候，也能够把 DNMT1 沉淀下来（图 3）。而且，ChIP-seq 的结果显示 DNMT1 与 polII 在染色体上的结合位置非常相似（图 5）。RNA



polII 的主要功能就是识别基因的启动子并进行基因转录。这样，DNMT1 就可以通过与 polII 的结合而到达基因及其启动子区域。正常情况下，转录很快起始，polII 及 DNMT1 很快进入基因内部。而且启动子区域有很多转录因子的结合。这很可能保护了 DNA，使得 DNMT1 不能与 DNA 直接接触而对其甲基化。因此，启动子区域甲基化并不升高，而基因内部则在 DNMT1 的作用下会有比较高的甲基化。这一推测与最近多个课题组(包括我们，见图 6)的发现，即转录越活跃的基因内部 DNA 的甲基化水平越高，非常符合[24-25]。但在致癌条件下，由于 DNA 存在损伤，polII 及 DNMT1 需要较长时间停在启动子区域，以等待下游损伤修复的完成。而且，转录因子对启动子区域的结合出现紊乱，使得 DNMT1 可以直接接触 DNA。这很可能最终导致了启动子区域的异常甲基化。图 1 对我们的这一假说进行了更详细的说明。本项目中，我们拟综合利用多种生物学实验手段，包括传统的分子生物学、细胞生物学实验方法，及新近出现的基于深度测序的各种方法，如 RNA-seq、ChIP-seq、BS-seq 等，对上述假设进行检验，来阐明抑癌基因启动子区域甲基化建立的机制。

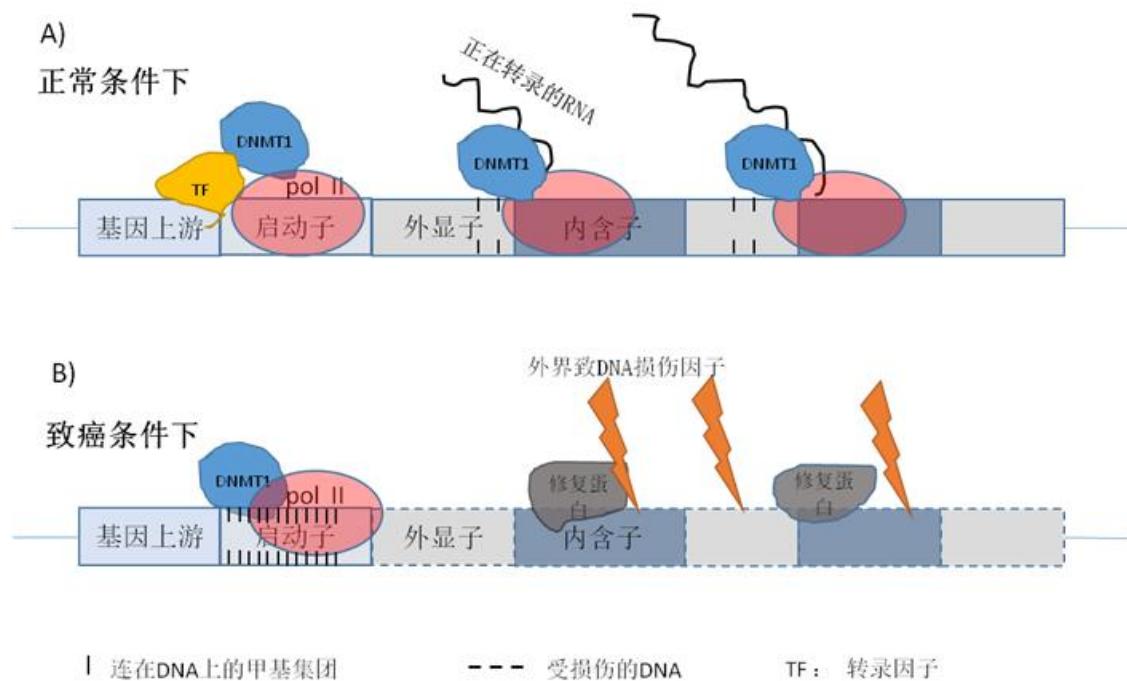


图 1. DNMT1 与 polII 的结合在致癌条件下导致启动子区域异常甲基化的可能机制。A) 在正常条件下，基因启动子区域聚集有比较多的转录因子。这些因子保护了 DNA，使 DNMT1 不能与 DNA 直接接触而将其甲基化。而且 DNMT1 很快随 polII 进入基因内部，在此没有转录因子的保护作用，DNMT1 开始发挥甲基化酶活性。这导致转录越活跃的基因，基因内部的 DNA 甲基化水平越高。B) 在致癌条件下，转录因子的结合出现紊乱，DNMT1 很可能找到机会对 DNA 进行甲基化。而且大多致癌物会造成 DNA 损伤。polII 需要等待下游损伤修复完毕才能开始转录。这给了 DNMT1 较多机会停留在启动子区域而对其进行甲基化。



1.5 抑癌基因启动子区域异常甲基化形成机制的阐明对肿瘤治疗有重要意义

通过降低抑癌基因启动子区域的高甲基化而治疗肿瘤的药物，如 Decitabine (5-Aza-2'-deoxycytidine, 5-氨基-2'-脱氧胞苷)，已经在世界上多个国家被临床应用。该药物在治疗各种白血病，如急性髓细胞白血病[26]，慢性粒细胞白血病[27]，及慢性骨髓单核细胞性白血病[28]时表现出比较好的效果。但在治疗其他肿瘤时，Decitabine 的表现并不理想[29]。Decitabine 进入细胞后，能够引起 DNMT1 的降解，使细胞内 DNMT1 的蛋白水平下降，进而降低抑癌基因启动子区域的甲基化水平[29]。Decitabine 令人担忧的地方是 DNMT1 的活性被淬灭后，不但抑癌基因启动子区域的甲基化被降低，基因组别的区域的甲基化也被降低。肿瘤细胞的总体甲基化水平本来就比正常细胞低[19]。DNMT1 活性的淬灭会更加恶化这一现象。而总体的低甲基化会通过引起染色体的缺失、插入、移位、倒位等而促进肿瘤恶化[19]。如果能够寻找一种药物，只特异性的降低抑癌基因启动子区域的甲基化，而不影响 DNMT1 在基因组其它区域的活性，将可以避免上述的负面后果。本项目将揭开抑癌基因启动子甲基化异常的机制。这会为寻找下一代的抗肿瘤药物提供理论基础。

【参考文献】

1. Sherr, C.J., *Principles of tumor suppression*. Cell, 2004. **116**(2): p. 235-46.
2. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
3. Murphree, A.L. and W.F. Benedict, *Retinoblastoma: clues to human oncogenesis*. Science, 1984. **223**(4640): p. 1028-33.
4. Hollstein, M., et al., *p53 mutations in human cancers*. Science, 1991. **253**(5015): p. 49-53.
5. Saxonov, S., P. Berg, and D.L. Brutlag, A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(5): p. 1412-7.
6. Goll, M.G. and T.H. Bestor, *Eukaryotic cytosine methyltransferases*. Annu Rev Biochem, 2005. **74**: p. 481-514.
7. Baylin, S.B. and J.G. Herman, *DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics*. Trends Genet, 2000. **16**(4): p. 168-74.
8. Robertson, K.D., *DNA methylation, methyltransferases, and cancer*. Oncogene, 2001. **20**(24): p. 3139-55.
9. Greger, V., et al., Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. Hum Genet, 1989. **83**(2): p. 155-8.
10. Gonzalez-Zulueta, M., et al., Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. Cancer Res, 1995. **55**(20): p. 4531-5.
11. Hiltunen, M.O., et al., Hypermethylation of the APC (adenomatous polyposis coli) gene promoter region in human colorectal carcinoma. Int J Cancer, 1997. **70**(6): p. 644-8.
12. Herman, J.G., et al., *Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(21): p. 9700-4.
13. Dobrovic, A. and D. Simpfendorfer, *Methylation of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer*. Cancer Res, 1997. **57**(16): p. 3347-50.
14. Bae, Y.K., et al., *Hypermethylation in histologically distinct classes of breast cancer*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(18 Pt 1): p. 5998-6005.
15. Costello, J.F., et al., *Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns*. Nat Genet, 2000. **24**(2): p. 132-8.
16. el-Deiry, W.S., et al., *High expression of the DNA methyltransferase gene characterizes human neoplastic cells and progression stages of colon cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(8): p. 3470-4.



17. Issa, J.P., et al., *Increased cytosine DNA-methyltransferase activity during colon cancer progression*. J Natl Cancer Inst, 1993. **85**(15): p. 1235-40.
18. Etoh, T., et al., *Increased DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein expression correlates significantly with poorer tumor differentiation and frequent DNA hypermethylation of multiple CpG islands in gastric cancers*. Am J Pathol, 2004. **164**(2): p. 689-99.
19. Ehrlich, M., *DNA methylation in cancer: too much, but also too little*. Oncogene, 2002. **21**(35): p. 5400-13.
20. Gama-Sosa, M.A., et al., *The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors*. Nucleic Acids Res, 1983. **11**(19): p. 6883-94.
21. Eden, A., et al., *Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation*. Science, 2003. **300**(5618): p. 455.
22. Jones, P.A., *DNA methylation errors and cancer*. Cancer Res, 1996. **56**(11): p. 2463-7.
23. Ley, T.J., et al., *DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia*. N Engl J Med, 2010. **363**(25): p. 2424-33.
24. Laurent, L., et al., *Dynamic changes in the human methylome during differentiation*. Genome Res, 2010. **20**(3): p. 320-31.
25. Ball, M.P., et al., *Targeted and genome-scale strategies reveal gene-body methylation signatures in human cells*. Nat Biotechnol, 2009. **27**(4): p. 361-8.
26. Bryan, J., et al., *Pharmacokinetic evaluation of decitabine for the treatment of leukemia*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2011. **7**(5): p. 661-72.
27. Wijermans, P.W., et al., *Efficacy of decitabine in the treatment of patients with chronic myelomonocytic leukemia (CMML)*. Leuk Res, 2008. **32**(4): p. 587-91.
28. Issa, J.P., et al., *Phase II study of low-dose decitabine in patients with chronic myelogenous leukemia resistant to imatinib mesylate*. J Clin Oncol, 2005. **23**(17): p. 3948-56.
29. Strelsemann, C. and F. Lyko, *Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine*. Int J Cancer, 2008. **123**(1): p. 8-13.



2. 项目的研究内容、研究目标, 以及拟解决的关键科学问题(此部分为重点阐述内容);

2.1 研究内容

本项目中, 我们将综合利用多种生物学技术, 来阐明肿瘤发生过程中肿瘤抑制基因启动子区域异常甲基化的建立过程及机制。下面从几个方面, 对拟开展的研究内容进行逐步阐述。

1) 确定 polII 与 DNMT1 直接结合的蛋白功能域

- A. 将 polII 基因 C 末端区域 (C-terminal domain, polII 与其它蛋白的作用多发生在该区域) 做不同长度的删除, 构建出一系列载体。本项目组已有携带 polII 全长基因的载体。该 polII 基因携带一点突变, 能抵抗鹅膏蕈碱 (alpha-amanitin) 的降解作用。
- B. 转染上述载体进入细胞, 运用鹅膏蕈碱处理降解内源性 polII, 用蛋白质免疫共沉淀技术检测不同删除突变的 polII 与 DNMT1 的结合情况。本项目的前期发现就是用蛋白质免疫共沉淀技术完成的 (图 3)。
- C. 确定大致功能域后, 定点突变该区域的某个或某几个氨基酸的编码密码子。
- D. 转染携带定点突变的 polII 基因进入细胞, 检测 polII 与 DNMT1 的结合情况, 以确定出关键的氨基酸位点。

2) 建立细胞培养模型, 确定 polII 与 DNMT1 的结合对启动子区域甲基化的影响

- A. 构建携带突变及野生型 polII 基因的逆转录病毒载体, 转染乳腺上皮细胞 HMEC (human mammary epithelial cells), 得到稳定细胞株。HMEC 细胞是正常的非癌变细胞。
- B. 用致癌化合物马兜铃酸 Aristolochic acid 与非致癌化合物松萝酸 Usnic acid, 对稳定转染的 HMEC 细胞, 进行低剂量长时间反复处理, 即加药-清洗-再加药-再清洗。鹅膏蕈碱的处理也同时进行, 以降解内源性的 polII。马兜铃酸与松萝酸都能诱导大量基因表达。低剂量可以降低化合物的细胞毒性作用。长时间可以维持 polII 对启动子的持续占有状态。
- C. 在 5 个不同时间点, 用 RNA-seq 检测基因表达的变化。
- D. 选择表达水平逐渐下降、保持不变、逐渐上升的三组基因 (每组取 5 个代表基因), 检测启动子区域 DNMT1 的结合, polII 的结合, DNA 的甲基化。特别关注 DNMT1 的结合逐渐上升, DNA 甲基化逐渐上升, 基因表达逐渐下降的情况。

3) 检测全基因组范围内 DNMT1 的结合, polII 的结合, 及 DNA 甲基化的变化情况

- A. 通过分析上述代表性基因的结果, 筛选出 DNMT1 的结合, polII 的结合, 及 DNA 甲基化三个因素变化最明显的时间点。



- B. 运用 ChIP-seq, 检测全基因组内 DNMT1 及 polII 在染色体上的结合。
 - C. 运用 BS-seq (又叫 MethylC-seq), 检测全基因组内 DNA 甲基化的情况。
- 4) 分析启动子区域, 基因内区域(这两个区域的甲基化由 DNMT1 通过与 polII 的结合在基因转录过程中完成)及基因间区域(即基因之间的染色体区域, 甲基化由其它机制在 DNA 复制期间完成)的甲基化变化情况
- A. 将染色体分为启动子区域, 基因内区域, 及基因间区域。
 - B. 从 NCBI 的基因表达数据库中 (gene expression omnibus), 下载未经过处理的 HMEC 乳腺细胞及已经完成恶性转化过程的乳腺癌细胞的甲基化组数据。这两组数据都已经发表公开。
 - C. 与本项目产生的经过致癌及非致癌化合物处理的甲基化组数据进行对比, 分析启动子区域, 基因内区域, 及基因间区域的甲基化情况。在全基因组范围内, 阐明启动子特异高甲基化及总体低甲基化的形成过程。
 - D. 尝试寻找一种药物(化合物或抗体), 能够特异性地阻断或减弱转录驱动的甲基化, 而不影响复制驱动的甲基化

2.2 研究目标

本项目的研究目标是阐明肿瘤细胞中抑癌基因启动子区域异常甲基化建立的机制, 为寻找特异地消除基因启动子区域的甲基化而不影响肿瘤细胞总体的甲基化的药物, 提供理论指导。具体如下:

- A. 阐明 polII 与 DNMT1 相结合的蛋白功能域。
- B. 阐明启动子区域异常甲基化建立的动态过程及机制。
- C. 分析启动子区域, 基因内区域, 基因间区域在致癌与非致癌条件下甲基化变化的过程及其异同。
- D. 分析开发特异地阻断转录驱动甲基化, 而不影响复制驱动甲基化的抗肿瘤药物的可能性。

2.3 拟解决的关键科学问题

本项目拟解决的关键科学问题是肿瘤细胞中抑癌基因启动子区域异常的甲基化是如何建立起来的。本项目中, 我们将建立细胞培养模型, 把野生型及 DNMT1 结合功能域有突变的 polII 基因转染入细胞, 用致癌化合物及非致癌化合物反复处理, 来观察启动子区域的异常甲基化建立的动态过程, 阐明其机制。运用甲基化组数据, 我们还拟在全基因组范围内验证该机制的正确性及普适性。这一问题的阐明, 对于肿瘤的治疗有重



要意义。目前 Decitabine 药物在治疗某些肿瘤时，如急性髓细胞白血病，表现出较好的疗效。但在治疗其他多种肿瘤时，都没有明显效果，甚至有恶化肿瘤病情的趋势。这是因为 Decitabine 非特异性地降低细胞内所有位点的甲基化水平，这包括抑癌基因启动子区域的异常甲基化，还包括内源性逆转录病毒区域 (Endogenous Retrovirus, ERV)，长散在重复序列(Long Interspersed Nuclear Elements, LINE)，短散在重复序列(Short Interspersed Nuclear Elements, SINE)，中心粒(Centromere)等区域的甲基化。而 EVR, LINE, SINE，及中心粒区域的甲基化对抑制它们的转录与跳跃，及维护基因组的稳定性非常重要。基于本项目发现而开发的下一代肿瘤药物，将可以避免 Decitabine 所带来的副作用。

3. 拟采取的研究方案及可行性分析（包括研究方法、技术路线、实验手段、关键技术等说明）；

3.1 研究方法及方案

本项目将综合利用多种研究方法，对肿瘤细胞内抑癌基因启动子区域异常甲基化的形成机制进行研究。这些研究方法，既包括传统的分子细胞生物学方法，如基因克隆与突变、细胞培养与处理、蛋白质免疫共沉淀等，又包括新近出现的基于高通量测序技术的各种方法，如 RNA-seq、ChIP-seq、BS-seq 等。同时，为了对高通量测序所产生的数据进行分析，还需要用到多种生物信息学及生物统计学方法。下面，对几个主要的方法方案进行简要介绍。

1) 细胞系的选取及对照细胞甲基化组数据的获得

本项目拟利用人乳腺上皮细胞 HMEC 进行研究。这种细胞是正常的非癌变的细胞，由 BS-seq 产生的单碱基水平的甲基化组已经被测序完成，相关数据可以从美国 NCBI 的数据库 SRA 下载。这样，本项目只需要对经过外界刺激处理的细胞样品进行甲基化组测序。而且，与其对应的完全恶化的乳腺癌细胞的甲基化组也已经被测序完成，可以从 SRA 数据库下载。这些数据，再加上本项目中产生的数据，我们就可以比较正常细胞，经过不同外界刺激处理的细胞，及癌变的细胞之间甲基化组的差别，特别在启动子区域的差别。

2) 运用蛋白质免疫共沉淀技术研究 DNMT1 与 polIII 之间的相互作用

我们已经用该方法在两种肿瘤细胞系内检测到了 DNMT1 与 RNA 聚合酶 polIII 之间存在相互作用（见工作基础部分图 3）。本项目中，我们将在不同 polII 突变基因转染的



Raji 细胞中，运用该方法检测这两种蛋白的相互作用，确定 polII 与 DNMT1 发生作用的蛋白功能域。

3) 二代测序库的序列测定

本项目需要用 RNA-seq 检查外界刺激处理后基因表达的变化，用 ChIP-seq 检查 DNMT1 及 polII 在基因组内结合位点的变化，用 BS-seq 检测基因组甲基化水平及甲基化模式的变化。这些，都需要利用高通量测序仪进行序列测定。本项目中的序列测定将在 Illumina 的测序仪 HiSeq2000，HiSeq2500，或 MiSeq 上完成。多家生物技术公司，如华大基因，诺和致源，贝瑞和康等，都有这种类型的测序仪。我们将通过收费服务的方式完成序列测定。

4) 生物信息学分析

我们已经建立了一套用来分析不同深度测序方法如 BS-seq、RNA-seq 及 ChIP-seq 所产生数据的数学算法、统计模型及计算机程序。本项目中，我们将利用这些程序算法，并结合别的课题组发表的相关程序算法，对我们的数据进行深度分析。主要的分析包括 DNMT1 与 polII 的结合位点的重叠程度；外界刺激的处理对这种重叠的影响；致癌化合物的处理与非致癌化合物的处理所引起的改变的异同；重叠区域发生在基因启动子附近的数量；重叠区域对甲基化的影响等。

3.2 技术路线

本项目的技术路线如图 2 所示：

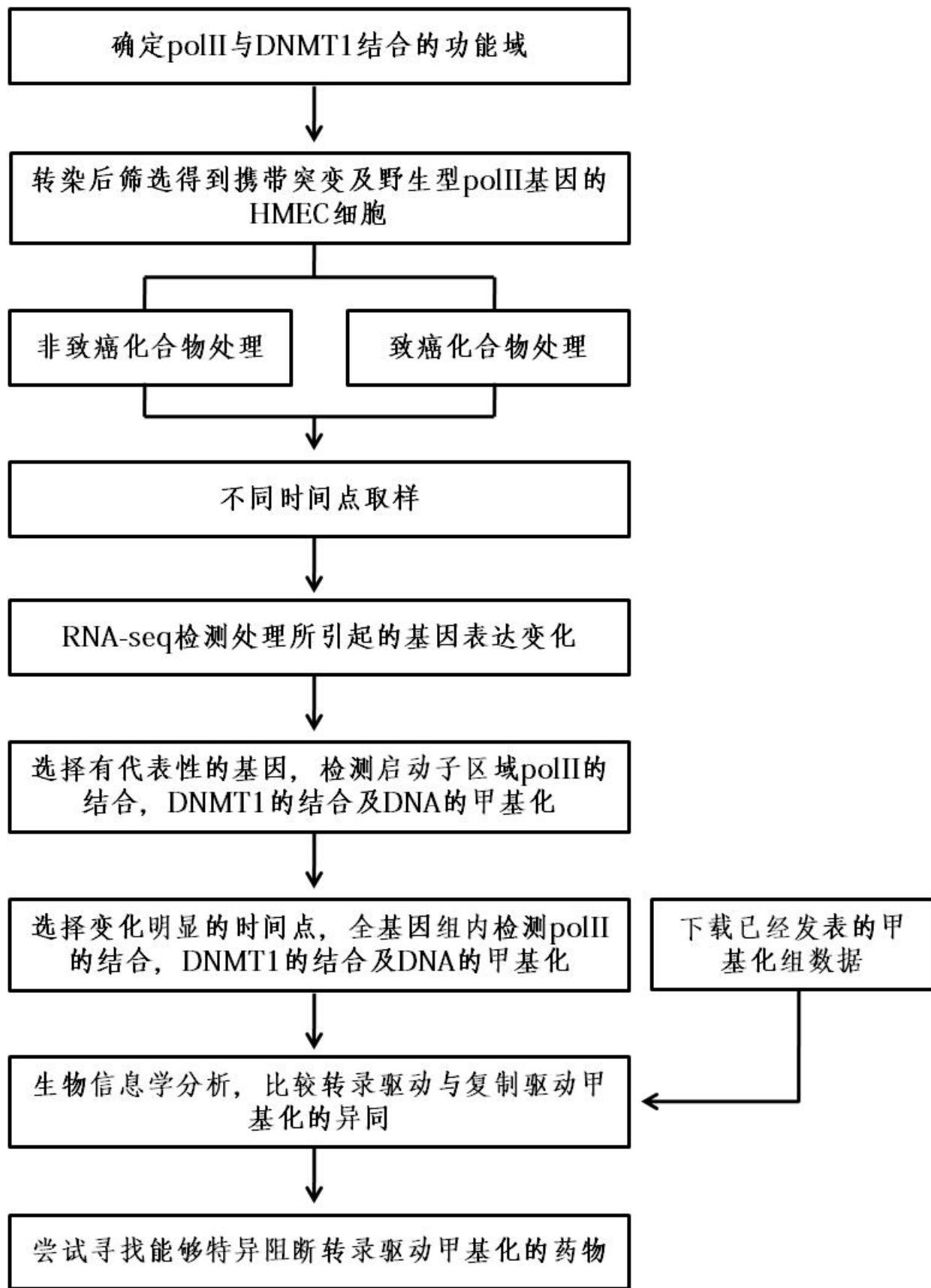


图 2. 本项目的技术路线图



3.3 关键技术

本项目所用的技术分为生物学实验部分及生物信息学分析部分两大块。生物学实验部分所用到的技术大多为常规技术，如细胞培养，蛋白质免疫共沉淀，基因克隆与突变。而生物信息学部分所用到的技术大多是比较新的技术，包括我们实验室自己开发的数学算法及程序模型。所以，本项目的关键技术主要是对 RNA-seq, ChIP-seq, 特别是 BS-seq 的数据分析技术，以及将数据分析所产生的结果与生物学实验所产生的结果进行综合比较以解答生物学问题的技术，具体如下。

1) RNA-seq 及 ChIP-seq 的数据分析技术

对于 RNA-seq 数据的分析，目前比较多的是运用 Tophat 程序进行测序数据与参考基因组的比对，生产 SAM 文件，然后运用 Cufflink 计算每一个基因，包括同一个基因不同转录 isoforms 的表达水平。本项目拟采用此方法完成 RNA-seq 的数据分析。对于 ChIP-seq 的数据，一般用 bowtie 或 BWA 程序完成测序数据与参考基因组的比对，然后运用 MACS 或 SICER 找出靶蛋白可能的结合位点，即 ChIP-seq 测序数据聚集在一起而在染色体某个区域所形成的峰。然后再自己编写程序完成后续的各种比较分析及图表制作。本项目中，我们拟采用上述方法来完成 ChIP-seq 数据的分析。

2) BS-seq 的测序库构建及数据分析技术

BS-seq(又叫 MethylC-seq)是本项目所用到的一个重要技术。该技术是 bisulfite(BS, 亚硫酸钠)DNA 处理技术与深度测序技术的结合。BS 处理能够使 DNA 中没有甲基化的胞嘧啶发生脱氨作用，变为尿嘧啶，而甲基化的胞嘧啶则不受影响。经过 PCR 扩增，尿嘧啶 U 变为胸腺嘧啶 T，甲基化的胞嘧啶变为正常的胞嘧啶。在进行序列测定后，通过与已知 DNA 序列的比较，就可以确定某个位置上的胞嘧啶甲基化与否。BS 处理与深度测序的结合，即 BS-seq，是 DNA 甲基化领域的一个革命性进展。与以前的方法相比，该技术能够全局性的检测整个基因组范围内 DNA 的甲基化状态，而且精确到每一个碱基，并且能够区分甲基化是发生在正链还是负链 DNA 上。对于 BS-seq 测序库的构建， Illumina 及 Rubican 公司都不提供现成的试剂盒。我们以往构建的 BS-seq 的测序库，都是在 Illumina 构建常规测序库的基础上，经过一系列的改造，而完成。我们构建的测序库，都能产生高质量的测序数据（见工作基础部分图 8），而且基于此而分析出的甲基化模式，与别的课题组已经发表的数据，有很高的致性（见工作基础部分图 9）。BS-seq 测序数据的分析比较复杂。这主要是因为 BS-seq 所产生的数据量巨大。通常情况下，



HiSeq2000 的一条测序通道可以完成 4-5 个 RNA-seq 或 ChIP-seq 文库的测序。而 BS-seq 的一个文库，就需要 3-5 条测序通道共同完成。对于 BS-seq，我们主要运用我们自己编写的程序来进行数据分析。与已经发表的 BS-seq 数据分析程序相比，我们的程序有几个优点：①可以处理双端测序(pair-end sequencing)所产生的 BS-seq 数据。有些程序只能处理单端测序所产生的数据或处理双端测序数据时会产生不准确的结果；②如果双端测序所产生的 read1 及 read2 不能单独准确定位时，通过另一条 read 或它们之间的距离确定该 read pair 在基因组上的位置。这大大提高了数据的利用效率，而且使内源性病毒等重复序列的研究成为可能；③在寻找测序单克隆时，我们通过 read1 的起始位点及 read2 的终止位点共同确定一个测序单克隆。这比仅通过一个位点来确定测序单克隆的算法要准确很多。事实上，目前的 BS-seq 领域的程序大多通过一个位点来确定测序单克隆。

3.4 可行性分析

本项目是一个切实可行的项目。本项目的设计方案合理，设计思路清晰，而且有很好的前期工作基础。另外，申请人在本项目所涉及到的两个领域，分子细胞生物学领域及生物信息学领域，都有丰富的研究经验。下面，从几个方面对本项目的可行性进行分析。

1) 设计方案合理，设计思路清晰

本项目中，我们运用外界刺激反复处理的模型，研究 DNMT1 如何通过与 polII 的相互作用而被带到基因的启动子区域，进而造成肿瘤细胞内抑癌基因启动子区域的高水平的甲基化。研究方案的设计基于我们以往的发现，即 DNMT1 与 polII 存在直接相互左右，以及最近报道的基因转录与 DNA 甲基化水平存在正相关的事，即活跃转录的基因在基因内部有较高的 DNA 甲基化水平。我们选择了外界因子反复处理模型，反复的较短时间的处理可以尽量降低外界处理对细胞造成的毒副作用，减少细胞的死亡，还可以维持诱导基因的持续高表达状态，使 polII 及由 polII 带来的 DNMT1 实现对基因启动子的长期占据，进而完成对启动子区域的甲基化。这种设计，非常清晰合理，能保证本项目顺利完成。

2) 前期工作基础扎实

本项目的设计是建立在扎实的前期工作基础之上的。我们发现 1) 在免疫共沉淀实验中，识别 DNMT1 的抗体能够将 polII 共沉淀下来，而识别 polII 的抗体能够将 DNMT1 共沉淀下来（见工作基础部分图 3），这说明 DNMT1 与 polII 存在相互作用；2) 在全基



因组范围内, DNMT1 与 polIII 在从基因转录起始位点到转录终止位点的整个结合模式很接近(见工作基础部分图 4), 这说明 DNMT1 确实很可能是通过 polIII 被带到基因区域; 3) 在全基因组范围内, 基因内部 DNA 甲基化的水平与基因的表达水平呈正相关(见工作基础部分图 6), 说明活跃转录的基因有更多地机会与 DNMT1 结合, 从而被甲基化。这些工作基础, 不但使本项目提出的设计方案切实可行, 而且也为本项目将来的顺利实施提供了经验积累。

3) 申请人在分子细胞生物学领域及生物信息学领域都有丰富的研究经验

本项目需要用到分子细胞生物学领域的实验技术, 同时还要用到生物信息学领域的分析方法。对这两个领域, 本申请人都有丰富的研究经验。在分子细胞生物学领域, 本申请人曾经阐明白细胞介素 IL-4 通过促进抗细胞凋亡蛋白的表达而促进肿瘤生长(*Cancer Research* 2008, 68: 8687-8694), 天然免疫细胞是肿瘤排斥所需的 gamma 干扰素 IFNg 的重要提供者(*Journal of Immunology* 2007, 179:1568–1576), 辅助性 T 细胞 Th17 在肿瘤生长过程中发挥重要作用 (*Cancer Research* 2009, 69: 2010–2017)。在生物信息学领域, 本申请人曾比较不同高密度基因芯片平台在揭示基因表达差异及基因表达差异所蕴含的生物学意义的一致性(*BMC Bioinformatics* 2009, 10:S12), 研究化学诱变剂 ENU 所引起的 microRNA 表达谱的变化及时间动态过程 (*BMC Genomics* 2010, 11:609), 用 RNA-seq 分析化学致癌物 AA 引起肿瘤发生的机制 (*Chem. Res. Toxicol.* 2011, 24: 1486-1493), 比较不同基因表达谱分析方法在预测临床疗效时的差异 (*Nature Biotechnology* 2010, 28: 827-838)。这些研究经历, 使本申请人积累了丰富的研究经验, 能保证本项目的顺利实施。

4. 本项目的特色与创新之处;

本项目有诸多特色之处及有创新的地方。首先, 本项目运用反复外界刺激的模型, 来模拟肿瘤发生过程中抑癌基因启动子区域异常甲基化的建立过程。其次, 本项目综合利用经典分子细胞生物学实验技术及高通量技术来解决生物学问题, 使得生物实验阐明的机制可以在全基因范围内得到验证。下面, 对这两个方面的特色及创新之处进行简要介绍。

4.1 反复外界刺激处理的细胞培养模型

肿瘤细胞内抑癌基因启动子区域的高甲基化水平已经被不同的课题组在不同类型的肿瘤细胞中反复观察到。但是, 对于其形成机制, 却一直没有清楚的认识。造成这一



状况的主要原因之一，就是缺乏合适的模型对其进行研究。我们设计的这一模型，使研究上述问题成为可能。这一模型，基于我们观察到的 DNMT1 与 polII 存在直接相互作用这一事实，以及基因内部 DNA 的甲基化水平与基因表达存在正相关这一现象，有坚实的理论基础。而且，反复的短时间的刺激，一方面可以降低外界刺激的毒副作用，另一方面可以维持诱导基因的高表达状态，使 polII 及 DNMT1 长期占据基因的启动子区域。这一模型，是本项目的一大特色及创新之处。

4.2 经典分子细胞生物学方法与高通量测序技术及其分析技术的紧密结合

本项目会运用多种经典的分子细胞生物学实验技术，如细胞培养，蛋白质免疫共沉淀，real-time PCR，ChIP-PCR，及 BS-PCR 等，还会用到高通量测序技术，如 RNA-seq，ChIP-seq，BS-seq 等。这种结合，能够使我们更加深入全面地阐明生物学问题。细胞培养模型可以模拟启动子区域高甲基化水平的建立过程，蛋白质免疫共沉淀可以检测 DNMT1 与 polII 的结合，real-time PCR，ChIP-PCR，及 BS-PCR 等可以检测单个基因的表达水平，单个基因组区域内蛋白质的结合，单个基因组区域内 DNA 甲基化的情况。而 RNA-seq，ChIP-seq，BS-seq 则可以检测全基因组范围内所有基因的表达水平，所有染色体区域蛋白质的结合情况，所有胞嘧啶位点上 DNA 甲基化的情况。我们拟先用单基因或单位点检测方法对所有时间点的样品进行检测，然后挑选基因表达、蛋白质结合及 DNA 甲基化变化最大的样品，进行全基因组检测。这样，我们就可以在全基因组范围内，确定所有基因的启动子区域，经过外界因子反复刺激后，DNA 甲基化的变化情况。

5. 年度研究计划及预期研究成果（包括拟组织的重要学术交流活动、国际合作与交流计划等）。

5.1 年度研究计划

- A. 2015.1-2015.12 构建携带删除突变及点突变的 polII 基因载体，转染细胞，做蛋白质免疫共沉淀实验，阐明 polII 与 DNMT1 结合的功能域及关键氨基酸。
- B. 2016.1-2016.12 转染突变及野生型 polII 基因到 HMEC 细胞，得到稳定株。建立外界刺激反复处理的细胞培养模型，摸索刺激所需要的化合物的浓度，刺激持续的时间长度，间歇的时间长度。选择 5 个时间点，做 RNA-seq。
- C. 2017.1-2017.12 根据 RNA-seq 的结果选择代表性基因，检测经过不同次数的循环处理后，启动子区域 DNMT1 的结合、polII 的结合及 DNA 甲基化的变化。根据代表性基因的检测结果，选择合适的样品，运用 ChIP-seq 及 BS-seq 进行全基因组的检测。并对数据进行初步分析。



- D. 2018.1-2018.12 下载已经发表的数据，同本项目产生的数据比较，分析基因启动子区域甲基化的建立过程及机制，并分析转录驱动与复制驱动甲基化的异同。尝试寻找能够特异阻断转录驱动甲基化的药物。

5.2 预期研究成果

- A. 确定 polII 与 DNMT1 结合的功能域，为下一代抗肿瘤药物的开发提供靶点。
- B. 通过实验及数据分析，阐明肿瘤细胞内抑癌基因启动子区域甲基化的形成机制，比较转录驱动与复制驱动甲基化的异同，发表 1-2 篇高质量的学术论文。
- C. 培养博士生 1-2 名，硕士生 2-3 名。

5.3 学术交流

- A. 邀请 2-3 名肿瘤生物学或表观遗传学领域的国际知名专家来华交流。
- B. 参加 2-4 次肿瘤生物学或表观遗传学领域的国际国内学术会议。



(二) 研究基础与工作条件

1. 工作基础 (与本项目相关的研究工作积累和已取得的研究工作成绩);

本项目有坚实的工作基础。我们在前期的研究中已经观察到 DNMT1 与 polII 在蛋白质水平存在相互作用 (图 3)。通过 ChIP-seq, 我们还发现 DNMT1 在染色体上的结合区域与 polII 很相似 (图 4-5)。通过分析别人已经发表的甲基化组数据, 我们发现在基因内部 DNA 的甲基化水平与基因的表达水平呈正相关 (图 6)。对甲基化酶缺陷的小鼠胚胎干细胞的恢复实验表明, 活跃转录基因内部(非启动子区域)的甲基化能够被恢复, 而沉默基因内部的甲基化则不能被恢复(图 7)。这些数据, 促使我们提出肿瘤发生过程中, 抑癌基因启动子区域的异常甲基化, 是 DNMT1 通过与 polII 的结合被定位到启动子区域而实现的。

1.1 DNMT1 与 polII 在蛋白质水平存在相互作用

为了检测 DNMT1 与 polII 之间的相互作用, 在 Jurkat 细胞中, 我们用了两种不同的 polII 抗体, N-20 与 C-21, 来做蛋白质免疫共沉淀实验。我们发现, 这两种抗体, 都能将 DNMT1 共沉淀下来 (图 3a)。为了进一步证明这一现象, 我们又用两种 DNMT1 的抗体, 分别购自 IMG 及 Bethyl 公司, 做相同的实验。结果显示这两种抗体都能将 polII 沉淀下来。内源性 polII 与 DNMT1 的作用不是很强, 需要收集大量的细胞来做实验。我们用了一个 polII 过表达的系统, 在另外一个细胞系 Raji, 重复了上述实验。如图 3c 所示, 该 polII 基因在星号所示位置存在一基因突变, 这一突变能够使 polII 抵抗鹅膏蕈碱的降解作用。同时, 该基因在 N 末端还有一个 HA 标签。用鹅膏蕈碱处理转染的 Raji 细胞, 内源性的 polII 就会被降解。用 anti-HA 的抗体, 就可以将 polII 及与之相互作用的蛋白给沉淀下来。如图 3d 显示, 在沉淀下来的蛋白中, 确实含有 DNMT1, 而且是 DNMT1 的二聚体。这与以前的研究发现 DNMT1 通过其二聚体而发挥甲基化酶功能的结论相一致 (*J Cell Biochem.* 2009, 106:521-528)。

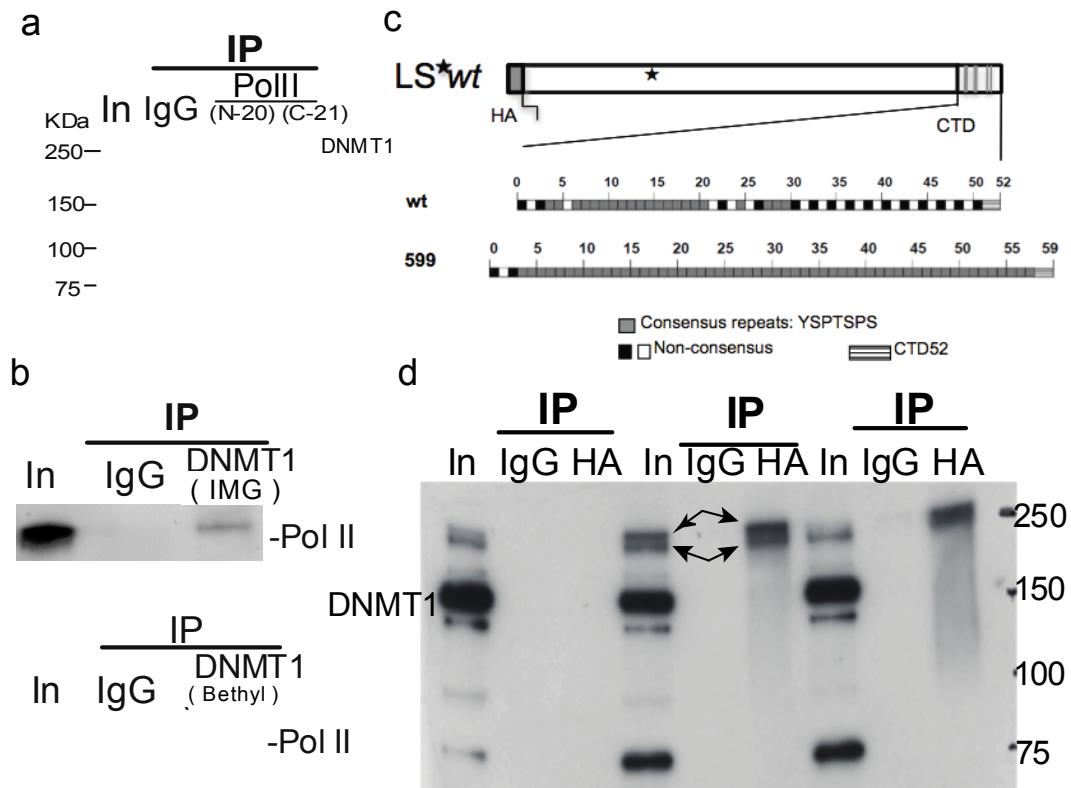


图 3. DNMT1 与 polII 存在相互作用。a) 抗 polII 的抗体, N-20 与 C-21, 能够共沉淀下来 DNMT1。b) 抗 DNMT1 的抗体, 分别来自 IMG 及 Bethyl 公司, 能够共沉淀 polII。c) 用于基因转染的 polII 基因的示意图。d) 在鹅膏蕈碱处理后, 抗 HA 的抗体能够共沉淀 DNMT1。

1.2 DNMT1 与 polII 在染色体上的结合非常相似, 而且都与基因表达正相关

我们做了 ChIP-seq 及 RNA-seq, 以检测 DNMT1 与 polII 在染色体上的结合, 及他们的结合与基因表达的关系。如果 DNMT1 与 polII 存在相互作用, 那么它们在染色体上的结合应该有很大的一致性。polII 的功能是进行基因转录, 那么我们可以推测, 它们的结合与基因表达成正相关, 即表达水平越高的基因, 这两种蛋白的结合信号越强。图 4 中, 我们选择了表达水平最高的 1000 个基因, 表达水平最低的 1000 个基因, 及表达水平处于中间的 1000 个基因, 来分析 DNMT1 与 polII 从基因上游 5 千个碱基到基因下游 5 千个碱基的结合情况。对于同一组内的 1 千个基因, 我们将信号进行平均。如图 4 所示, 在转录起始位点, 即 txStart, 这两种蛋白都有一个很高的峰, 证明在这里的结合很强。而且, 表达越高的基因, 这两种蛋白的结合就越强。图 5 中, 这两种蛋白在所有人类近 4 万个基因的结合都被显示出来。信号的强度用蓝色的深浅来表示。显示的区域为转录起始位点上下游 5 千个碱基。

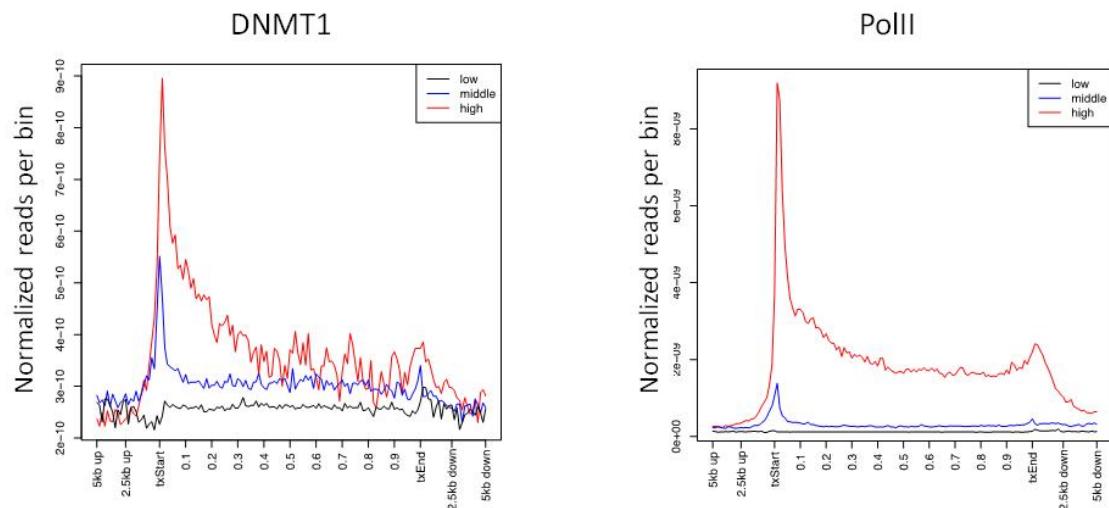


图 4. DNMT1 与 polIII 在染色体上的结合非常相似，而且都与基因表达正相关。high, middle, low 三组分别包括表达水平为高, 中, 低的 1 千个基因。基因上游 5kb 到转录起始位点 (txStart), 及转录终止位点 (txEnd) 到基因下游 5kb, 分别被切割为长度为 200bp 的 25 个 bin。基因内部从转录起始位点到转录终止位点, 被切割为等长的 100 个 bin。ChIP-seq 信号在每一组及每一 bin 内的数据被平均, 显示出来。

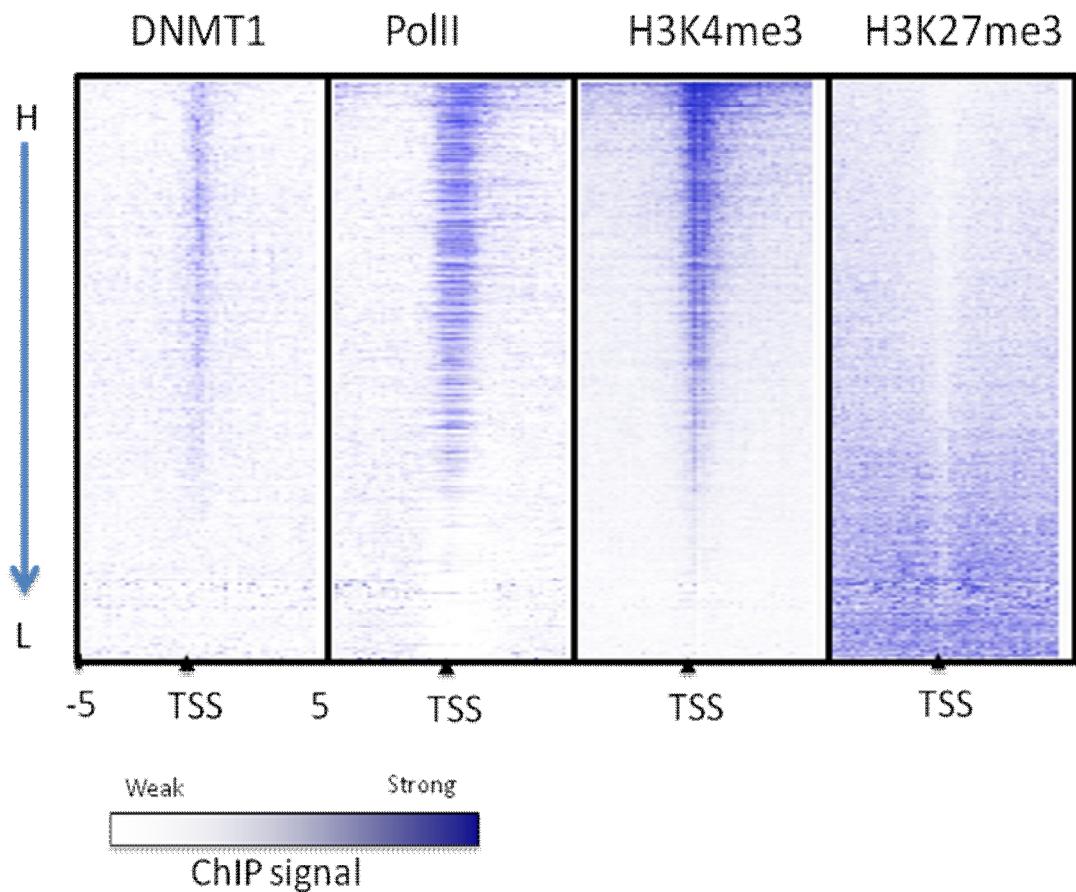




图 5. DNMT1 与 polIII 在所有基因启动子区域的结合情况。人类基因组内的所有基因按照其表达水平从高 (H) 到低 (L) 进行排序。基因转录起始位点 (TSS) 从上游 5kb 到下游 5kb 被分为 50 个等长的 bin。每一个基因在每一个 bin 内的 ChIP-seq 信号被加和在一起, 用蓝色的深浅来表示。作为对比, 激活性组蛋白修饰 H3K4me3 及抑制性组蛋白修饰 H3K27me3 的 ChIP-seq 结果也被显示出来。由上图可见, H3K4me3 的结合在 TSS 附近强, 在周围弱。而 H3K27me3 的结合在 TSS 附近弱, 而在周围强。这正好与它们的生物学功能相符。

1.3 基因内部 DNA 的甲基化水平与基因的表达水平呈正相关

利用 Lister 等发表的人脂肪干细胞 adipose 的甲基化组 BS-seq 及转录组 RNA-seq 的数据 (*Nature* 2009, 462:315-322), 我们分析了基因的甲基化与基因表达水平之间的关系。发现它们之间存在明显的正相关性, 尤其是在基因内部。这说明 polIII 确实可以将 DNMT1 带到基因区域。表达越高的基因, polIII 就越多, 被带来的 DNMT1 也就越多, DNA 甲基化水平就越高。

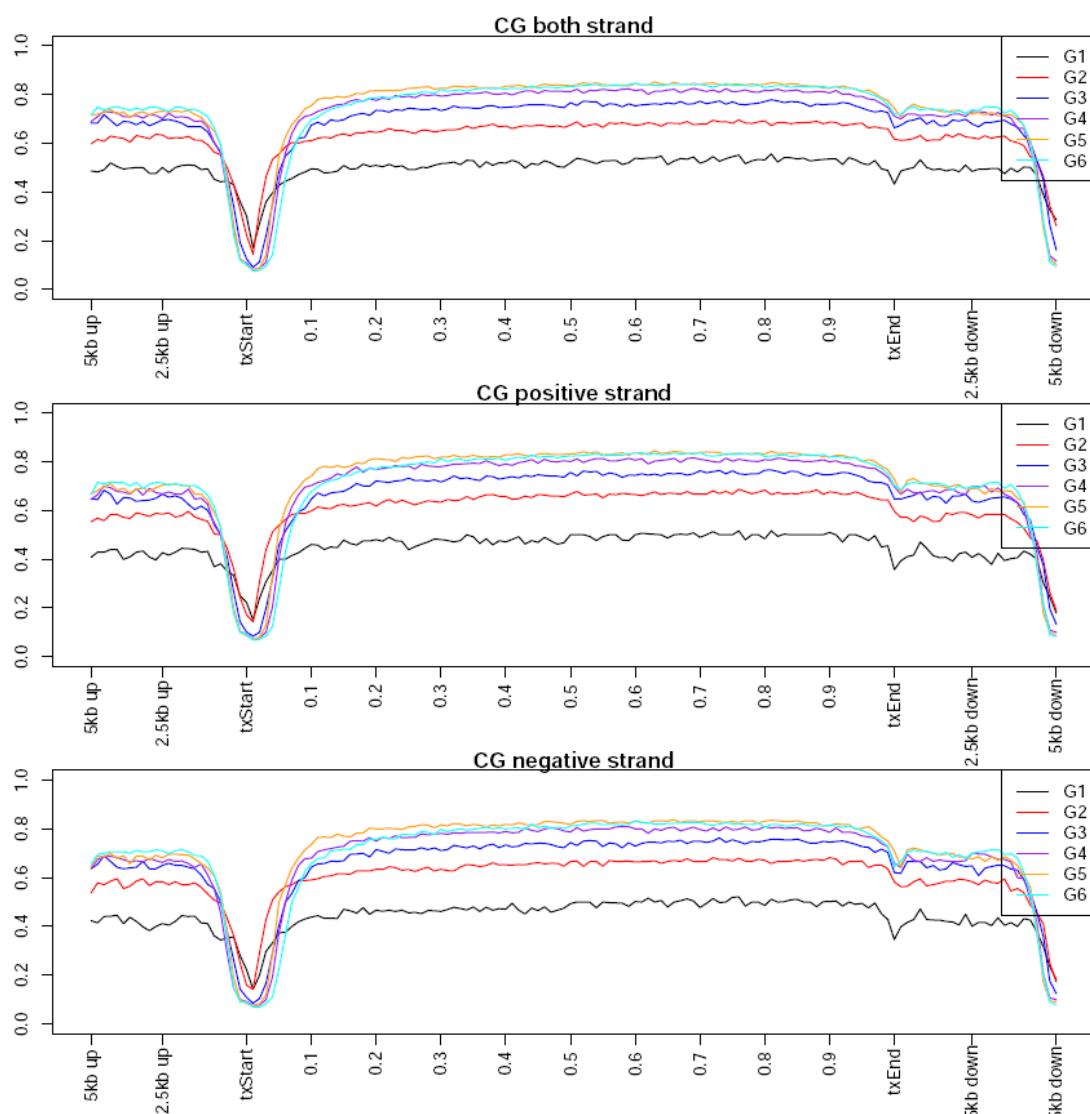




图 6. 基因内部 DNA 的甲基化水平与基因的表达水平呈正相关。整个基因组内的基因按照表达水平从低到高分为 6 个组, G1-G6。对于每一个组, 绘制 DNA 甲基化在基因周围的水平, 包括基因上游 5kb, 整个基因, 及基因下游 5kb。txStart: transcription startsite. txEnd: transcription end site。

1.4 转染 DNMT1 基因到 DNMT1^{-/-}小鼠胚胎干细胞, 能够恢复活跃转录基因内部(非启动子区域)的甲基化, 而沉默基因内部的甲基化则不能被恢复

为了进一步证明 polII 能够将 DNMT1 带到正在转录的基因区域, 我们对 DNMT1 基因敲除的小鼠胚胎干细胞进行了恢复实验。如果 DNMT1 确实是通过与 polII 结合而被带到基因区域, 那么转染 DNMT1 基因到 DNMT1^{-/-}细胞, 就能够恢复活跃转录基因的甲基化, 而不能恢复沉默基因的甲基化。我们选择了两个活跃转录的基因 alpha actin 与 nanog, 及一个沉默的基因 MyoD1。转染野生型的 DNMT1 基因(有甲基化活性), 1229 位氨基酸发生突变的基因(C1229W, 丧失活性), PBD 区域被删除得的基因(DNMT^{PBD}, 有部分活性)到 DNMT1^{-/-}细胞后 48 小时, 两个活跃转录基因的甲基化分别从 11.1% 恢复到了 55% (alpha actin), 从 17% 到 46.2% (nanog)。沉默基因的甲基化基本没有改变, 从 14.2% 变为 12%。这些检测选择的都是基因内部的区域。启动子区域由于在野生型细胞中甲基化水平也极低, 没用来做上述实验。

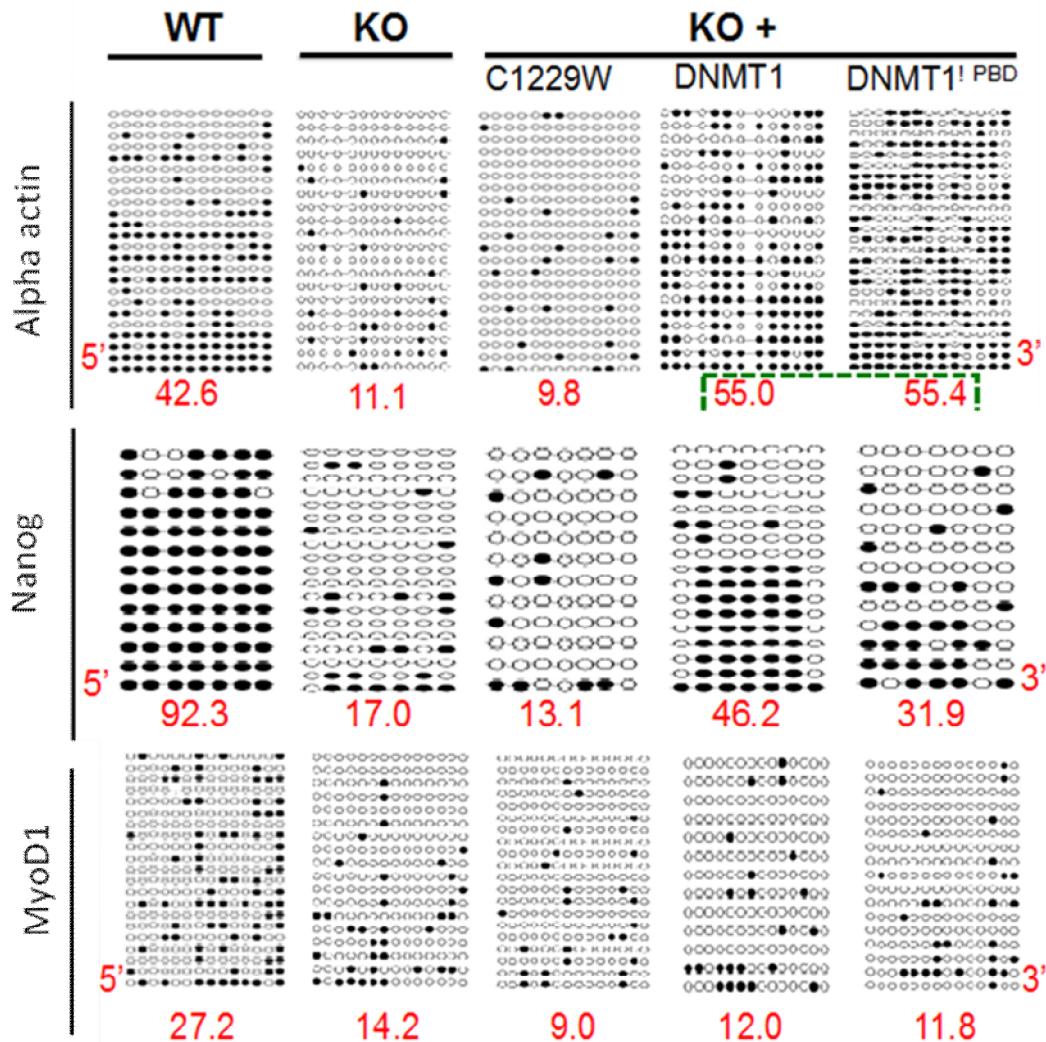


图 7. DNMT1 仅能够恢复活跃转录基因内部的甲基化。DNMT 的三个不同基因分别被转入 DNMT1 基因敲除细胞 (KO)。48 小时后, 用 BS-PCR 的方法检测三个基因 Alpha actin, Nanog, 及 MyoD1 的甲基化。一条线代表一个 sanger sequencing 的测序结果。一个圈代表一个 CpG 位点。黑圈表示甲基化, 白圈表示未甲基化。甲基化的总体水平用红色数字 (%) 在下方。

1.5 申请人对 BS-seq 测序库的构建及数据分析有丰富的经验

本申请人已经参与构建多个 BS-seq 的测序库。这些测序库都能够产生高质量的测序数据 (图 8)。而且本申请人还编写了一套用于 BS-seq 数据处理的程序。如“关键技术”部分所述, 我们编写的程序有很多优势, 其中最明显的一点是我们编写的程序利用了双端测序的特点, 能够对基因组的重复区域实现测序短片段的定位, 从而确定重复区域的甲基化状态。现在流行的其它的分析程序, 都难以实现这一点儿。如图 9所示, 在非重复的单一基因组序列区域, 我们的测序数据与其它已经发表的数据存在很大程度的一致性。但在重复序列区域, 如内源性逆转录病毒 LTR 区域, 我们的分析程序能够确定其甲基化状态, 而 Dirk 及 Weixie 等所用的程序则不能确定。事实上, 重复序列是人类及小



鼠基因组的重要组成部分，占整个基因组的 40%以上，在多方面如基因组稳定性等发挥重要作用。

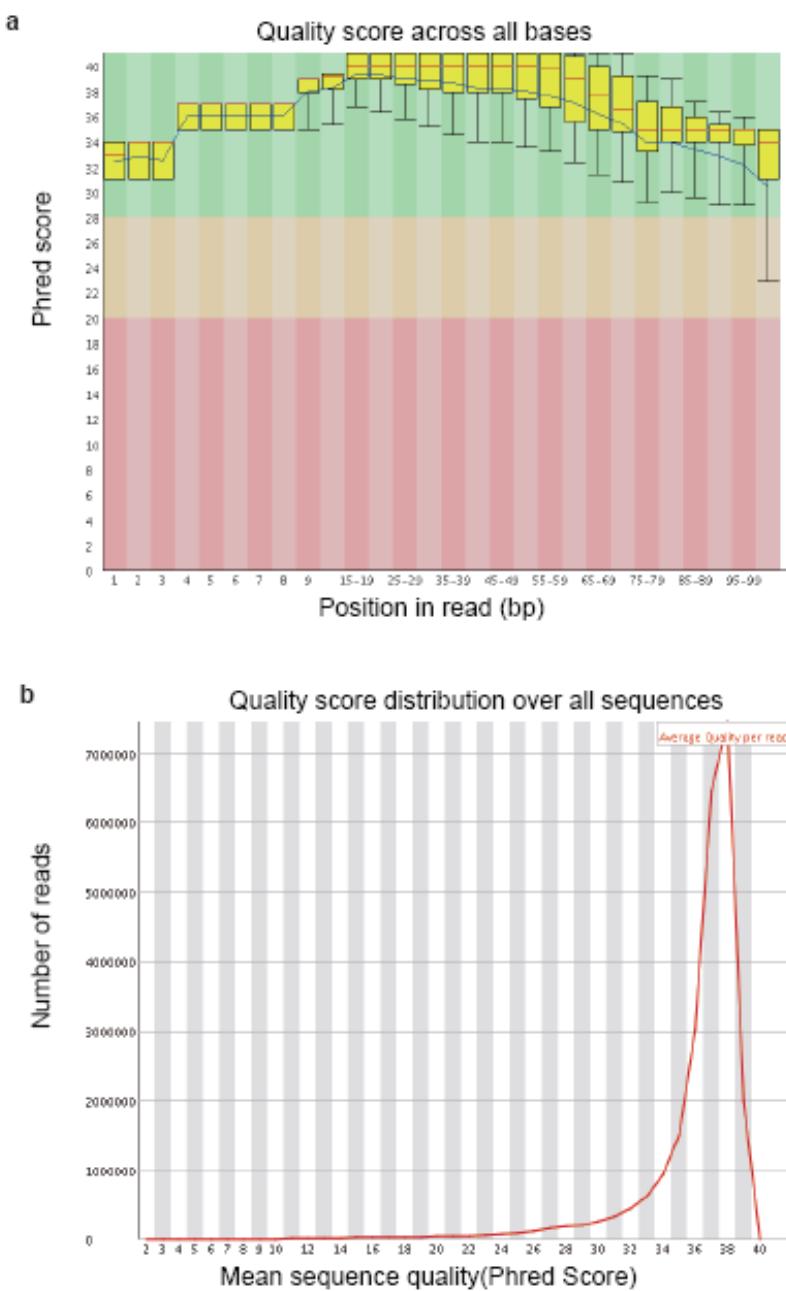


图 8. 我们构建好的 BS-seq 测序库，用 PE100(双端测序，每端测 100bp)的测序类型在 Illumina HiSeq2000 上完成序列测定。对产生的测序数据（保存于 fastq 文件中），我们用 Phred score 来进行质量评估。Phred score 是评估测序数据错误可能性的一个参数。该值越大，代表错误的可能性越小。Phred score 为 30 表示该位点产生测序错误的概率为 0.1%。a) 对于所有的测序片段，从第一个碱基到最后一个碱基(即第 100 个碱基)，绘制出每个位点的 box plot 图。b) 将每一个测序片段内 100 个碱基的 Phred score 值进行平均，作为该片段的值。然后对所有的测序片段，绘制组织分布图。

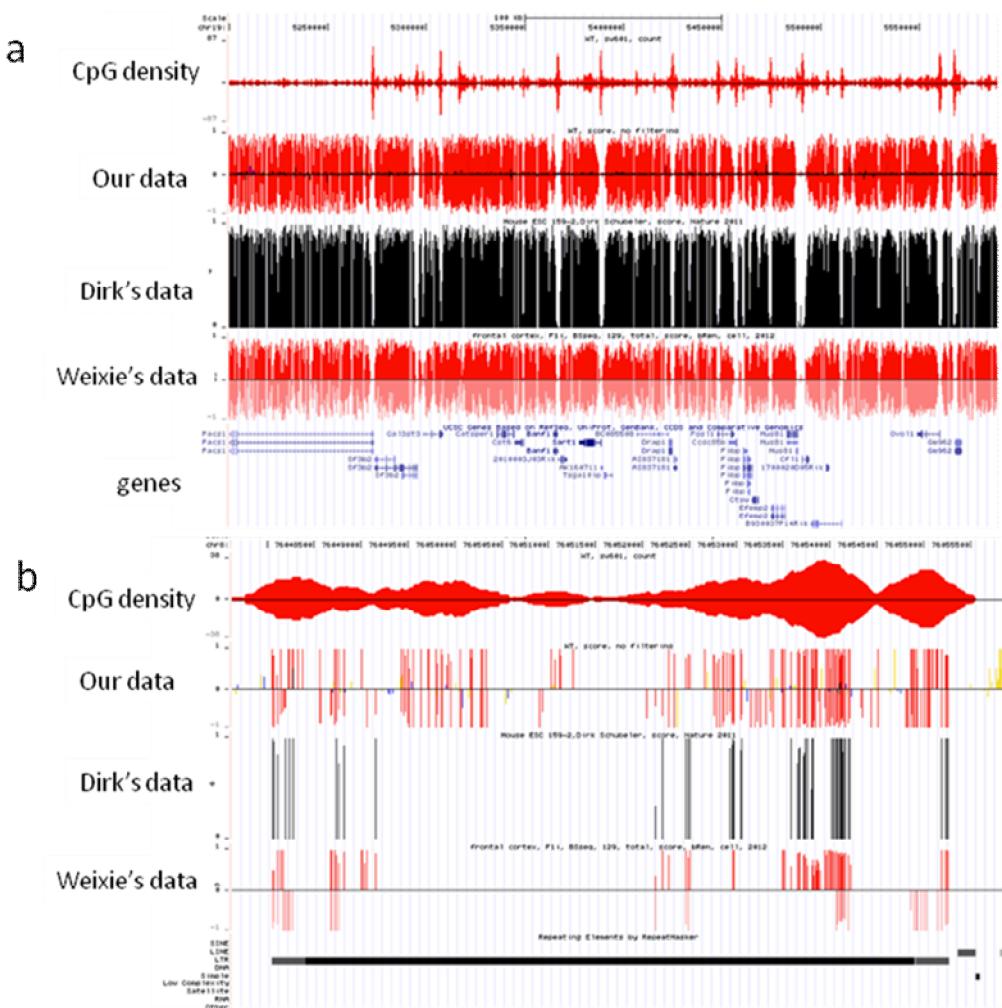


图 9. 我们的, Dirk 的(*Nature*, 2011, 480:490-495), 及 Weixie 的(*Cell*, 2012, 148:816-831)测序与算法的比较。我们的数据及 Dirk 的数据都由 BS-seq 方法产生自小鼠胚胎干细胞。Weixie 的数据产生自小鼠的大脑皮层细胞。我们的数据由我们自己编写的程序完成处理。该程序能够区分 DNA 甲基化是发生在正链或负链上。Dirk 的数据从 NCBI GEO 下载, 由他们的程序完成处理 (没有区分正负链)。Weixie 的数据也从 NCBI GEO 下载, 由他们运用 Novoalign 程序进行处理, 区分了正负链。图 a 显示在长达 500kb 的染色体区域内, 这三组数据有非常相似的结果。图 b 显示在 LTR(Long Terminal Repeat)重复序列区域, 我们的数据有很好的信号, Dirk 及 Weixie 的数据则基本上没有信号。

2. 工作条件 (包括已具备的实验条件, 尚缺少的实验条件和拟解决的途径, 包括利用国家实验室、国家重点实验室和部门重点实验室等研究基地的计划与落实情况);

本申请人所在的实验室隶属于大连医科大学肿瘤中心下的肿瘤干细胞研究院。该研究院实行 PI 制管理, 目前共有 PI 29 人, 其中全职 PI 14 人。这些 PI 均为博士, 具有长期的海外留学研究背景。每个 PI 都带领一个独立的实验室, 从不同的方向对肿瘤相关的基础及临床问题开展研究。这些相互交叉又相互补充的研究领域, 保证了本申请人及所领导的课题组能够在各方面得到很好的交流机会及相关支持。

肿瘤干细胞研究院建有公共平台, 包括公用仪器室、中心实验室、高技术实验室,



并与预防中心共同使用基因组测序平台，与临床治疗中心共同使用动物平台。所有部门实行仪器共享，技术共享，实验动物共享，共同为肿瘤中心的发展努力。

肿瘤干细胞研究院正在筹建基因组及个体化医疗中心（下称“基因组中心”）。该中心将主要利用各种基于深度测序的技术，如 RNA-seq, microRNA-seq, ChIP-seq, Mnase-seq, Genomic-seq, BS-seq 等，进行肿瘤生物学，遗传学，及表观遗传学的研究。各种构建测序库的仪器，已经购买，包括打断 DNA 成均一片段的仪器(Covaris S220)，检测待测序的核苷酸库的质量的仪器(Agilent Bioanalyzer)，对测序库进行精确定量的仪器(Life Technology StepOnePlus)，高灵敏定位及显示测序库中 DNA 片段的位置及强度的仪器(即凝胶成像仪，BioradGelDoc EZ)等。同时，研究院正在引进大型计算机及建设高性能计算机集群，以分析深度测序所产生的海量数据。

本实验室及基因组中心有多名生物信息学及计算机科学科研人员。这些人员有多年在 linux 环境下进行程序编写及数据处理的经验。对多种生物信息学程序，如 bowtie, BWA, SOAP, RUM, sam tools, bed tools, PiCard, UCSC genome browser 及相关的各种工具，都非常熟悉。另外，本实验室及基因组中心还有多名生物学科研人员。这些人员具有良好的操作能力和较高的理论水平，已经掌握了多项实验技术，如测序库构建、细胞培养、细胞增殖与凋亡的测定、免疫印迹法、蛋白质免疫共沉淀、荧光定量 qRT-PCR、免疫组化、流式细胞术和基因芯片等。这些人员及技术储备，能够保证本项目顺利完成。

3. 承担科研项目情况（申请人和项目组主要参与者正在承担的科研项目情况，包括国家自然科学基金的项目，要注明项目的名称和编号、经费来源、起止年月、与本项目的关系及负责的内容等）；

大连医科大学特聘教授引进启动基金，2013.09-2016.09，100 万，负责人

辽宁省高等学校“攀登学者”支持计划，2014.01-2016.12，150 万，负责人

4. 完成国家自然科学基金项目情况（对申请人负责的前一个已结题科学基金项目（项目名称及批准号）完成情况、后续研究进展及与本申请项目的关系加以详细说明。另附该已结题项目研究工作总结摘要（限 500 字）和相关成果的详细目录）。

无

（三）申请人和项目组主要参与者简介（在读研究生除外）。

1. 项目申请人简介

项目申请人姓名、工作单位及职称



李志广

大连医科大学，肿瘤干细胞研究院，教授

受教育经历

2004.07 - 2008.06	中科院生物物理所，感染与免疫中心，博士
1998.09 - 2001.07	复旦大学，生命科学学院，硕士
1994.09 - 1998.07	武汉大学，生命科学学院，学士

研究工作经历

2013.09 - 现在	大连医科大学，肿瘤干细胞研究院，教授
2011.05 - 2013.09	美国马里兰州约翰-霍普金斯大学，表观遗传学研究中心，博士后
2008.06 - 2011.05	美国阿肯色州国家毒理研究中心，遗传与分子毒理系，博士后
2003.04 - 2004.07	生物芯片北京国家工程研究中心，生物信息学科研人员
2002.11 - 2003.04	军事医学科学院，放射医学研究所，科研人员

申请人背景简介

申请人在肿瘤生物学及 DNA 甲基化领域从事多年研究，积累了丰富的科研经验及理论知识。申请人曾发现白细胞介素 IL-4 可以通过上调抗凋亡基因的表达而促进肿瘤生长；阐明了肿瘤排斥过程中 gamma 干扰素 IFNg 的细胞来源；证明了辅助性 T 淋巴细胞 Th17 能够促进 TPA/DMBA 诱导的肿瘤发生等。相关的研究成果发表在多个学术期刊上，如 *Cancer Research*, *Journal of Immunology*, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *Gene therapy*, *Journal of Immunotherapy*, *immunity* 等。在约翰-霍普金斯大学期间，申请人主要研究胚胎发育及肿瘤发生过程中的表观遗传学调控机制。利用各种深度测序技术包括 BS-seq、RNA-seq 及 ChIP-seq，申请人阐明了 3 种 DNA 甲基化酶 DNMT1、DNMT3a 与 DNMT3b，相互协同作用共同建立起细胞的正常甲基化模式的机制。一旦这种甲基化模式发生异常，肿瘤就有可能发生。相关成果曾于 2013 年 10 月份应邀在北京举行的第二届青年生物信息学科学家会议上做大会报告。文章正在投递当中。

除了生物学实验外，申请人还有丰富的数据分析经验。在美国国家毒理研究中心及约翰-霍普金斯大学从事研究的 5 年多时间，申请人分析了大量高密度基因芯片、PCR 芯片 (PCR array) 及深度测序所产生的数据，并用 python, R, awk, visual basic 等计算机语言编写了不同的数据分析程序及软件。研究成果发表在多种学术期刊，如 *BMC Bioinformatics*, *BMC Genomics*, *PloS One*, *Mutagenesis*, *Chemical Research in Toxicology*, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, *Nature Biotechnology* 等。另外，申请人还应 Springer 出版集团邀请撰写了其新书 *Next Generation Microarray Bioinformatics* 的一个章节，介绍高密度基因芯片的数据分析方法。这种生物学及生物信息学背景的有机结合，



使得申请人可以综合利用生物学及生物信息学的方法来解决本项目的问题。

申请人发表 SCI 论文 20 篇，总影响因子约为 120，累计被引用 400 余次。

目前申请人是大连医科大学全职教授，在大医从事肿瘤医学领域的教学及科研工作。在教学方面，申请人本学期承担一门本科生课程的讲授任务。在科研方面，申请人所领导的实验室已经初具规模，目前有一个副教授、两位讲师及一名研究生在实验室工作。各种仪器设备，如离心机、PCR 仪，细胞培养用的孵箱、超净工作台，还有二代测序用的 Covaris 超声仪、Illumina Miseq 都已经基本到位。现在，科研工作正在有条不紊地开展。本项目一旦批准，将能顺利实施，并确保圆满完成。

相关期刊论文

1. **Li Zhiguang**, Fuscoe JC, Chen T: MicroRNAs and their predicted target messenger RNAs are deregulated by exposure to a carcinogenic dose of comfrey in rat liver. Environmental and molecular mutagenesis 2011, 52(6):469-478.
2. **Li Zhiguang**, Branham WS, Dial SL, Wang Y, Guo L, Shi L, Chen T: Genomic analysis of microRNA time-course expression in liver of mice treated with genotoxic carcinogen N-ethyl-N-nitrosourea. BMC genomics 2010, 11:609.
3. **Li Zhiguang**, Su Z, Wen Z, Shi L, Chen T: Microarray platform consistency is revealed by biologically functional analysis of gene expression profiles. BMC bioinformatics 2009, 10 Suppl 11:S12.
4. **Li Zhiguang**, Chen L, Qin Z: Paradoxical roles of IL-4 in tumor immunity. Cellular & molecular immunology 2009, 6(6):415-422.
5. **Li Zhiguang**, Jiang J, Wang Z, Zhang J, Xiao M, Wang C, Lu Y, Qin Z: Endogenous interleukin-4 promotes tumor development by increasing tumor cell resistance to apoptosis. Cancer research 2008, 68(21):8687-8694.
6. **Li Zhiguang**, Pradera F, Kammertoens T, Li B, Liu S, Qin Z: Cross-talk between T cells and innate immune cells is crucial for IFN-gamma-dependent tumor rejection. J Immunol 2007, 179(3):1568-1576.
7. **Li Zhiguang**, Chen LY, Huang J, Qiao P, Qiu JM, Wang SQ: Quantification of the relative levels of wild-type and lamivudine-resistant mutant virus in serum of HBV-infected patients using microarray. Journal of viral hepatitis 2005, 12(2):168-175.
8. Meng F, Hackenberg M, **Li Zhiguang**, Yan J, Chen T: Discovery of novel microRNAs in rat kidney using next generation sequencing and microarray validation. PloS one 2012, 7(3):e34394.
9. Chen T, **Li Zhiguang**, Yan J, Yang X, Salminen W: MicroRNA expression profiles distinguish the carcinogenic effects of riddelliine in rat liver. Mutagenesis 2012, 27(1):59-66.
10. Zhang Y, Xu Y, **Li Zhiguang**, Chen T, Lantz SM, Howard PC, Paule MG, Slikker W, Jr., Watanabe F, Mustafa T et al: Mechanistic toxicity evaluation of uncoated and PEGylated single-walled carbon nanotubes in neuronal PC12 cells. ACS nano 2011, 5(9):7020-7033.
11. Su Z, **Li Zhiguang**, Chen T, Li QZ, Fang H, Ding D, Ge W, Ning B, Hong H, Perkins RG et al: Comparing next-generation sequencing and microarray technologies in a toxicological study of the effects of aristolochic acid on rat kidneys. Chemical research in toxicology 2011, 24(9):1486-1493.
12. Mahmood M, **Li Zhiguang**, Casciano D, Khodakovskaya MV, Chen T, Karmakar A, Dervishi E, Xu Y, Mustafa T, Watanabe F et al: Nanostructural materials increase mineralization in bone cells and affect



- gene expression through miRNA regulation. *Journal of cellular and molecular medicine* 2011, 15(11):2297-2306.
13. Chen D, **Li Zhiguang**, Chen T: Increased expression of miR-34a in mouse spleen one day after exposure to N-ethyl-N-nitrosourea. *Journal of applied toxicology : JAT* 2011, 31(5):496-498. [通讯作者]
14. Wang Z, Jiang J, **Li Zhiguang**, Zhang J, Wang H, Qin Z: A myeloid cell population induced by Freund adjuvant suppresses T-cell-mediated antitumor immunity. *J Immunother* 2010, 33(2):167-177.
15. Shi L, Campbell G, Jones WD, Campagne F, Wen Z, Walker SJ, Su Z, Chu TM, Goodsaid FM, Pusztai L, Shaughnessy JD, Jr., Oberthuer A, Thomas RS, Paules RS, Fielden M, Barlogie B, Chen W, Du P, Fischer M, Furlanello C, Gallas BD, Ge X, Megherbi DB, Symmans WF, Wang MD, Zhang J, Bitter H, Brors B, Bushel PR, Bylesjo M, Chen M, Cheng J, Cheng J, Chou J, Davison TS, Delorenzi M, Deng Y, Devanarayan V, Dix DJ, Dopazo J, Dorff KC, Elloumi F, Fan J, Fan S, Fan X, Fang H, Gonzaludo N, Hess KR, Hong H, Huan J, Irizarry RA, Judson R, Juraeva D, Lababidi S, Lambert CG, Li L, Li Y, Li Z, Lin SM, Liu G, Lobenhofer EK, Luo J, Luo W, McCall MN, Nikolsky Y, Pennello GA, Perkins RG, Philip R, Popovici V, Price ND, Qian F, Scherer A, Shi T, Shi W, Sung J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Thodima V, Trygg J, Vishnuvajjala L, Wang SJ, Wu J, Wu Y, Xie Q, Yousef WA, Zhang L, Zhang X, Zhong S, Zhou Y, Zhu S, Arasappan D, Bao W, Lucas AB, Berthold F, Brennan RJ, Buness A, Catalano JG, Chang C, Chen R, Cheng Y, Cui J, Czika W, Demichelis F, Deng X, Dosymbekov D, Eils R, Feng Y, Fostel J, Fulmer-Smentek S, Fuscoe JC, Gatto L, Ge W, Goldstein DR, Guo L, Halbert DN, Han J, Harris SC, Hatzis C, Herman D, Huang J, Jensen RV, Jiang R, Johnson CD, Jurman G, Kahlert Y, Khuder SA, Kohl M, Li J, Li L, Li M, Li QZ, Li S, **Li Zhiguang**, et al: The MicroArray Quality Control (MAQC)-II study of common practices for the development and validation of microarray-based predictive models. *Nature biotechnology* 2010, 28(8):827-838.
16. Ross JA, Blackman CF, Thai SF, **Li Zhiguang**, Kohan M, Jones CP, Chen T: A potential microRNA signature for tumorigenic conazoles in mouse liver. *Molecular carcinogenesis* 2010, 49(4):320-323.
17. Jiang J, Wang Z, **Li Zhiguang**, Zhang J, Wang C, Xu X, Qin Z: Early exposure of high-dose interleukin-4 to tumor stroma reverses myeloid cell-mediated T-cell suppression. *Gene therapy* 2010, 17(8):991-999.
18. Xiao M, Wang C, Zhang J, **Li Zhiguang**, Zhao X, Qin Z: IFNgamma promotes papilloma development by up-regulating Th17-associated inflammation. *Cancer research* 2009, 69(5):2010-2017.
19. Chen Z, Barbi J, Bu S, Yang HY, Li Z, Gao Y, Jinasena D, Fu J, Lin F, Chen C, Zhang J, Yu N, Li X, Shan Z, Nie J, Gao Z, Tian H, Li Y, Yao Z, Zheng Y, Park BV, Pan Z, Zhang J, Dang E, **Li Zhiguang**, Wang H, Luo W, Li L, Semenza GL, Zheng SG, Loser K, Tsun A, Greene MI, Pardoll DM, Pan F, Li B: The ubiquitin ligase stub1 negatively modulates regulatory T cell suppressive activity by promoting degradation of the transcription factor foxp3. *Immunity* 2013, 39(2):272-285.

应邀书籍章节

20. **Li Zhiguang**, Kwekel JC, Chen T: Functional comparison of microarray data across multiple platforms using the method of percentage of overlapping functions. *Methods Mol Biol* 2012, 802:123-139.

会议论文

1. **Li Zhiguang**, Shi, L., Pearce, M., Wang, Y. and Chen, T. (2009) MicroRNA expression can be significantly altered one day after carcinogen treatment. *The Toxicologist*, 108, 337-337. Annual meeting of SOT. Baltimore. USA



2. **Li Zhiguang**, Shi, L., Su, Z., Wen, Z. and Chen, T. (2009) Microarray platform consistency is revealed by biological functional analysis of gene expression profiles. *In Abstract collection, The Sixth Annual Conference of the MidSouth Computational Biology and Bioinformatics Society*, Starkville, MS, USA, February 20-21, 2009.
3. **Li Zhiguang** and Chen, T. (2009) Profiling Of microRNA expression in the livers of rats administrated with carcinogenic dose of comfrey. *In Abstract Book, The 27th Annual Meeting of South Central Chapter of the Society of Toxicology*, Shreveport, Louisiana, USA, October 8-9, 2009.
4. **Li Zhiguang**, Shi, L., Pearce, M. and Chen, T. (2008) MicroRNA expression profiles in kidneys of rats treated with human carcinogen aristolochic acid. *In Abstract collection, The SCC-SOT 2008 annual meeting*, Jefferson, AR, USA, September 18, 2008.
5. **Li Zhiguang** and Tao Chen. (2010) Human Carcinogen Aristolochic Acid Induces Dysregulated microRNA Expression in Rat Kidneys. *The 5th BioNanoTox and Applications Research Conference*. 5, 34-34. Little Rock, USA.
6. **Li Zhiguang**, Shi, L., Pearce, M., Wang, Y., Guo, L., Branham, W.S. and Chen, T. (2009) Time-course study of microRNA gene expression in liver of mice treated with one dose of N-ethyl-N-nitrosourea. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 50, 558-558. S.Louis, USA
7. Chen, D. and **Li Zhiguang**. Expression of miR-34a was Up-regulated by N-ethyl-N-nitrosourea in Mouse Spleen One Day after the Exposure. *5th BioNanoTox and Applications Research Conference*.. Little Rock, USA.
8. Chen, T. and **Li Zhiguang**. Transcriptome Analysis Gene Expression Profiles in Kidneys of Rats Treated with Aristolochic Acid. *5th BioNanoTox and Applications Research Conference*.. Little Rock, USA.
9. Su., Z., **Li Zhiguang**, Chen, T., Fang, H., Tong, W., Hong, H., Perkins, R. and Shi, L. (2010) Comparison of Next-Generation Sequencing (NGS) and microarrays for a rat toxicogenomics study. *In Abstract collection, The Seventh Annual Conference of the MidSouth Computational Biology and Bioinformatics Society*, Jonesboro, AR, February 20-21, 2010.
10. Chen, T., **Li Zhiguang**, Mei, N. and Guo, L. (2009) MicroRNA expression and genomic gene expression, rather than DNA adduct and mutation induction, indicate the carcinogenic tissue of aristolochic acid in rat. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 50, 547-547.
11. Chen, T., **Li Zhiguang** and Pearce, M. (2009) MicroRNA biomarkers for carcinogen aristolochic acid exposure in rats. *The Toxicologist*, 108, 149-149. Annual Meeting of SOT, Baltimore, USA
12. Chen, Y., **Li Zhiguang**, Chen, T. and Moore, M.M. (2009) Comparison of microRNA expression profiles from large and small colony Thymidine kinase mutants of L5178Y mouse lymphoma cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 50, 577-577.
13. Chen, Y., **Li Zhiguang**, Chen, T. and Moore, M.M. (2009) Comparison of microRNA expression profiles from large and small colony Thymidine kinase mutants of L5178Y mouse lymphoma cells. *In Abstract Book, The 27th Annual Meeting of South Central Chapter of the Society of Toxicology*, Shreveport, Louisiana, USA, October 8-9, 2009.
14. Chen, T., **Li Zhiguang** and Shi, L. (2008) Expressions of microRNAs, rno-miR-34a and rno-miR-21, and their target genes altered by human carcinogen aristolochic acid in rat kidney. *In FDA Bioinformatics Science Forum*, Silver Spring, MD, USA, Nov. 13, 2008.
15. Ross, J.A., Thai, S.-F., Kohan, M., Jones, C.P., Chen, T., **Li Zhiguang** and Blackman, C.F. (2009) A microRNA signature for tumorigenic conazoles in mouse liver. *In the Late Abstract Book of the 40th Annual Meeting of Environmental Mutagen Society*, St. Louis, Missouri, USA, October 24-28, 2009.



2. 项目组主要参与者简介

项目参与者姓名、工作单位及职称

吕德康

大连医科大学，肿瘤干细胞研究院，讲师

受教育经历

2006.09 - 2011.12 东北农业大学 生物信息学 博士

2002.09 - 2006.07 山东农业大学 计算机科学专业 学士

研究工作经历

2013.10 - 至今 大连医科大学肿瘤干细胞研究院 讲师

2012.06 - 2013.10 中科院上海生化细胞所 表观遗传学 博士后

相关期刊论文

1. De-Kang Lv, Xi Bai, Yong Li, Xiao-Dong Ding, Ying Ge, Hua Cai, Wei Ji, Nalahu Wu, Yan-Ming Zhu. Profiling of cold-stress-responsive miRNAs in rice by microarrays. *Gene*. 2010, 459(1-2):39-47 Cited by 23 SCI
2. De-Kang Lv, Ying Ge, Bei Jia, Xi Bai, Pei-Hua Bao, Yan-Ming Zhu. miR167c is induced by high alkaline stress and inhibits two auxin response factors in *Glycine soja*. *Journal of Plant Biology*. 2012, 55(5):373-380
3. Ying Ge, Yong Li, De-Kang Lv, Xi Bai, Wei Ji, Hua Cai, Ao-Xue Wang, Yan-Ming Zhu. Alkaline-stress response in *Glycine soja* leaf identifies specific transcription factors and ABA-mediated signaling factors. *Functional & Integrative Genomics*. 2011, 11(2):369-379
4. Peng Gao, Xi Bai, Liang Yang, De-kang Lv, Yong Li, Hua Cai, Wei Ji, Dianjing Guo. Over-expression of osa-MIR396c decreases salt and alkali stress tolerance. *Planta*. 2010, 231(5): 991-1001
5. Ying Ge, Yong Li, Yan-Ming Zhu, Xi Bai, De-Kang Lv, Dianjing Guo, Wei Ji, Hua Cai. Global transcriptome profiling of wild soybean (*Glycine soja*) roots under NaHCO₃ treatment. *BMC Plant Biology*. 2010, 10:153. Biomed Center highly accessed

项目参与者姓名、工作单位及职称

张霞

大连医科大学，肿瘤干细胞研究院，讲师

受教育经历

2006.09 - 2013.01 中国科学院植物研究所 发育生物学专业 博士

2001.09 - 2005.07 内蒙古大学生命科学院生物基地班 学士

研究工作经历

2013.06 - 至今 大连医科大学肿瘤干细胞研究院 讲师

相关期刊论文

1. Zhang Xia, Wei L, Wang Z, Wang T. (2013) Physiological and molecular features of *Puccinellia tenuiflora* tolerating salt and alkaline-salt stress. *J. Integr. Plant Biol.* 55(3), 262–276



(四) 经费申请说明 购置单项经费 5 万元以上固定资产及设备等，须逐项说明与项目研究的直接相关性及必要性。

1. 科研业务费 35 万

- A. 测试分析费：HiSeq2000/2500 上的深度测序费用。BS-seq 测序，15 万；RNA-seq, 10 万；ChIP-seq, 5 万。共 30 万。
- B. 能源动力费：1 万。
- C. 会议差旅费：参加国内国际学术会议 2-3 次，共 2 万元。
- D. 出版、文献检索发表费：2 万元。

2. 实验材料费 25 万

- A. Illumina TruSeq 试剂盒，包括用于构建 BS-seq 测序库及 RNA-seq 测序库的试剂盒：6 万。
- B. 构建突变载体的各种分子生物试剂：1 万。
- C. 提取基因组 DNA 及细胞 RNA 的试剂盒：1 万。
- D. 做蛋白质免疫共沉淀及染色体沉淀的抗体及磁珠等：4 万。
- E. 打断 DNA 及染色体成均一片断的 covaris 的样品瓶，分析测序库质量的 bioAnalyzer 的 chip，对测序库进行定量的 Qbit 的 kit 及 Illumina 的 qPCR kit：5 万。
- F. 培养小鼠胚胎干细胞所需的胎牛血清、培养基、移液管等：8 万。

3. 仪器设备费 4.5 万

购买微量加样器 三套(3 万)，电动移液器 4 支(1.5 万)等。

4. 实验室改装费 4 万

对细胞间，及存放大型计算机的房间进行简单改装的费用：4 万。

5. 协作费 4 万

同 Johns Hopkins 的表观遗传学中心，及其它深度测序中心进行合作的费用：4 万。

6. 国际合作与交流费 7 万

2-3 名项目组成员出国交流，3 万。邀请 2-4 名境外知名专家来华交流，4 万。

7. 劳务费 8 万元

用于支付研究生科研劳务费。



8. 管理费 4.6 万元

按申请经费的 5%由单位扣除。

申请经费合计 92 万。

(五) 其他需要说明的问题

无

(六) 附件清单

1. 三篇代表性论文首页

- A. *Cancer Research* 上关于白细胞介素 4 促进肿瘤发生机制研究的论文（附件 1）。
- B. *Journal of Immunology* 上关于 gamma 干扰素来源及引起肿瘤排斥机理研究的论文（附件 2）。
- C. *BMC Genomics* 上关于化合物致癌化合物 ENU 通过 microRNA 引起 DNA 损伤及肿瘤研究的论文（附件 3）。

2. 三次大会学术报告的邀请函

- A. 2010 年在美国 Little Rock 举行的第五届 *BioNanoTox* 学术年会大会报告邀请函（附件 4）。
- B. 2009 年在美国 Salt Lake city 举行的第 49 届 *SOT* 学术年会大会报告邀请函（附件 5）。
- C. 2009 年在美国 St.Louis 举行的第 40 届 *EMS* 学术年会大会报告邀请函（附件 6）。

3. 三个学术杂志审稿人的邀请函

- A. 英国学术杂志 *Bioinformatics* 邀请作为该杂志社审稿人的信函（附件 7）。
- B. 美国学术杂志 *BioTechniques* 邀请作为该杂志社审稿人的信函（附件 8）。
- C. 英国学术杂志 *Journal of Translational Medicine* 邀请作为该杂志社审稿人的信函（附件 9）。



附件 1. *Cancer Research* 上关于白细胞介素 4 促进肿瘤发生机制研究的论文

Research Article

Endogenous Interleukin-4 Promotes Tumor Development by Increasing Tumor Cell Resistance to Apoptosis

Zhiguang Li,^{1,2,3} Jing Jiang,^{1,2,3} Zibing Wang,^{1,2,3} Jinhua Zhang,^{1,2} Mingjie Xiao,^{1,2,3} Chunhui Wang,^{1,2,3} Yu Lu,^{1,2,3} and Zhihai Qin^{1,2}

National Laboratory of Biomacromolecules, ²Chinese Academy of Sciences–University of Tokyo Joint Laboratory of Structural Virology and Immunology, and Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Institute of Biophysics, Beijing, China

Abstract

The increase of interleukin-4 (IL-4) level in tumor environment and the up-regulation of IL-4 receptor (IL-4R) on tumor cells have been long observed. However, their significance for tumor development has not been investigated. Here, we found that endogenous IL-4 promotes tumor growth because neutralizing IL-4 by 11B11 monoclonal antibody (mAb) significantly delayed the growth of MCA205 fibrosarcoma. We also observed that tumor cells with higher IL-4R expression have more chances to survive in immunocompetent mice. To investigate how endogenous IL-4 influences tumor growth, we established a pair of tumor cells with or without IL-4R expression from the common parental cells. IL-4R-competent tumors exhibit increased growth compared with its IL-4R-deficient counterparts when inoculated into syngeneic mice. This growth advantage was still kept in IL-4R knockout mice but was abrogated in mice given i.p. with IL-4 neutralizing mAb. *In vitro* analyses indicate that IL-4 neither affects the proliferation of tumor cells nor changes the expression of several immune-related molecules, such as MHC-I, Fas, and B7-H3. Nonetheless, IL-4 up-regulates anti-apoptotic gene expression in tumor cells and reduces apoptosis of tumor cells *in vivo*, as evidenced by real-time PCR, immunoblotting, and TUNEL staining. These findings were helpful to understand the long clinical observation and revealed that endogenous IL-4, the product of host immune response, can be used by tumor cells to facilitate their growth. [Cancer Res 2008;68(21):8687–94]

Introduction

The close correlation between interleukin-4 (IL-4) and tumor progression has been observed in plenty of studies (1). In most tested patients with cancers as diverse as prostate cancer (2), breast cancer (3), renal cell cancer (4), non-small cell lung cancer (5), and other tumor types (1), the augmented IL-4-producing activity of such immune cells as peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) have been detected using reverse transcription–PCR (RT-PCR), ELISA, or flow cytometry. Onishi and colleagues further showed that the IL-4 level correlates the stage and grade of renal cell carcinoma (4). Successful therapy of cancers, such as surgical excision of digestive

cancer (6), immunotherapy of ovary cancer with tumor vaccine (7), or treating bladder cancer patients with BCG + IFN- α (8), reduced tumor burden and, meanwhile, substantially decreased IL-4 expression of PBMC and/or TIL in cancer patients. Studies using high metastatic tumor B16F10 and its low metastatic counterpart B16F1 also showed that IL-4 promotes tumor metastasis (9). Neutralization of IL-4 abolished B16F10 metastatic ability, and injection of IL-4 promotes the metastasis of B16F1 (9).

Besides the increased IL-4 expression in cancer patients, the elevated amount of IL-4 receptor (IL-4R) has also been detected on various tumor cells using ^{125}I -IL-4 binding assay or flow cytometry, including renal cell carcinoma (10), malignant melanoma (11), glioblastoma (12), head and neck cancer (13), etc., which usually express 1,000 to 13,000 IL-4R molecules per cell with variations depending on the tumor types, whereas much lower number of IL-4R, ranging about <50 to 500 molecules per cell, is present in such normal cells as B cells (14), endothelial cells (15), and monocytes (16). Moreover, the binding affinity of IL-4R on tumor cells is increased compared with those on normal cells (17). To show the expression of IL-4R *in situ*, Kawakami and colleagues analyzed lung cancer samples from 54 patients using tissue array. They found that 66% to 79% samples represented increased IL-4R expression compared with normal lung tissue (18). Additionally, high IL-4R expression was also detected on the tissue sections of bladder, breast, and prostate cancers (19).

The augmented IL-4-producing activity of immune cells in cancer patients and the increased IL-4R expression on tumor cells indicate that IL-4 may play a crucial role during tumor progression. However, whether IL-4 truly influences tumor growth *in vivo* and especially whether IL-4 exerts direct effects on tumor cells still remain elusive at present. Some studies tried to address this question by detecting the changes of tumor cells cultured with or without IL-4 (10, 19–23). Nonetheless, all of these were conducted *in vitro* and could not reveal the true scenario *in vivo*, in which a far more complicated regulatory network involving different molecules, cells, and the interaction between them is operating.

To make possible the investigation of IL-4 effects on tumor cells *in vivo*, we established a pair of tumor cells with or without IL-4-responsiveness, which are completely identical, except for the expression of IL-4R. We found that endogenous IL-4 can directly act on tumor cells, increasing their resistance to apoptosis and accelerating tumor growth. These findings shed light on the molecular mechanisms controlling tumor development and are helpful for designing novel therapeutic strategies.

Materials and Methods

Mice. BALB/c and C57BL/6 mice were purchased from Weitonglihua Corporation. IL-4R knockout ($\text{IL-4R}^{-/-}$) mice on the BALB/c background were obtained from Max Delbrück Center for Molecular Medicine and

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

Z. Li and J. Jiang contributed equally to this work.

Requests for reprints: Zhihai Qin, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, 15 Datun Road, Beijing 100101, China. Phone: 86-10-64888435; Fax: 86-10-6484257; E-mail: zhihai@ibp.ac.cn.

© 2008 American Association for Cancer Research.
doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0449

www.aacrjournals.org

8687

Cancer Res 2008; 68: (21). November 1, 2008



附件 2. *Journal of Immunology* 上关于 gamma 干扰素来源及引起肿瘤排斥机理研究的论文

The Journal of Immunology

Cross-Talk between T Cells and Innate Immune Cells Is Crucial for IFN- γ -Dependent Tumor Rejection¹

Zhiguang Li,* Felicia Pradera,[†] Thomas Kammerhoens,[†] Bing Li,* Shubai Liu,* and Zhihai Qin^{2,*†}

Though the importance of IFN- γ in tumor immunity has been well-demonstrated, little is known about its source and how it is induced. By using various bone marrow chimeric mice, we show here that IFN- γ essential for tumor immunity is solely produced by hemopoietic cells. Surprisingly, IFN- γ derived from T cells was not necessary for tumor immunity in this model. In the immunized mice, in which only innate immune cells have the IFN- γ -producing potential, tumors were efficiently rejected. The innate immune cells, such as NK1.1⁺ cells and CD11b⁺ cells, can provide sufficient amounts of IFN- γ which requires, however, the help of T cells. The close cooperation between T cells and innate immune cells during tumor regression is likely mediated by IL-2. Together, our results clearly illustrate how T cells cooperate with innate immune cells for IFN- γ -mediated tumor rejection and this may have important indications for clinical trials of tumor immunotherapy. *The Journal of Immunology*, 2007, 179: 1568–1576.

The crucial role of IFN- γ in tumor immunity has been demonstrated in different models (1–3). IFN- γ knockout or IFN- γ receptor knockout mice exhibit severely impaired antitumor capability (4, 5). Tumor cells genetically modified to secrete IFN- γ are often rejected (6, 7). Neutralization of IFN- γ by mAb leads to tumor outgrowth (8, 9). Plenty of studies have been conducted to dissect the mechanism by which IFN- γ mediates tumor rejection. For example, IFN- γ can act on various immune cells, such as NK cells, macrophages, neutrophils, and T lymphocytes, increasing their tumoral activities and promoting the cytokine release from these cells (1, 2). IFN- γ can also act on the vasculature which is crucial for tumor growth, either inhibiting tumor-induced angiogenesis (5, 10–12) or destroying established tumor-associated blood vessels (13). Moreover, IFN- γ can act directly on tumor cells, up-regulating the MHC class I expression and thereby increasing tumor cell recognition and killing by CTL, and in some cases promoting the antiproliferative and proapoptotic effects on tumor cells (1). In contrast to extensive studies of the mechanism by which IFN- γ acts for tumor immunity, little is known about its source and how it is induced during tumor rejection.

Activated T cells are often considered an important and necessary IFN- γ producer for tumor immunity (1). The evidence comes

mainly from adoptive T cell transfer experiments. T cells with IFN- γ -producing ability, detected *in vitro* upon stimulation with specific tumor Ags, can mediate tumor regression when adoptively transferred into tumor-bearing mice. In contrast, T cells exhibiting poor IFN- γ -producing ability cannot mediate tumor regression (14, 15). This concept, however, has been challenged recently by other experiments showing that IFN- γ -deficient T cells could specifically eradicate established pulmonary metastasis when transferred into tumor-bearing mice (16–18). Gattinoni et al. (19) have even reported that more differentiated T cells with greater IFN- γ production ability were less effective for tumor treatment. Except for the discrepancy, due possibly to the tumor or animal models used, all of the results are based on adoptive transfer experiments which have several obvious defects: T cells are usually activated *in vitro*, infused in an unreasonably large number (often $>10^7$) into the tumor-bearing mice; the establishment of the balance between tumor cells and their environment cannot be as ideal as it was in reality; and more seriously, the contribution of IFN- γ produced by endogenous T cells of recipient mice cannot be excluded. Therefore, the role of T cell-derived IFN- γ in tumor immunity remains unclear at present, though the IFN- γ -secreting ability is often used as one of the important criteria to select T cells for adoptive immunotherapy of tumors (20).

Besides conventional $\alpha\beta$ T lymphocytes, $\gamma\delta$ T cells (21), NK cells (1), B cells (22), macrophages (23), dendritic cells (24), and even nonhemopoietic fibroblasts (25, 26) have been shown to be able to produce IFN- γ *in vitro* upon proper stimulation. The contribution of IFN- γ from these cells in the generation of tumor immunity has been implied in several studies. Rag2^{−/−} STAT1^{−/−} mice, compared with Rag2^{+/+} mice, were more susceptible to methylcholanthrene-induced tumorigenesis, suggesting that IFN- γ derived from innate immune cells contributes to the inhibition of tumor incidence (27). Recently, Gao et al. (28) showed that $\gamma\delta$ T cells could be a crucial early source of IFN- γ in primary carcinogenesis model. NK cells and NKT cells were shown to play important roles in α -galactosylceramide-mediated inhibition of tumor growth by secreting copious amounts of IFN- γ (29). A recently identified dendritic cell subset which is B220⁺ NK1.1⁺ and can secrete high levels of IFN- γ upon contact with a variety of

*National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China; and [†]Institute of Immunology, Campus Benjamin Franklin, Charite, Berlin, Germany

Received for publication November 8, 2006. Accepted for publication February 16, 2007.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹This work was supported by grants of the Chinese Academy of Sciences (to Z.Q.), the National Natural Science Foundation of China (30471571, 30530330), the Ministry of Science and Technology of China (863-2006AA02ZAB9, 973-2006CB504304, and 2006CB910901), and Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB506, RI).

²Address correspondence and reprint requests to Dr. Zhihai Qin, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, 15 Datun Road, Chaoyang District, Beijing 100101, China. E-mail address: zhihai@ibp.ac.cn

Copyright © 2007 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/07/\$2.00

www.jimmunol.org



附件 3. BMC Genomics 上关于化合物致癌化合物 ENU 通过 microRNA 引起 DNA 损伤及肿瘤研究的论文

Li et al. BMC Genomics 2010, 11:609
<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/609>



RESEARCH ARTICLE **Open Access**

Genomic analysis of microRNA time-course expression in liver of mice treated with genotoxic carcinogen *N*-ethyl-*N*-nitrosourea

Zhiguang Li¹, William S Branham², Stacey L Dial¹, Yexun Wang³, Lei Guo⁴, Leming Shi², Tao Chen^{1*}

Abstract

Background: Dysregulated expression of microRNAs (miRNAs) has been previously observed in human cancer tissues and shown promise in defining tumor status. However, there is little information as to if or when expression changes of miRNAs occur in normal tissues after carcinogen exposure.

Results: To explore the possible time-course changes of miRNA expression induced by a carcinogen, we treated mice with one dose of 120 mg/kg *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU), a model genotoxic carcinogen, and vehicle control. The miRNA expression profiles were assessed in the mouse livers in a time-course design. miRNAs were isolated from the livers at days 1, 3, 7, 15, 30 and 120 after the treatment and their expression was determined using a miRNA PCR Array. Principal component analysis of the miRNA expression profiles showed that miRNA expression at post-treatment days (PTDs) 7 and 15 were different from those at the other time points and the control. The number of differentially expressed miRNAs (DEMs) changed over time (3, 5, 14, 32, 5 and 5 at PTDs 1, 3, 7, 15, 30 and 120, respectively). The magnitude of the expression change varied with time with the highest changes at PTDs 7 or 15 for most of the DEMs. In silico functional analysis of the DEMs at PTDs 7 and 15 indicated that the major functions of these ENU-induced DEMs were associated with DNA damage, DNA repair, apoptosis and other processes related to carcinogenesis.

Conclusion: Our results showed that many miRNAs changed their expression to respond the exposure of the genotoxic carcinogen ENU and the number and magnitude of the changes were highest at PTDs 7 to 15. Thus, one to two weeks after the exposure is the best time for miRNA expression sampling.

Background
MicroRNA (miRNA) is a class of small nucleic acids that negatively regulate gene expression [1]. They are single-stranded RNA molecules that are not translated into proteins. Each miRNA molecule is partially complementary to one or more mRNA transcripts, and functions to down-regulate gene expression by inhibiting protein translation or destabilizing target transcripts [2]. The expression of miRNAs is regulated developmentally and spatially, and is involved in differentiation and proliferation of cells [3]. Therefore, miRNA molecules can modulate a wide array of growth and differentiation processes in cancer [4]. A number of studies have demonstrated that miRNA expression is commonly dysregulated in human cancer; and that miRNAs are extensively involved in carcinogenesis and act as either dominant or recessive cancer genes [5]. miRNA expression profiling has shown promise in defining tumor malignancy status and is surprisingly informative when used to identify tumor types, differentiation states and developmental lineages [6].

The available information on miRNA function suggests that miRNA expression profiles might also have predictive value for assessing chemical carcinogenicity. It has been reported that expression of some miRNAs is associated with tumor initiation [7]. Thus, specific miRNAs could represent attractive molecules as informative biomarkers of exposure to carcinogens. Studies on the relationship between miRNAs and carcinogen exposure have been previously reported [8] and miRNA expression has been shown to be dysregulated by many carcinogenic agents like 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) [9], 7,12-dimethylbenz[a]anthracene [10],

* Correspondence: tao.chen@fda.hhs.gov
Division of Genetic and Molecular Toxicology, National Center for Toxicological Research, FDA, Jefferson, AR 72079, USA
Full list of author information is available at the end of the article

 © 2010 Li et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



附件 4. 2010 年在美国 Little Rock 举行的第五届 BioNanoTox 学术年会大会报告邀请函

BNT
BioNanoTox
International

University of Arkansas at Little Rock
Little Rock, Arkansas, USA



October 22nd, 2010

Dear Dr. Dr Zhiguang (David) Li,

We are delighted to inform you that your abstract entitled "**Human Carcinogen Aristolochic Acid Induces Dysregulated microRNA Expression in Rat Kidneys**" has been selected for an oral presentation on November 4th, 2010. The 5th BioNano Tox will be held at the Peabody Little Rock Hotel, Little Rock, Arkansas, USA, on November 4-5th, 2010. BioNano Tox is worthy opportunity for established scientists, students, postdoctoral scientists from diverse scientific disciplines and business oriented people.

Important Dates:

September 1- November 4, 2010 - Late registration starts
October 15, 2010 - Registration as well as abstract and research article submission closes
November 4-5, 2010 - BioNanoTox Conference

LOCATION: Peabody Little Rock Hotel (Pinnacle Room) www.peabodylittlerock.com/
9:00 am- 5:00pm, on November 4-5, 2010.
PARKING: Park at the "2nd at Main Public Parking" parking deck

PAPER ID: 2010-6
TITLE: "Human Carcinogen Aristolochic Acid Induces Dysregulated microRNA Expression in Rat Kidneys."
AUTHORS: **Zhiguang Li** and Tao Chen.
AFFILIATION: Division of Genetic and Molecular Toxicology, National Center for Toxicological Research, US Food and Drug Administration, Jefferson, Arkansas, USA
PRESENTATION FORMAT: oral
DATE: November 4th, 2010

REGISTRATION AND PAYMENT: Your record showed that you did not pay your registration fee. Please permit the payment of the invoice # 0000036 for your registration / membership.

HOUSING: Peabody Little Rock Hotel, Little Rock, Arkansas, USA.

RECEPTION: You are also invited to the Reception held November 4th, 2010 from 6:00 pm to 8:00 pm. Tickets for accompanying guests are available for \$49.99 payable in cash or personal checks.

POSTER AWARDS: Prizes will be awarded during the reception to the top student posters on November 4, 2010 from 6:00 pm to 8:00 pm.

Thanking you in advance, we are looking forward to receive your article soon.

Sincerely yours,

Olga Tarasenko
Olga Tarasenko, M.D., Ph.D.,
Founder and Co-Chair
University of Arkansas at Little Rock, AR

Parimal Chowdhury
Parimal Chowdhury, Ph.D.
Co-Chair, University of Arkansas
for Medical Sciences, AR

UAMS
UNIVERSITY OF ARKANSAS
FOR MEDICAL SCIENCES

BioNanoTox International, Dept. of Biology, FH406, University of Arkansas at Little Rock, 2801, S. University Ave., Little Rock, AR 72204
Phone: 501-569-3270, Fax: 501-569-3271; E-mail: bionanotox@gmail.com; <http://sites.google.com/site/bntconference>



附件 5. 2009 年在美国 Salt Lake city 举行的第 49 届 SOT 学术年会大会报告邀请函

Li, Zhiguang*

From: nichelle@toxicology.org
Sent: Wednesday, December 02, 2009 4:37 PM
To: Li, Zhiguang*
Subject: SOT Abstract Acceptance - Poster Presentation

To: **Zhiguang Li**
From: Michael Holsapple, Scientific Program Committee Chair
Date: December 2, 2009

Congratulations! You are the designated contact person for the abstract listed below, which has been accepted for a poster presentation at the 49th Annual Meeting of the Society of Toxicology, March 7-11, 2010 at the Salt Palace Convention Center in Salt Lake City, Utah.

Please note the following important information about your presentation:

Presenters should display posters only on the assigned date and time, which is listed below in this confirmation. Diagrams of the poster session layouts, for both morning and afternoon sessions, will be included in the Final Program. These diagrams will note the abstract final ID number followed by the poster board number. Your poster board number follows the abstract final ID number below.

ABSTRACT INFORMATION:

Abstract Number/Poster Board number: 1703 Poster Board -606

Abstract Title: Genotoxicity of nanosilver in mouse lymphoma cells

Presenting Author: Tao Chen

Session Title: Nanotoxicology - Gold or Silver Nanoparticles

Presentation Date & Time: March 10, 2010 from 9:00 AM to 12:30 PM

Presentation Location: Exhibit Hall

As the contact person, you are the only person who will receive this notification of abstract acceptance. If you are not the presenter, it is important to provide this information to the person who will present this scientific research. Instructions for preparing a poster presentation can be found on the SOT Web site at <http://www.toxicology.org/AI/MEET/AM2010/present.asp>.

If circumstances prevent attendance, the presenting author must arrange for the paper to be given by a substitute. Once in Salt Lake City, if the assigned presenter cannot attend his/her session, the presenter must leave a message in the SOT office at the convention center explaining the problem.

Please note that the Plenary Lecture begins at 8:00 AM on Monday, March 8 and ends at 9:00 AM. The scientific sessions begin at 9:15 AM on Monday and end at 12:00 Noon. For the remainder of the week, scientific sessions will begin at 9:00 AM and end at 11:45 AM and from 1:30 PM to 4:15 PM. The meeting will conclude at 12:00 Noon on Thursday, March 11. Please review your Preliminary Program for the start times of other sessions that begin before 9:00 AM and after 4:15 PM.

The poster sessions will follow the schedule listed below for the 2010 SOT Annual Meeting:

Monday Morning	9:30 AM ? 12:30 PM
Monday - Wednesday Afternoon	1:00 PM ? 4:30 PM
Tuesday and Wednesday Morning	9:00 AM ? 12:30 PM
Thursday Morning	8:30 AM ? 12 Noon

附件 6. 2009 年在美国 St.Louis 举行的第 40 届 EMS 学术年会大会报告邀请函

Dear Colleague:

Page 1 of 2

Li, Zhiguang*

From: EMSHQ [emshq@ems-us.org]
Sent: Wednesday, July 01, 2009 2:42 PM
To: Li, Zhiguang*
Subject: Abstract Acceptance Notification – EMS 2009 Annual Meeting

Dear Colleague:

Congratulations, your abstract, entitled "Time-Course Study of MicroRNA Gene Expression in Liver of Mice Treated With One Dose of N-ethyl-N-nitrosourea," has been selected for two presentations at the EMS 40th Annual Meeting in St. Louis.

1. A Platform presentation in Platform Session 2 on Monday, October 26, 2009 at 3:15 PM . 4:30 PM. Your presentation number is 6. You are allotted 12 minutes for your presentation, 2 minutes for questions and 1 minute to switch between speakers (total, 15 minutes). The complete schedule for your Platform Session will be available of the EMS Annual Meeting Web site (<http://www.ems-us.org/AM2009/index.aspx>) in a few weeks.

2. As a student or new investigator, you are also invited and strongly encouraged to prepare a poster of your presentation for the Student/New Investigator Poster Session being held on Saturday, October 24 at 6:00 PM during the Welcoming Reception.

EQUIPMENT FOR PLATFORM TALKS

Computer equipment will be available for PowerPoint presentations, necessitating that you pre-load your presentation onto the computer in the room prior to your presentation. Files need to be in a PC-compatible format that allows them to be run on a PC platform, using PowerPoint. If you will be using your personal Macintosh laptop, please bring the necessary cables to connect to the projection equipment. We recommend that you also bring your presentation file pre-loaded on either a flash drive and/or a CD for transfer of the presentation prior to the session.

PRESENTATION GUIDELINES FOR PLATFORM TALKS.

I urge you to keep the following in mind when planning your presentation:

1. It is important that you practice your presentation several times prior to delivering it in your session, with emphasis on speaking loudly and clearly.
2. A general rule of thumb is that you allow one minute per slide. We recommend that you limit the number of slides to a maximum of 12 -- 10 may be preferable.
3. An exemplary presentation includes at least one introductory slide and a summary slide stating the key conclusions. It is also helpful to the audience when you use informative titles on each slide.
4. PowerPoint software affords the danger of overloading each slide with too much information, which will actually detract from the major points on a slide.

STUDENT/NEW INVESTIGATOR POSTER SESSION

Student/New Investigator poster session, which is part of the Welcome Reception, is designed to highlight the work of students and new investigators. Your participation in the Saturday poster session provides you a second opportunity to present your research. Posters should be on display beginning at 4:30 PM on Saturday, October 24 and need to be removed at the end of the session.

POSTER PREPARATION

1. It takes considerable effort and attention to detail to prepare an effective poster presentation. We

1/25/2010



附件 7. 英国学术杂志 *Bioinformatics* 邀请作为该杂志社审稿人的信函。

Li, Zhiguang*

From: onbehalfof+bioinformatics.editorialoffice+oup.com@manuscriptcentral.com on behalf of bioinformatics.editorialoffice@oup.com
Sent: Monday, November 15, 2010 11:06 AM
To: Li, Zhiguang*
Subject: BIOINF-2010-1652 - Invitation to review

15-Nov-2010
Manuscript ID: BIOINF-2010-1652
Title: Normalizing beads microRNA microarray: a measurement error approach
Author(s): Wang, Bin; Wang, Xiaofeng; Xi, Yaguang

Invitation from John Quackenbush, Bioinformatics Associate Editor, to review the following paper.

Dear Dr. Li,

I would greatly value your expert opinion on the above Original Paper submitted to Bioinformatics.

The abstract of the manuscript is at the foot of this e-mail in order to help you make your decision as to whether you are able to review it. Please note that you will be expected to submit your report using the Bioinformatics online submission and reviewing system at:
<http://mc.manuscriptcentral.com/bioinformatics> .

We currently ask that reviewers submit their report within 2 weeks of the manuscript being made available to them. Further instructions will be provided if you agree to review the manuscript.

Unavailable: http://mc.manuscriptcentral.com/bioinformatics?URL_MASK=PxxXMYx4DTDtHTFjmjPy

Agreed: http://mc.manuscriptcentral.com/bioinformatics?URL_MASK=HdXkCKd2HbkXhqn5FY44

Declined: http://mc.manuscriptcentral.com/bioinformatics?URL_MASK=3Y6sKFcPPqB7ZFhGq6rY

If you are unable to review it, please could you kindly recommend some alternative reviewers when you decline using the link above?

Yours sincerely,

John Quackenbush
Associate Editor, Bioinformatics

Here is the abstract:

Motivation: Compared with messenger RNA or cDNA microarray data, microRNA microarray data is harder to normalize due to the small total number of microRNAs, and the overall low expression level. In beads arrays the hybridization is completed in several pools. Thus the numbers of microRNAs in each pool become even smaller, which poses extra difficulty to intra-sample normalization and ultimately affects the quality of the final profiles assembled from various pools. In this paper, we consider a measurement error model based method for beads array normalization.

Results: The proposed method is applied to analyze microRNA data for 40 human osteosarcoma xenografts obtained from beads arrays. The experimental results are validated by qRT-PCR results. Results show that the new method improves the normalization results in terms of the consistency between the qRT-PCR profiles and the profiles from bead arrays; and the sensitivity and sensitivity in testing for differentially-expressed microRNAs.

**附件 8. 美国学术杂志 *BioTechniques* 邀请作为该杂志社审稿人的信函。**

Page 1 of 2

Li, Zhiguang*

From: em.bt.0.1972ae.5d484140@editorialmanager.com on behalf of BioTechniques
[bioeditor@biotechniques.com]
Sent: Thursday, March 04, 2010 12:29 PM
To: Li, Zhiguang*
Subject: Reviewer Invitation MS#BT4308, "Utilization of AFFX Spike-In Control Probes to Monitor Sample Identity throughout Affymetrix Gene Chip® Array Processing"

Dear Li:

You have been invited to review a manuscript, entitled "Utilization of AFFX Spike-In Control Probes to Monitor Sample Identity throughout Affymetrix Gene Chip® Array Processing", for the journal BioTechniques. The Abstract and our competing interests policy appear at the end of this message.

To accept this invitation, click on this link (please note that we request that reviewers return their comments within 7 days): [Agree to Review](#)

If you are unable to review this manuscript and would like to recommend qualified colleagues, please use the following link: [Decline to Review](#)

If clicking a link does not open the Editorial Manager site, your email program may have inserted spaces and/or line breaks in the link. To respond, please log in as a Reviewer at <http://bt.EditorialManager.com> using the information listed below:

Username: ZLi-228
Password: li58357

If you have any questions about the review process or about using Editorial Manager, please reply to this message or contact bioeditor@biotechniques.com.

Thank you.
The BioTechniques Editorial Staff

ABSTRACT: (MS#BT4308, Report)

Microarrays evolved from a highly specialized technique into a standard molecular biology method which is widely used for whole genome gene expression profiling. One of the most important aspects is sample identity, i.e. is the expression profile recorded on an array from the sample it is used to be? Several potential steps in the protocol exist where a mix-up of samples may occur. With increasing size of microarray studies it is important to ensure that each expression profile is assigned to the correct experimental parameters. Errors at this level almost certainly lead to erroneous results and might even result in a complete failure of the microarray study. We developed a system which utilizes probes already present on commercially available Affymetrix arrays to unambiguously correlate the recorded expression profile with the input sample RNA. A set of eight spike in controls were generated which can be added to the sample RNA in different combinations to generate an "on chip identifier" which pass through the entire array processing protocol and results in a sample specific hybridization pattern. This pattern can then be used to monitor if each array was hybridized with the correct sample. The spike in controls had no negative effect on RNA integrity or any detectable influence on the expression values of

3/21/2011



附件 9. 英国学术杂志 *Journal of Translational Medicine* 邀请作为该杂志社审稿人的信函。

Li, Zhiguang*

From: JTM Editorial [Editorial@translational-medicine.com]
Sent: Wednesday, April 07, 2010 10:06 AM
To: Li, Zhiguang*
Subject: Invitation to review a manuscript for Journal of Translational Medicine

Dear Dr Li,

This letter is to ask if you would be willing to review a manuscript that has been submitted for peer review to Journal of Translational Medicine by Yingdong Zhao and colleagues. The title, authors and abstract of the manuscript are at the foot of this e-mail. We ask reviewers to return their reports within 14 days. Should you be unable to meet this deadline, then please let us know and we may be able to arrange an alternative deadline for your review.

Please click on the following link to let us know whether or not you are able to review this manuscript:

<http://www.translational-medicine.com/reviewer/7983416963767796>

We strongly encourage you to let us know in this way rather than sending an e-mail because this helps us to keep our records up-to-date and avoids the possibility of our sending you redundant reminders.

We do hope you are able to help. If, however, you cannot review the manuscript, we would be most grateful if you could suggest alternative reviewers. Please could you let us know your suggestions by accessing the website at the link above; you will not need to register. If you have any difficulties with the system, please inform reviewer@biomedcentral.com. If you have any questions about the manuscript, please let us know by replying to this e-mail.

Journal of Translational Medicine (<http://www.translational-medicine.com>) is an Open Access journal, providing free access to the articles that it publishes after peer review. These articles are available from the Journal of Translational Medicine website and via the NIH repository, PubMed Central, and are immediately included in PubMed.

I look forward to hearing from you within the next few days.

With best wishes,

The JTM Editorial Team
e-mail: Editorial@translational-medicine.com
Web: <http://www.translational-medicine.com/>

Title: Evaluation of normalization methods for two-channel microRNA microarrays
Journal: Journal of Translational Medicine
Type of article: Methodology

Authors:

Yingdong Zhao
Ena Wang
Hui Liu
Melissa Rotunno



签字和盖章页

申请 人：李志广

依托单位：大连医科大学

项目名称：DNMT1 通过与 RNA 聚合酶 polII 相互作用而导致抑癌基因启动子区域异常甲基化的机制研究

资助类别：面上项目

亚类说明：

附注说明：

申请人承诺：

我保证申请书内容的真实性。如果获得资助，我将履行项目负责人职责，严格遵守国家自然科学基金委员会的有关规定，切实保证研究工作时间，认真开展工作，按时报送有关材料。若填报失实和违反规定，本人将承担全部责任。

签字：

项目组主要成员承诺：

我保证有关申报内容的真实性。如果获得资助，我将严格遵守国家自然科学基金委员会的有关规定，切实保证研究工作时间，加强合作、信息资源共享，认真开展工作，及时向项目负责人报送有关材料。若个人信息失实、执行项目中违反规定，本人将承担相关责任。

编号	姓 名	工作单位名称	项目分工	每年工 作时间 (月)	签 字
1	吕德康	大连医科大学	BS-seq 数据分析	5	
2	张霞	大连医科大学	构建测序库，细胞培养	5	
3	范文君	大连医科大学	RNAseq 数据分析	6	
4	徐岭植	大连医科大学	构建突变载体，转染	8	
5	康志杰	大连医科大学	蛋白质沉淀实验	4	
6	谢佳君	大连医科大学	药物处理	4	
7	吕东维	大连医科大学	ChIPseq 分析	8	
8	邓佳	大连医科大学	ChIP-seq 实验	6	
9	庄艳	大连医科大学	细胞培养，药物处理	6	

依托单位及合作研究单位承诺：

已按填报说明对申请人的资格和申请书内容进行了审核。申请项目如获资助，我单位保证对研究计划实施所需要的人力、物力和工作时间等条件给予保障，严格遵守国家自然科学基金委员会有关规定，督促项目负责人和项目组成员以及本单位项目管理部门按照国家自然科学基金委员会的规定及时报送有关材料。

依托单位公章

合作研究单位公章 1

合作研究单位公章 2

日期：

日期：

日期：