



申请代码	H1603
受理部门	
收件日期	
受理编号	8150110425



国家自然科学基金 申 请 书

(2015 版)

资助类别：	青年科学基金项目		
亚类说明：			
附注说明：			
项目名称：	5hmC维持蛋白通过提高5hmC水平抑制肺癌细胞致瘤潜能的机制研究		
申 请 人：	吕德康	电 话：	0411-86118636
依托单位：	大连医科大学		
通讯地址：	辽宁大连旅顺口区西段9号大连医科大学		
邮政编码：	116044	单位电话：	0411-86110146
电子邮箱：	dekanglv@126.com		
申报日期：	2015年02月27日		

国家自然科学基金委员会



基本信息

申请人信息	姓名	吕德康	性别	男	出生年月	1983年11月	民族	汉族
	学位	博士	职称	讲师	每年工作时间（月）		9	
	电话	0411-86118636		电子邮箱	dekanglv@126.com			
	传真	0411-86118952		国别或地区	中国			
	个人通讯地址	辽宁大连旅顺口区西段9号大连医科大学						
	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, 表观遗传学, DNA羟甲基化, DNA甲基转移酶						
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							
	辽宁省肿瘤医院							
项目基本信息	项目名称	5hmC维持蛋白通过提高5hmC水平抑制肺癌细胞致瘤潜能的机制研究						
	英文名称	Mechanism underlying inhibition of 5hmC maintenance protein on tumorigenic potential of lung cancer cells by increasing 5hmC level						
	资助类别	青年科学基金项目				亚类说明		
	附注说明							
	申请代码	H1603				H1615		
	基地类别							
	研究期限	2016年01月 -- 2018年12月				研究方向: DNA修饰(如甲基化)与肿瘤发生		
	申请经费	24.0000万元						
中文关键词		肺癌; DNA羟甲基化; 5羟甲基胞嘧啶; 5hmC维持蛋白; 致瘤潜能						
英文关键词		Lung cancer; DNA hydroxymethylation; 5hmC; 5hmC maintenance protein; Tumorigenic potential						



中文摘要	<p>低5hmC水平是一种普遍的肿瘤基因组特征，对肿瘤发生发展至关重要。提高5hmC水平为肿瘤治疗提供了新思路，发现调控5hmC维持的蛋白hMMP尤为重要。肺癌中5hmC降低了5倍，而5hmC来源5mC的含量未发生明显变化，导致5hmC水平显著下降的机制尚不清楚。前期工作表明，肺癌中TETs基因的表达量未下调，突变率也很低，不能解释5hmC为何下调。我们据此推断，在DNA复制中hMMP能识别DNA母板5hmC信号，促进DNMTs/TETs的招募完成新链C的甲基化和氧化过程，hMMP的沉默或失活是导致肺癌中低5hmC水平的重要原因。本项目拟通过LC-MS/MS方法筛选hMMP；证实肺癌中hMMP突变或沉默导致5hmC含量降低；明确hMMP肺癌抑制能力；最后，在肺癌临床组织样品中检测hMMP的表达情况并评价其临床意义。本项目将推动肺癌中5hmC调控机制研究，为筛选肺癌分子标记和治疗靶点提供新的依据。</p>
英文摘要	<p>Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of cancer, which is important for tumor progression. Improving 5hmC level provides a new approach for cancer treatment. It's particularly important to identify proteins regulating maintenance of 5hmC. In lung cancers, levels of 5hmC were depleted substantially with up to 5-fold reduction compared with normal lung tissues, while there's no substantial reduction of 5mC. The basic molecular mechanism underlying loss of 5hmC is unclear. In our previous work, we found expression of TETs was stable and the mutation rates of TETs were too low to explain the reduction of 5hmC level. We hypothesize that during DNA replication, some 5hmC/C or 5hmC/5mC binding proteins named hMMPs, improve the recruitment of DNMTs/TETs to complete the methylation and oxidation of cytosine on the newly synthesized chain, and the ectopic expression or inactivation of hMMPs causes depletion of 5hmC in lung cancers. In this project, we will identify hMMPs with a LC-MS/MS based quantitative method, investigate whether silence or mutation of hMMPs cause decreased level of 5hmC, and how hMMPs inhibit tumorigenic potential in lung cancer. Finally, we will detect the expression of hMMPs in lung cancer samples and evaluate the clinical significance. The study will facilitate the research of 5hmC regulation in lung cancers and provide new insights for tumor molecular marker selection and drug target.</p>



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	证件号码	每年工作 时间（月）
1	王晓彬	1964-07-03	女	主任医师	硕士	辽宁省肿瘤医院	024-24315516	jia_liu_2007@163.com	210102196407031824	3
2	张霞	1983-11-27	女	讲师	博士	大连医科大学	0411-86118636	zhangxia864@dlmedu.edu.cn	110108198311271480	3
3	张宇	1983-02-16	女	工程师	硕士	大连医科大学	0411-86118636	zhangyu02xinben@163.com	370321198302161829	3
4	侯率	1986-11-11	男	助理实验师	硕士	大连医科大学	0411-86118636	houshuai009@126.com	210623198611112216	2
5	康志杰	1979-10-06	女	博士生	硕士	大连医科大学	0411-86118636	cathie1997@sina.com	211422197910063548	3
6	陈富顺	1990-04-20	男	硕士生	学士	大连医科大学	0411-86118636	970445123@qq.com	13050319900420063X	6
7	陈成军	1990-11-25	男	硕士生	学士	大连医科大学	0411-86118636	shouhukongling@163.com	371327199011250016	6

总人数	高级	中级	初级	博士后	博士生	硕士生
8	1	3	1		1	2



国家自然科学基金项目资金预算表（定额补助）

项目名称： 5hmC维持蛋白通过提高5hmC水平抑制肺癌细胞致瘤潜能的机制研究

项目负责人：吕德康

金额单位：万元

序号	科目名称	金额	备注
	(1)	(2)	(3)
1	一、项目资金支出	24.0000	/
2	(一) 直接费用	20.1500	
3	1、设备费	0.9000	小型设备
4	(1) 设备购置费	0.9000	一套移液器
5	(2) 设备试制费	0.0000	
6	(3) 设备改造与租赁费	0.0000	
7	2、材料费	8.0000	实验用各种试剂盒、酶类、易耗品等
8	3、测试化验加工费	4.9500	LC-MS/MS、HPLC分析等
9	4、燃料动力费	0.0000	
10	5、差旅费	0.8000	外埠差旅及市内交通费
11	6、会议费	0.0000	
12	7、国际合作与交流费	0.0000	
13	8、出版/文献/信息传播/知识产权事务费	1.0000	论文版面费、文献检索、资料打印、专业书籍
14	9、劳务费	4.5000	直接参与本项目的硕博士研究生劳务费
15	10、专家咨询费	0.0000	
16	11、其他支出	0.0000	
17	(二) 间接费用	3.8500	
18	其中：绩效支出	0.9625	
19	二、自筹资金	0.0000	



预算说明书

一、直接费用 20.15 万元

1、仪器设备费 0.9万元

移液器0.18万元/支，5支累计0.9万元，用于常规分子生物学实验。

2、材料费 8.0万元

细胞及常规分子生物学实验是本项目主要的研究方法，需要购买的各种细胞培养基、酶类及试剂盒包括：

1) 培养小鼠ES细胞、肺癌原代细胞、肺癌细胞系D95及L78所需的胎牛血清、容器、培养基、移液管等费用2万元，说明如下：

Gibco胎牛血清（500mL FBS）2瓶，0.35万元/瓶，共0.7万元；

Gibco DMEM培养基（500ml装）30瓶，0.01万元/瓶，共0.3万元；

Nest 100mm培养皿（500个装）4箱，0.05万元/箱，共0.2万元；

洁特 10mL移液器（200支装）3箱，0.03万元/箱，共0.09万元；

Gibco TRYPsin（500ml）5瓶，0.04万元/瓶，共0.2万元；

Corning 50mL离心管（500个装）4箱，0.07万元/箱，共0.28万元；

其他易耗品预计需要0.23万元；

2) 基本的生物学与化学试剂，配制各种溶液，累计0.3万元；

3) 分子生物学试剂，包括胶原酶、DNA限制内切酶、连接酶、合成酶、DNA裂解酶、合成引物等，累计0.7万元；

4) 试剂盒费用5.0万元，说明如下：

Qiagen核酸提取试剂盒（50次装）2个，0.1万元/个，共0.2万元；

Viraductin转染试剂盒（200次装）1个，0.25万元/个，共0.25万元；

NEB DNA文库制备试剂盒（24次装）1个，0.85万元/个，共0.85万元；

Illumina MiSeq测序试剂盒（V3版本）4个，0.35万元/个，共1.4万元；

Kapa qPCR检测试剂盒（5mL装）4个，0.25万/个，共1.0万元；

Covaris DNA打断样品瓶（0.2mL）100个，0.004万元/个，共0.4万元；

Agilent BioAnalyzer文库质量分析Chip 2个，0.25万元/个，共0.5万元；

其他试剂盒预计需要0.4万元；

3、测试化验加工费 4.95万元

用于hMMP筛选实验、靶向测序验证及载体序列测序分析，说明如下：

1) LC-MS/MS分析18个样品，0.2万元/样，共3.6万元；

2) HPLC分析10个样品，0.12万元/样，共1.2万元；

3) Sanger测序60个样品，25元/样，共0.15万元；

4、差旅费 0.8万元

学术交流用的外埠差旅费0.5万元，市内交通费0.3 万元，累计0.8万元。

5、出版/文献/信息传播/知识产权事务费 1.0万元

论文版面费0.4万元，文献检索费0.3万元，专业书籍购买及资料打印费0.3万元，累计1.0万元。

6、劳务费 4.5万元

用于支付直接参与本项目的硕博研究生科研劳务费，说明如下：

1) 博士生1人，劳务费0.167万/月，3年累计9个月，共1.5万元；

2) 硕士生2人，劳务费0.083万/月，3年累计36个月，共3.0万元；

二、间接费用 3.85万元

申请经费合计 24.0万元。



报告正文

1. 立项依据与研究内容

(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,需结合科学研究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)

肺癌已成为中国第一癌症死因,其发病率和死亡率迅速上升。2014年,中国肺癌发病年增长率超过25%,越来越严重的大气污染已成为中国肺癌高发的重要因素。目前,肺癌的五年生存率低于15%,仍以化放疗和外科治疗为主,完全不能满足治疗要求,寻找更理想的治疗方法提高肺癌治疗效果已成为医学研究的重要任务。因此,进一步明确肺癌发生的分子和遗传机制,具有重要理论和现实意义。

1) DNA 甲基化及主动去甲基化机制

DNA 不仅携带遗传编码信息,还可通过胞嘧啶(cytosine, C)的修饰携带表观遗传信息[1, 2]。甲基化胞嘧啶(5-methylcytosine, 5mC)是在C第五位碳原子上添加一个甲基产生的,在植物、动物和真菌中高度保守[3]。在哺乳动物体细胞中,约1%的DNA碱基甲基化,5mC主要发生在CpG上,60%–80%的CpG发生了甲基化。

DNA 甲基化模式的建立需要两个 de novo DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT) DNMT3A 和 DNMT3B [4];而在细胞分裂过程中, DNMT1 通过其增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)结合结构域绑定到复制叉上, UHRF1 (NP95) 识别半甲基化 DNA 双链,促使 DNMT1 将新合成链上的 C 甲基化来保持甲基化模式[5-7]。DNA 甲基化对于基因组稳定、基因表达、X 染色体沉默、遗传印记、生长发育等过程都至关重要[8]。

2009 年 Kriaucionis 和 Tahiliani 等证实小鼠的 Purkinje 细胞存在 5mC 的氧化产物-羟甲基胞嘧啶(5-hydroxymethylcytosine, 5hmC),如图 1 所示, 5hmC 是由 TET 双加氧酶(ten-eleven translocation, TET)催化产生的[9, 10], TETs 还能将 5hmC 进一步氧化成 5-醛基胞嘧啶(5-formylcytosine, 5fC)和 5-羧基胞嘧啶(5-carboxycytosine, 5caC), 5fC 和 5caC 能够作为胸腺嘧啶糖基化酶(thymine-DNA Glycosylase, TDG)的底物而完成脱甲基过程[11, 12]。

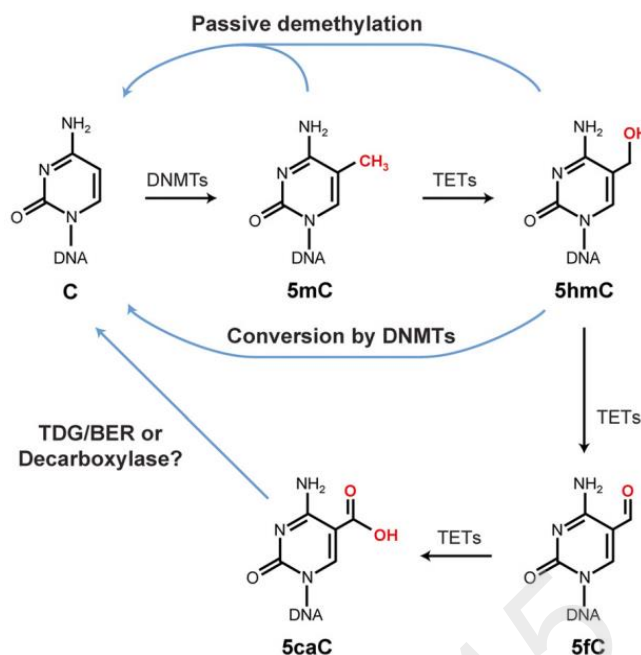


图 1 DNA 甲基化及主动去甲基化机制

2) 5hmC 是一种重要的表观遗传标记

研究表明 5hmC 不仅仅是 5mC 氧化过程的中间产物,同 5mC 一样是重要的表观遗传修饰,在基因转录、生长发育和疾病发生过程中发挥着重要作用。

5hmC 广泛存在于各种组织和细胞内[13-16],不同组织或细胞中 5hmC 含量差异显著。在 HeLa 和 HEK293 细胞中 5hmC 约占总核苷酸的 0.001%。在小鼠中,神经系统中 5hmC 比率最高(0.3-0.7%),在肺、肾、膀胱、骨骼肌和心脏中的含量为 0.15-0.17%。肝、脾与内分泌组织中含量最低(0.03 - 0.06%)。在小鼠脑发育过程中 5hmC 的含量是逐渐升高的,胎脑细胞中 5hmC 占 0.20%,而在成熟脑细胞中增加到 0.87%[17]。在 ES 细胞分化过程中 5hmC 的含量也是动态变化的,ES 细胞中 5hmC 的含量为 0.3%,随着分化的进行先减少后升高[16]。与之对应, Tet1 与 Tet2 在小鼠 ES 细胞中高表达,分化开始后迅速减少,随后 Tet2 的表达回升,在小鼠 ES 细胞中 Tet3 表达量很低,之后逐渐上升[18, 19]。

在不同的组织或细胞里 5hmC 的基因组定位有很大的差异[17, 20], 5hmC 定位于活跃表达基因中,对基因转录和细胞分化非常重要。不同发育阶段脑细胞中 5hmC 定位在不同的基因中,这些基因对于神经细胞的发育及相关疾病的发生至关重要[17, 20, 21]。在 ES 细胞里, 5hmC 富集在一些特异表达基因的启动子和增强子上[22-23],这些基因在 ES 细胞自我更新和分化过程中发挥着重要作用。敲除 Tet1 和 Tet2 会使得多能性维持基因 (Esrrb、Prdm14、Dppa3、Klf2、Tcl1、Zfp42 等)启动子中 5hmC 水平降低而 5mC 含量增加,下调它们的表达[24];



与此对应,体细胞中过表达 TET1 使得 OCT4 去甲基化并启动基因表达,能代替 OCT4 开启体细胞重编程过程[25]。在 ES 细胞中敲除 Tet1 导致定向分化蛋白的异位表达,滋养层干细胞决定因子 Elf5、滋养外胚层标记基因 Cdx2、Eomes 和 Hand1 上调表达,而神经外胚层标记基因 Pax6、Neurod1 以及 Nodal 蛋白抑制因子 Lefty1 和 Lefty1 表达量降低。这样的 ES 细胞会产生出血性畸胎瘤,表现为内胚层细胞增加,神经外胚层减少并出现滋养层巨型细胞[18]。

很多重要蛋白能够识别 5hmC 信号[26-29],这些蛋白在发育、DNA 复制及 DNA 损伤修复等过程中起着重要的作用。在脑细胞中富集的 MeCP2 是一种主要的 5hmC 结合蛋白,引发 Rett 综合症的 MeCP2 R133C 突变能显著降低其与 5hmC 的结合能力[21]。核小体重构蛋白复合体 NURD 中 Mbd3 能够识别 5hmC,调控 5hmC 富集区域的基因表达,敲除 Mbd3 和 Brg1 会引起体内 5hmC 的水平降低并导致发育缺陷[27]。德国和英国的两个课题组利用基于质谱的定量蛋白质学方法发现了大量 5hmC 修饰识别蛋白[28, 29],功能富集分析显示这些蛋白主要参与 DNA 复制及损伤修复。有些蛋白如 WDR76、THY28 是广泛表达的,还有很多是组织特异的,如 UHRF2 和 THAP11 分别是神经元前体细胞和成熟脑细胞特异蛋白,说明在不同细胞中 5hmC 能够通过结合特异蛋白来行使特异细胞功能。

3) 5hmC 模式在细胞更新过程中是如何稳定维持的?

在 DNA 复制过程中,5mC 的维持主要是通过 UHRF1/DNMT1 识别 DNA 半甲基化(Hemi-methylation)的 5mC/C 位点并直接将新合成的 C 进行甲基化来完成的。与 5mC 模式维持不同的是,在 5hmC 模式保持中,新合成的 C 要通过甲基化和氧化两步才能产生 5hmC。这个过程又是如何进行的?有趣的是,UHRF1 不仅能够识别 5mC/C 位点,也能够通过其 SRA 结构域结合 5hmC/C 位点,结合 5hmC/C 位点的活性与 5mC/C 是相似的[26]。Hashimoto 等的研究表明 UHRF1 识别 5hmC/C 位点的活力有限,DNMT1 催化 5hmC/C 位点中 C 甲基化的活性也远低于催化 5mC/C 位点的活性,而 DNMT3A 和 DNMT3B 却具有催化半甲基化的 5hmC/C 位点中 C 甲基化的能力[30]。

在细胞更新中 DNA 母板 5hmC 信号如何识别,DNMTs 和 TETs 招募到 5hmC/C 位点的机制尚不清楚。我们推测,在 DNA 复制中存在识别 DNA 母板 5hmC 信号的蛋白(5hmC maintenance protein, hMMP),调控 DNMTs 或 TETs 的招募完成新链 C 的甲基化和氧化过程(图 3)。

4) 5hmC 与肿瘤关系密切

低 5hmC 是一种重要的癌症特征[31-33],肺癌、脑癌、乳腺癌、肝癌、肾



癌、前列腺癌、直肠癌、子宫癌、黑色素瘤中 5hmC 含量明显低于周围正常组织[34]。在肺癌细胞中 5hmC 的量减少了 5 倍（图 2A），在脑癌中 5hmC 减少了近 30 倍。因此，5hmC 能够作为新的生物标记用于癌症诊断。

在小鼠肿瘤细胞模型中证实，癌症发生过程伴随着 5hmC 含量的降低[35]，在黑色素瘤中过量表达 Tet2 能够提高 5hmC 水平，抑制肿瘤细胞的发展[36]。提高 5hmC 水平为肿瘤治疗提供了新思路。因此，鉴定出导致肿瘤中 5hmC 水平降低的因素非常重要。肿瘤 5hmC 含量降低的原因主要有三个，TETs 表达量下降，TETs 基因突变或 5hmC 的来源 5mC 含量降低。在乳腺癌、肝癌、黑色素瘤中 TETs 表达量下降是导致 5hmC 减少的原因[35]。在急性髓系白血病患者中 Tet2 突变非常普遍，敲除 Tet2 的氧化活性会促进骨髓瘤发生[37]。然而，肺癌、脑癌中 5mC 的含量无明显变化（图 2B）[31]。

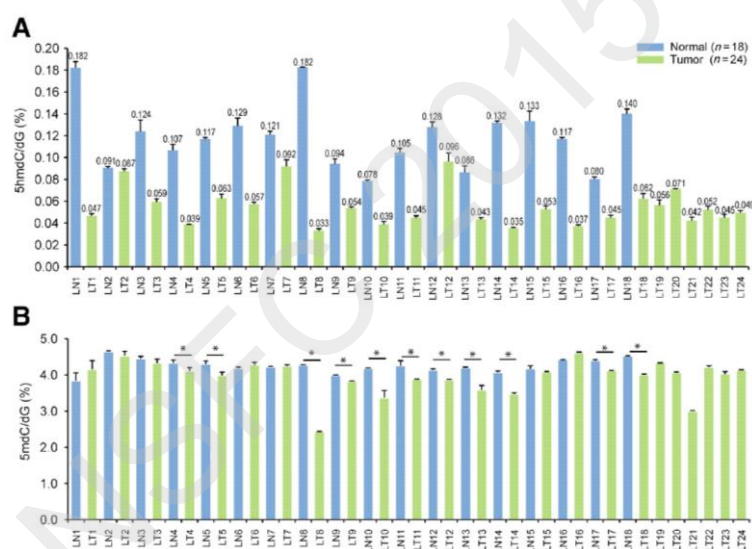


图 2 正常肺组织与肺癌细胞中 5hmC (A) 和 5mC (B) 的定量比较

LN 表示正常肺组织，LT 表示肺癌，阿拉伯数字代表不同肺癌患者。引自 Seung-Gi Jin, Cancer Res 2011, 71:7360-7365

我们的前期工作发现：TETs 基因 RNA 水平及突变不能解释肺癌中 5hmC 水平的显著降低。10 对新鲜肺癌样品的肺癌组织与癌旁组织相比，TET 基因未出现明显的下调表达（图 6）；在有些癌症如恶性淋巴瘤、前列腺癌、甲状腺癌中，TETs 基因的突变率很高，特别是 Tet2，在甲状腺癌样品中突变率高达 20%。然而，在 178 个肺癌样品中，三个 TETs 基因的突变率的总和只有 13.48%（图 7）。因此，存在其他导致 5hmC 水平下降的因素。据此，我们提出假说（图 3），在 DNA 复制或修复过程中 hMMP 蛋白能够识别 5hmC 信号，调控 DNMTs/TETs 的招募完成新链 C 的甲基化和氧化过程。在肺癌细胞中，hMMP 的沉默或失活很是导致肺癌中低 5hmC 水平的重要原因。

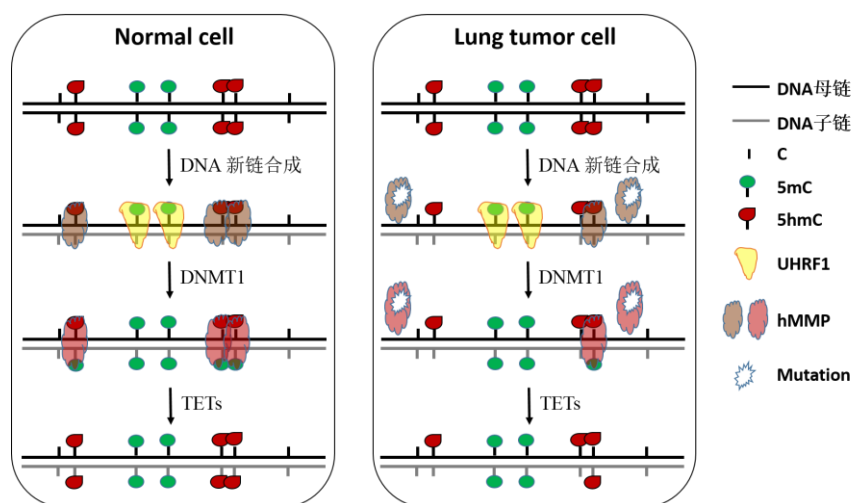


图3 本项目假设示意图

在DNA复制或修复过程中hMMP蛋白识别5hmC/C半羟甲基化双链或5hmC/5mC双链并招募DNMTs/TETs的完成新链C的甲基化和氧化过程。在肺癌细胞中hMMP的异常表达或突变导致DNMT1或TET无法完成新链5mC或5hmC的合成，使得5hmC水平下调。

本项目拟通过LC-MS/MS鉴定hMMP；证实肺癌中hMMP突变或沉默导致5hmC含量降低；分析hMMP对肺癌细胞生物学特征的影响；利用小鼠移植瘤模型验证hMMP抑制肺癌发展的作用；最后，在肺癌临床组织样品中检测hMMP的表达情况并评价其临床意义。本项目将推动肺癌中5hmC的调控机制研究进程，同时为筛选肺癌分子标记和治疗靶点提供新的依据。

参考文献

1. Riggs AD: X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet* 1975, **14**:9-25.
2. Holliday R, Pugh JE: DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* 1975, **187**:226-232.
3. Law JA, Jacobsen SE: Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet* 2010, **11**:204-220.
4. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E: DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999, **99**:247-257.
5. Bostick M, Kim JK, Estève P-O, Clark A, Pradhan S, Jacobsen SE: UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science* 2007, **317**:1760-1764.
6. Hermann A, Goyal R, Jeltsch A: The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. *Journal of Biological Chemistry* 2004, **279**:48350-48359.
7. Sharif J, Muto M, Takebayashi S-i, Suetake I, Iwamatsu A, Endo TA, Shinga J, Mizutani-Koseki Y, Toyoda T, Okamura K: The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature* 2007, **450**:908-912.
8. Smith ZD, Meissner A: DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet* 2013, **14**:204-220.
9. Mudbhary R, Hoshida Y, Chernyavskaya Y, Jacob V, Villanueva A, Fiel MI, Chen X, Kojima



- K, Thung S, Bronson RT: **UHRF1 overexpression drives DNA hypomethylation and hepatocellular carcinoma.** *Cancer Cell* 2014, **25**:196-209.
10. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, Rao A: **Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1.** *Science* 2009, **324**:930-935.
11. He YF, Li BZ, Li Z, Liu P, Wang Y, Tang Q, Ding J, Jia Y, Chen Z, Li L, et al: **Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA.** *Science* 2011, **333**:1303-1307.
12. Ito S, Shen L, Dai Q, Wu SC, Collins LB, Swenberg JA, He C, Zhang Y: **Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine.** *Science* 2011, **333**:1300-1303.
13. Globisch D, Munzel M, Muller M, Michalakakis S, Wagner M, Koch S, Bruckl T, Biel M, Carell T: **Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates.** *PLoS One* 2010, **5**:e15367.
14. Chopra P, Papale LA, White AT, Hatch A, Brown RM, Garthwaite MA, Roseboom PH, Golos TG, Warren ST, Alisch RS: **Array-based assay detects genome-wide 5-mC and 5-hmC in the brains of humans, non-human primates, and mice.** *BMC genomics* 2014, **15**:131.
15. Lu X, Han D, Simen ZB, Song C-X, Zhang L-S, Doré LC, He C: **Base-resolution maps of 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine reveal genome-wide DNA demethylation dynamics.** *Cell research* 2015.
16. Szwagierczak A, Bultmann S, Schmidt CS, Spada F, Leonhardt H: **Sensitive enzymatic quantification of 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA.** *Nucleic Acids Res* 2010, **38**:e181.
17. Lister R, Mukamel EA, Nery JR, Urich M, Puddifoot CA, Johnson ND, Lucero J, Huang Y, Dwork AJ, Schultz MD: **Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development.** *Science* 2013, **341**.
18. Koh KP, Yabuuchi A, Rao S, Huang Y, Cunniff K, Nardone J, Laiho A, Tahiliani M, Sommer CA, Mostoslavsky G, et al: **Tet1 and Tet2 regulate 5-hydroxymethylcytosine production and cell lineage specification in mouse embryonic stem cells.** *Cell Stem Cell* 2011, **8**:200-213.
19. Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y: **Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification.** *Nature* 2010, **466**:1129-1133.
20. Szulwach KE, Li X, Li Y, Song CX, Wu H, Dai Q, Irier H, Upadhyay AK, Gearing M, Levey AI, et al: **5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging.** *Nat Neurosci* 2011, **14**:1607-1616.
21. Mellán M, Ayata P, Dewell S, Kriaucionis S, Heintz N: **MeCP2 binds to 5hmC enriched within active genes and accessible chromatin in the nervous system.** *Cell* 2012, **151**:1417-1430.
22. Yu M, Hon GC, Szulwach KE, Song CX, Zhang L, Kim A, Li X, Dai Q, Shen Y, Park B, et al: **Base-resolution analysis of 5-hydroxymethylcytosine in the mammalian genome.** *Cell* 2012, **149**:1368-1380.
23. Booth MJ, Branco MR, Ficz G, Oxley D, Krueger F, Reik W, Balasubramanian S: **Quantitative sequencing of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine at single-base**



- resolution.** *Science* 2012, **336**:934-937.
24. Ficiz G, Branco MR, Seisenberger S, Santos F, Krueger F, Hore TA, Marques CJ, Andrews S, Reik W: **Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation.** *Nature* 2011, **473**:398-402.
25. Gao Y, Chen J, Li K, Wu T, Huang B, Liu W, Kou X, Zhang Y, Huang H, Jiang Y: **Replacement of Oct4 by Tet1 during iPSC induction reveals an important role of DNA methylation and hydroxymethylation in reprogramming.** *Cell Stem Cell* 2013, **12**:453-469.
26. Frauer C, Hoffmann T, Bultmann S, Casa V, Cardoso MC, Antes I, Leonhardt H: **Recognition of 5-hydroxymethylcytosine by the Uhrf1 SRA domain.** *PLoS One* 2011, **6**:e21306.
27. Yildirim O, Li R, Hung JH, Chen PB, Dong X, Ee LS, Weng Z, Rando OJ, Fazzio TG: **Mbd3/NURD complex regulates expression of 5-hydroxymethylcytosine marked genes in embryonic stem cells.** *Cell* 2011, **147**:1498-1510.
28. Iurlaro M, Ficiz G, Oxley D, Raiber EA, Bachman M, Booth MJ, Andrews S, Balasubramanian S, Reik W: **A screen for hydroxymethylcytosine and formylcytosine binding proteins suggests functions in transcription and chromatin regulation.** *Genome Biol* 2013, **14**:R119.
29. Spruijt CG, Gnerlich F, Smits AH, Pfaffeneder T, Jansen PW, Bauer C, Munzel M, Wagner M, Muller M, Khan F, et al: **Dynamic readers for 5-(hydroxy)methylcytosine and its oxidized derivatives.** *Cell* 2013, **152**:1146-1159.
30. Hashimoto H, Liu Y, Upadhyay AK, Chang Y, Howerton SB, Vertino PM, Zhang X, Cheng X: **Recognition and potential mechanisms for replication and erasure of cytosine hydroxymethylation.** *Nucleic Acids Res* 2012, **40**:4841-4849.
31. Jin S-G, Jiang Y, Qiu R, Rauch TA, Wang Y, Schackert G, Krex D, Lu Q, Pfeifer GP: **5-Hydroxymethylcytosine is strongly depleted in human cancers but its levels do not correlate with IDH1 mutations.** *Cancer research* 2011, **71**:7360-7365.
32. Kroeze LI, van der Reijden BA, Jansen JH: **5-Hydroxymethylcytosine: An epigenetic mark frequently deregulated in cancer.** *Biochim Biophys Acta* 2015, **1855**:144-154.
33. Putiri EL, Tiedemann RL, Choi J-H, Robertson KD: **Dynamics of TET methylcytosine dioxygenases in 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine patterning in human cancer cells.** *Cancer Research* 2014, **74**:2319-2319.
34. Haffner MC, Chaux A, Meeker AK, Esopi DM, Gerber J, Pellakuru LG, Toubaji A, Argani P, Iacobuzio-Donahue C, Nelson WG: **Global 5-hydroxymethylcytosine content is significantly reduced in tissue stem/progenitor cell compartments and in human cancers.** *Oncotarget* 2011, **2**:627.
35. Yang H, Liu Y, Bai F, Zhang J, Ma S, Liu J, Xu Z, Zhu H, Ling Z, Ye D: **Tumor development is associated with decrease of TET gene expression and 5-methylcytosine hydroxylation.** *Oncogene* 2013, **32**:663-669.
36. Lian CG, Xu Y, Ceol C, Wu F, Larson A, Dresser K, Xu W, Tan L, Hu Y, Zhan Q: **Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of melanoma.** *Cell* 2012, **150**:1135-1146.
37. Ko M, Huang Y, Jankowska AM, Pape UJ, Tahiliani M, Bandukwala HS, An J, Lamperti ED, Koh KP, Ganetzky R: **Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2.** *Nature* 2010, **468**:839-843.



(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)

研究内容

A 筛选 hMMP

已知小鼠 ES 细胞的 5hmC 的水平高达 0.3%, 我们推测在细胞更新过程中, hMMP 能特异结合 5hmC/C 半羟甲基化双链或 5hmC/5mC 双链, 调控 DNMTs/TETs 的招募完成新链 C 的甲基化和氧化过程。1)设计 5hmC/C 半羟甲基化双链和 5hmC/5mC 双链 DNA 探针; 2) 富集蛋白, 质谱分析 5hmC/C 双链和 5hmC/5mC 双链特异结合蛋白; 3) 比对已有哺乳动物蛋白序列数据库和人类蛋白基因, 确定 hMMP 范围;

B 证实肺癌中 hMMP 的突变或沉默导致 5hmC 含量降低

在肺癌细胞中识别出 5hmC 调控基因, 能够揭示 hMMP 在肺癌中的调控机制。1) 提取肺癌细胞系及临床样品基因组, 靶向扩增 hMMP 候选基因, 测序获得其突变情况; 2) 提取肺癌细胞系及新鲜临床样品总 RNA, 检测 hMMP 候选基因的表达情况; 3) 将上两步中获得的突变或下调表达的基因在肺癌细胞系或原代细胞中过表达, 检测 5hmC 水平变化, 获得肺癌中影响 5hmC 水平的 hMMP;

C 明确 hMMP 通过调节 5hmC 水平影响肿瘤细胞生物学行为

5hmC 定位在转录活跃的基因中, 5hmC 含量的降低必然影响基因的正常表达, 在肺癌细胞中回复突变或过表达 hMMP 后, 5hmC 水平回复, 这些基因表达量提高, 进而影响肿瘤细胞生物学行为, 在肿瘤细胞中过表达 hMMP 后观察其对以下特征的影响: 肺癌细胞的增殖、侵袭、迁移能力、凋亡速度;

D 分析 hMMP 抑制肺癌细胞致瘤潜力的作用

建立肺癌原位移植模型模拟体内条件, 在肺癌细胞系或从新鲜样品获得的原代细胞中过表达 hMMP 后, 移植到裸鼠体内, 观察成瘤体积、重量及成瘤速度; 结合 hMMP 表达水平研究 hMMP 抑制肺癌细胞致瘤潜力的能力;

E 分析 hMMP 突变和表达情况, 评价其临床意义

1) 收集 100 例以上肺癌石蜡样品, 靶向测序获得 hMMP 突变, 分析突变热点; 2) 收集 30 例以上成对新鲜样品, 比较分析 hMMP 的表达情况; 3) 结合 hMMP 基因突变及表达情况与肺癌组织分级、患者的预后情况做关联分析, 评价其在肺癌组织分级中的作用及其临床意义;



研究目标

- 1) 在肺癌中证实 hMMP 通过调节 5hmC 水平抑制肿瘤细胞发展;
- 2) 评价 hMMP 在肺癌组织分级中的作用及其临床意义;

拟解决的关键科学问题

- 1) 如何鉴定 hMMP?

在细胞更新过程中, hMMP 特异结合 5hmC/C 半羟甲基化双链或 5hmC/5mC 双链。因此, 可通过 Pull down 及 LC-MS/MS 识别出 5hmC/C 和 5hmC/5mC 双链的特异结合蛋白, 结合肿瘤细胞系及原代肿瘤细胞中检测突变及差异表达情况、过表达后 HPLC 检测 5hmC 含量变化鉴定出肺癌中影响 5hmC 水平的 hMMP。

- 2) 如何揭示 hMMP 影响肿瘤细胞致癌潜力?

5hmC 定位在转录活跃的基因中, 5hmC 含量的降低必然影响基因的正常表达, 因此, 可以在肺癌细胞系或原代肿瘤细胞中回复突变或过表达 hMMP, 5hmC 水平回复, 使得下调基因表达量提高, 进而通过肺癌细胞模型和裸鼠移植瘤实验揭示 hMMP 对肿瘤发展的影响。

- 3) 如何评价 hMMP 在肿瘤分级中的作用及其临床意义?

通过靶向测序分析至少 100 例具有完整病例资料的肺癌石蜡样品中 hMMP 基因的突变情况, 通过 qPCR 分析 30 例成对肺癌样品中的 hMMP 基因表达情况, 将突变及表达情况与组织分级、预后情况做关联分析, 可评价 hMMP 在肺癌组织分级中的作用及其临床意义。

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

研究方案

A 通过 Pull down 和 LC-MS/MS 鉴定 hMMP

- 1) 以 ZFP64 和 ECAT1 基因内富含 5hmC 的 CpG 岛区段为模板, 使用生物素标记的引物, 在分别含有 dCTP、dmCTP、dhmCTP 的反应体系中 PCR 扩增出末端生物素标记的 5C、5mC 和 5hmC 单链 DNA, 根据需要变性复性得到 5hmC/C 半羟甲基化双链和 5hmC/mC 双链 DNA 探针;
- 2) Pull down 实验富集出 5hmC/C 半羟甲基化双链和 5hmC/mC 双链的特异结合蛋白, LC-MS/MS 分析获得这些蛋白的序列及定量信息;



- 3) 比对已有的哺乳动物蛋白序列数据库, Kruskal Wallist 检验获得特异结合蛋白, 确定 hMMP 范围;
- 4) 输入 DAVID 数据库进行 Gene ontology 分析, 使用 GSEA 进行 Pathway 分析;

B 利用靶向测序、多重 PCR 及 HPLC 鉴定调节肺癌细胞 5hmC 水平变化的 hMMP

- 1) 消化新鲜肺癌组织, 获得原代细胞, 剩余组织液氮速冻, -80 度保存;
- 2) 提取 20 例肺癌临床样品基因组 DNA, 设计靶向扩增引物, PCR 扩增后建立测序文库, 使用 Miseq 进行靶向测序;
- 3) 使用 BWA 或 bowtie2 比对获得的 Reads, 使用 Samtool 的 mpileup 搜索所有候选基因的突变情况;
- 4) 多重 qPCR 比较 hMMP 候选基因在肺癌组织和癌旁组织中的表达差异 (n>10);
- 5) 将上两步中获得的突变或下调表达的基因, 利用逆转录病毒转染法在肺癌细胞系或肺癌原代细胞中过表达, qPCR 和 Western blot 检测后, 提取基因组 DNA, 充分裂解后用 HPLC 分析 5hmC 水平变化;

C 研究 hMMP 对肺癌细胞生物学特征的影响

- 1) 采用 MTT 法、BrdU 法和克隆形成实验, 分析 hMMP 过表达后, 肺癌细胞系或原代细胞的增殖情况;
- 2) 采用 FCM 法、划痕实验、Transwell 研究肺癌细胞的凋亡、迁移和侵袭能力的变化;
- 3) 流式细胞仪检测 hMMP 过表达后肺癌细胞周期的变化;

D 利用小鼠移植瘤模型验证 hMMP 抑制肺癌发展的作用

- 1) 肺癌细胞系中过表达 hMMP, 采用原位移植法建立肺癌原位移植模型;
- 2) 生长 3-4 周后处死部分荷瘤小鼠, 解剖游离出肿瘤瘤体, 测量肿瘤的大小和重量 (n>10), 分析 hMMP 对肿瘤的存活、增殖和生长的作用;
- 3) 免疫组化观察 anti-Vimentin 染色情况, 计算浸润点数目来分析 hMMP 对肿瘤细胞的迁移和侵袭效应 (n>5);
- 4) 切取瘤体, 对比肿瘤恶性发展情况, 利用原位杂交技术检测 hMMP 在组织中的表达情况;



E 基于肺癌临床组织样品检测 hMMP 的表达情况并评价其临床意义

- 1) 我们计划从辽宁省肿瘤医院病理科收集至少 100 例不同级别的肺癌存档石蜡样品，要求具有完整病例资料；从大连医科大学附属一院胸外科收集至少 30 例成对新鲜肿瘤样品；
- 2) 从石蜡样品中提取全基因组 DNA，靶向测序检测 hMMP 突变情况；
- 3) 从新鲜成对样品中提取总 RNA，通过 qPCR 比较癌组织及癌旁组织中 hMMP 的表达差异；
- 4) 结合病例资料进行统计分析，明确 hMMP 突变及异常表达与组织学分级和患者的预后关系，进而评价其作为分子标记和分子靶标的可能性；

技术路线（图 4）

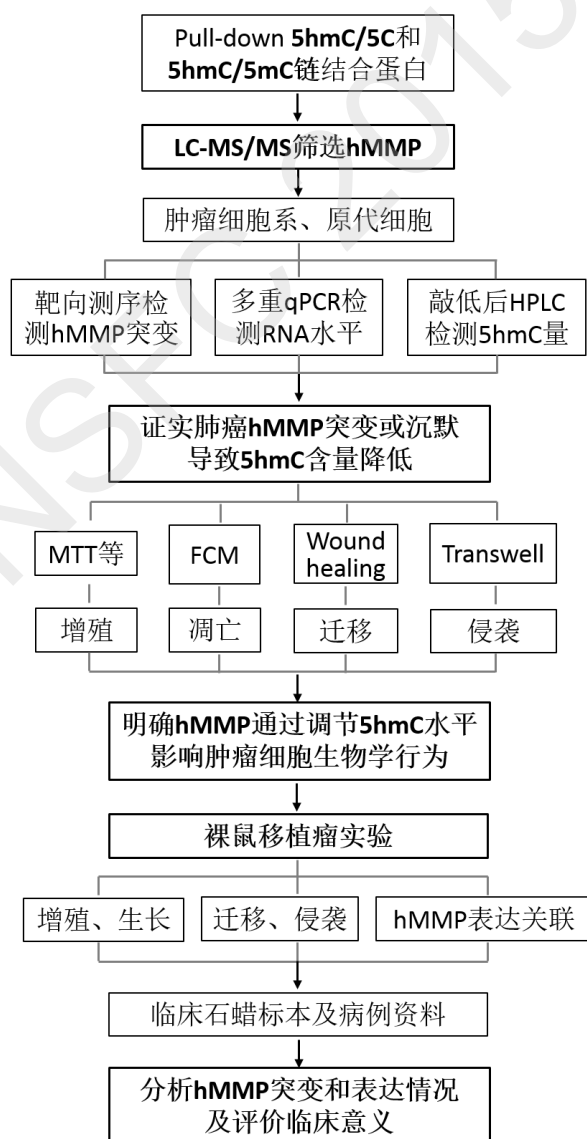


图 4 本项目的技术路线



可行性分析

1) 研究基础良好

前期,我们在 ES 细胞 DNA 甲基化模式维持方面做了大量工作,通过 BS-seq 数据分析发现 DNA 双链上对称的甲基化模式是由 DNMT1 和 DNMT3a/b 共同调控完成的(图 5)。通过这部分的工作,我们不但深刻理解了 DNA 甲基化修饰维持机制,同时掌握了甲基化数据获取以及深度测序数据分析方法,这些研究为本项目的执行提供了保障。

2) 人员结构合理

本项目申请人一直以来的工作都围绕表观遗传调控,在高通量数据获取及分析方面经验丰富,负责课题统筹规划、文献跟踪、确保课题快速顺利实施;项目参与人王晓彬主要负责病例资料的整理和石蜡样品的收集;张霞在测序文库构建方面经验丰富;工程师张宇负责 Miseq 测序数据的质量控制和数据分析;助理实验师侯率专门负责 LC-MS/MS 分析;另外,1 位博士研究生和 2 位硕士研究生的加入充分保障了本项目的顺利开展。

3) 研究技术成熟

本项目在执行时所用到的 Pull down 实验,LC-MS/MS 分析均是常用的蛋白组学方法,RNAi 技术已经被广泛应用哺乳动物基因沉默中,我们已建立肺癌原位移植模型及配套检测技术,此外,我们还建立了适合深度测序分析的数学算法和统计模型,并编写了整套计算程序。本项目涉及的其他技术如核酸提取、细胞转染、Western blot、qPCR 等均为常规分子生物学方法,并在前期的准备工作中得到熟练运用。

4) 硬件设施完备

项目实施依托单位拥有液质联用仪(离子阱)、Miseq 测序仪、流式细胞仪、HPLC、高速离心机、超声波破碎仪、Realtime PCR 仪、Agilent2100、凝胶成像系统、激光共聚焦显微镜、高性能计算机集群等设备。配有细胞培养间、普通分子生物学操作平台等设施,完全能够支持本项目的顺利完成。

5) 临床样品资源丰富

我们已与辽宁省肿瘤医院病理科建立长期合作关系,他们在过去的 10 年间积累了数百例具有完整病例资料的肺癌存档石蜡样品;另外,我们在大连医科大学附属一院胸外科收集成对新鲜肺癌样品,已经收集到 10 对新鲜样品;长期积累及良好的合作关系能保证最终获得至少 100 例石蜡样品和 30 例新鲜样品。



(4) 本项目的特色与创新之处。

- 1) 通过鉴定 hMMP 来研究 5hmC 水平调控新机制;
- 2) 通过提高 5hmC 水平抑制肺癌细胞, 方法新颖;
- 3) 将首次探讨 hMMP 对肿瘤组织分级的作用及其临床意义;

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

年度研究计划

2016 年, 证实肺癌中 hMMP 突变或沉默导致 5hmC 含量降低(研究内容中的 A、B 部分), 前期工作已完成 Pull Down 实验的探针设计、制备以及预实验;

2017 年, 分析 hMMP 对肺癌细胞生物学特征和致瘤潜力的影响(研究内容中的 B、C 部分);

2018 年, 分析 hMMP 在肺癌中突变和表达情况, 探讨其对组织分级的作用及其临床意义(研究内容中的 D、E 部分);

预期研究结果

- 1) 证实肺癌中 hMMP 突变或沉默是导致 5hmC 含量降低的重要原因;
- 2) 明确 hMMP 的肺癌细胞抑制能力;
- 3) 评价 hMMP 作为肺癌分子标记物和分子靶标的可能;
- 4) 发表论文 4 篇, 其中 SCI 收录论文 2 篇;
- 5) 培养博士研究生 1 名, 硕士研究生 2 名;

2. 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)

与本项目相关的研究工作积累

前期, 我们在 ES 细胞 DNA 甲基化模式维持方面做了大量工作。通过 BS-seq 测序获得了高覆盖度的 ES 细胞甲基化组, 通过 BS-seq 数据分析我们发现: DNA 双链上对称的甲基化模式是由 DNMT1 和 DNMT3a/b 共同调控完成的(图 5), 在 DNA 复制过程中 DNMT3a/b 同样扮演着重要角色。通过这部分的工作, 我们深刻理解了 DNA 甲基化修饰维持机制, 为本项目阐明 hMMP 在细胞更新过程



中对 5hmC 水平的调控机制打下坚实的基础。

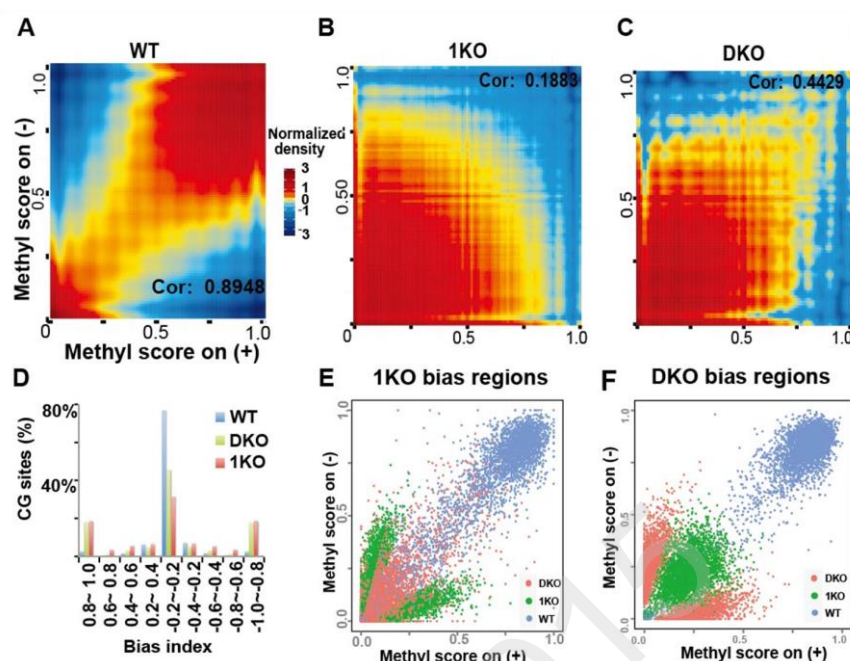


图5 DNMT1 和 DNMT3a/b 共同调控 DNA 双链上对称的甲基化模式

(A-C) WT、DNMT1^{-/-} (1KO) 和 DNMT3a^{-/-}3b^{-/-} (DKO) 的 ES 细胞中 DNA 双链 CG/GC 位点甲基化的对称分布情况，使用甲基化评分和相关系数来衡量；(D) 不同偏离指数的 CG/GC 位点分布情况；(E-F) 1KO 和 DKO 中非对称甲基化 CG 位点的分布情况

导致肿瘤 5hmC 含量降低的原因主要有三个，TETs 表达量下降，TETs 基因突变或 5hmC 的来源 5mC 含量降低。肺癌、脑癌中 5mC 的含量均没有明显变化 [31]，因此，我们首先通过 qPCR 分析了 10 对新鲜肺癌样品种 TET 基因的表达情况 (图 6)，与癌旁组织相比，肺癌组织中 3 个 TET 基因均无明显下调表达。

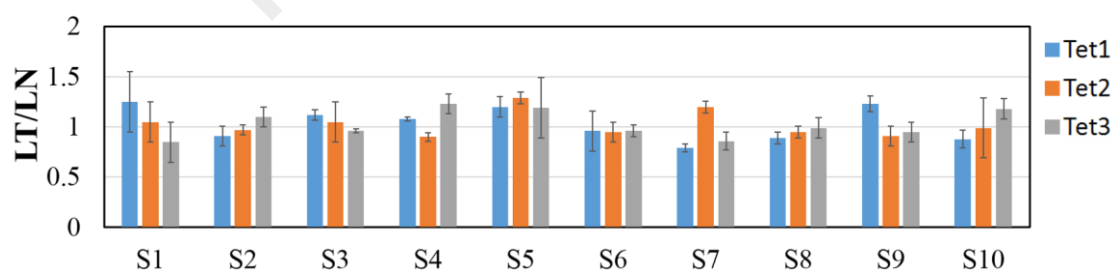


图6 成对肺癌样品中癌和癌旁组织中 TETs 基因的表达差异情况

LT:癌组织, LN:癌旁组织, S1-S10: 10 对新鲜肺癌临床样品

我们在国际癌症基因组联合会 ICGC 基因组数据库搜索 TETs 基因的突变情况 (图 7)，发现的确有些癌症如恶性淋巴瘤、前列腺癌、甲状腺癌中 TETs 基因的突变率很高，特别是 Tet2 基因，在甲状腺癌样品中突变率能到达 20%。然在 178 个肺癌样品中，三个 TETs 基因的突变率的总和只有 13.48%。TETs 基因



突变也不能解释 5hmC 含量的显著降低。因此，存在其他因素导致 5hmC 水平下降。hMMP 的沉默或失活很可能是导致肺癌中低 5hmC 水平的重要原因。

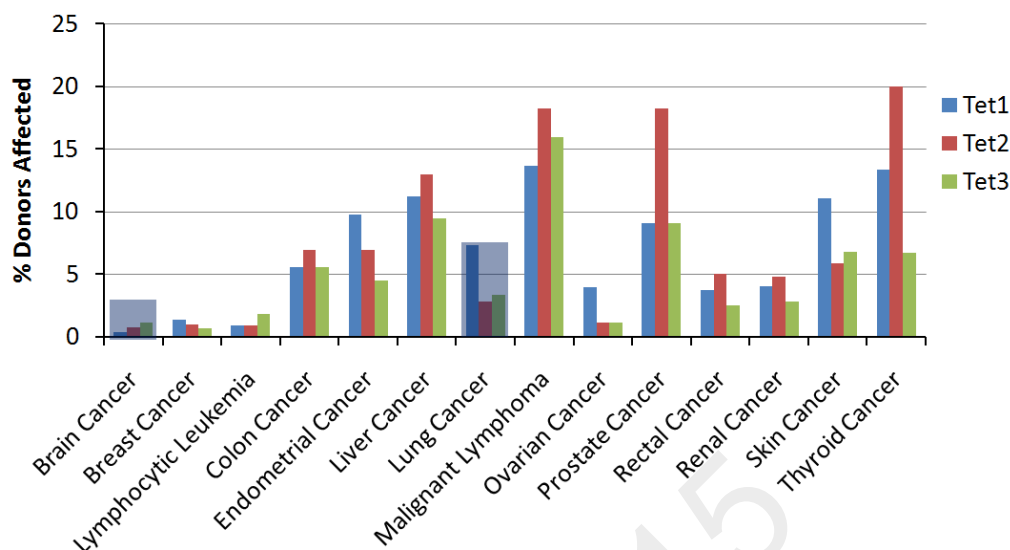


图 7 不同肿瘤中 TETs 基因突变的概率

癌症样品基因组数据来自国际癌症基因组联合会 ICGC

单碱基水平定位分析表明稳定存在的>99%的 5hmC 存在于 CpG 中，结合 hMeDIP 和 oxBS-seq 数据[23, 24]，我们选择 ZFP64 和 ECAT1 基因中富含 5hmC 的 CpG 岛 (CpG island, CGI) 区段为模板，使用生物素标记的引物，在 PCR 扩增体系中加入 dCTP、dmCTP 或 dhmCTP，制备了 5hmC/C 双链和 5hmC/5mC 双链 DNA 探针 (图 8A)。

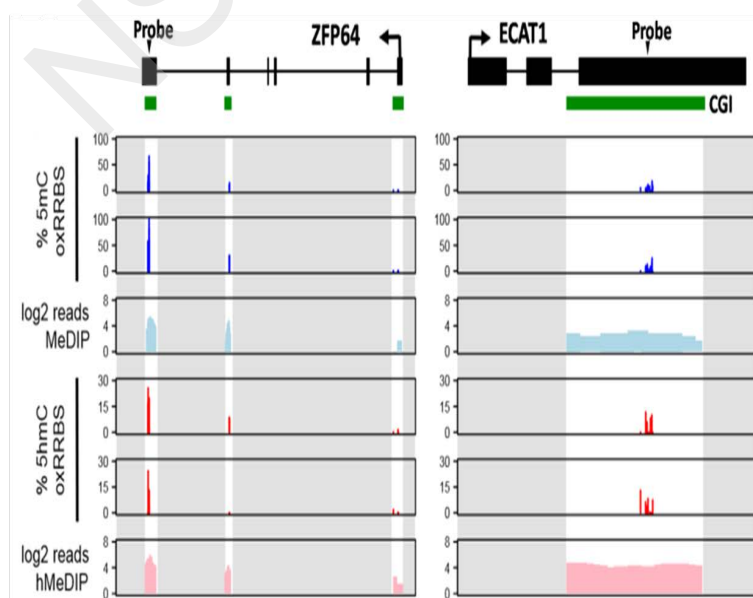


图 8 5hmC/C 双链和 5hmC/5mC 双链 DNA 探针的设计

探针设计在 5hmC 富集存在的 ZFP64 和 ECAT1 基因的 CpG 岛上；



已取得的研究工作成绩

本项目的申请人一直以来的工作都围绕 miRNA 调控、组蛋白修饰等表观遗传调控研究，在高通量数据获取及分析方面有着丰富经验，在 *Gene*、*Journal of Plant Biology*、*Functional & Integrative Genomics*、*BMC Plant Biology* 等国际期刊发表 SCI 论文 7 篇，其中第一作者论文 2 篇。课题申请人了解国际科研动态，业务基础扎实，精力充沛，勇于创新，善于进行学科交叉与交流，这些为本项目的完成提供了保证。

(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开放实验室等研究基地的计划与落实情况）

本项目依托单位大连医科大学肿瘤防治中心。该中心依托于辽宁省科技大平台，建设有**动物实验技术平台**、**分子生物学技术平台**、**化学生物学技术平台**、**干细胞技术平台**等公共技术支撑系统。现有仪器设备齐全，包括：活细胞工作站、高通量基因分析系统、高速双转盘共聚焦活细胞工作站并全内反射系统、激光共聚焦显微镜、**流式细胞术系统（分析系统、分选系统）**、透射电镜、**高效液相色谱**、**气相色谱**、**LC-MS/MS 液质联用仪（离子阱系统、四级杆系统）**、膜片钳系统、病理分析系统、高通量基因分析系统、显微图像定量分析系统、多功能酶标仪、**冰冻切片机**、**超速离心机**、发射光谱仪(ICP)及原子吸收分光光度计等。

项目负责人所在实验室能够提供的条件如下：普通分子生物学操作平台，120 平方米，附有 4℃、-20℃和-80℃冰箱、小型台式离心机、PCR 仪、培养箱、水浴箱、电泳仪、核酸杂交仪、紫外分光光度计、Millipore 净水器、震荡器以及其它常规设备；**高通量测序与分析平台**，包括**超声波破碎仪**、**生物分析仪**、**实时荧光定量 PCR 系统**、**凝胶成像仪**、**高通量基因测序仪（Illumina Miseq）**、**高性能计算机集群（SuperCloud R7510-G9）**以及**高通量数据分析软件平台**等。细胞房一间，附有超净工作台、CO₂培养箱、液氮罐、倒置显微镜；哺乳动物表达系统、小鼠胚胎干细胞 E14、肺癌细胞系 D95 和 L78，慢病毒感染系统。上述条件为项目的顺利开展提供了有利保障。



(3) 承担科研项目情况（申请人正在承担或参加科研项目的情况，包括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）

1、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、81472637、国家自然科学基金面上项目、2015/01-2018/12、参与、负责内容：BS-seq 数据分析。

(4) 完成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

3. 资金预算说明

购置单项经费 5 万元以上固定资产及设备，须逐项说明与项目研究的直接相关性及其必要性。

一、直接费用 20.15 万元

1、仪器设备费 0.9 万元

移液器 0.18 万元/支，5 支累计 0.9 万元，用于常规分子生物学实验。

2、材料费 8.0 万元

细胞及常规分子生物学实验是本项目主要的研究方法，需要购买的各种细胞培养基、酶类及试剂盒包括：

1) 培养小鼠 ES 细胞、肺癌原代细胞、肺癌细胞系 D95 及 L78 所需的胎牛血清、容器、培养基、移液管等费用 2 万元，说明如下：

Gibco 胎牛血清（500mL FBS）2 瓶，0.35 万元/瓶，共 0.7 万元；

Gibco DMEM 培养基（500ml 装）30 瓶，0.01 万元/瓶，共 0.3 万元；

Nest 100mm 培养皿（500 个装）4 箱，0.05 万元/箱，共 0.2 万元；

洁特 10mL 移液器（200 支装）3 箱，0.03 万元/箱，共 0.09 万元；

Gibco TRYPsin（500ml）5 瓶，0.04 万元/瓶，共 0.2 万元；

Corning 50mL 离心管（500 个装）4 箱，0.07 万元/箱，共 0.28 万元；

其他易耗品预计需要 0.23 万元；



- 2) 基本的生物学与化学试剂, 配制各种溶液, 累计 0.3 万元;
- 3) 分子生物学试剂, 包括胶原酶、DNA 限制内切酶、连接酶、合成酶、DNA 裂解酶、合成引物等, 累计 0.7 万元;
- 4) 试剂盒费用 5.0 万元, 说明如下:

Qiagen 核酸提取试剂盒 (50 次装) 2 个, 0.1 万元/个, 共 0.2 万元;
ViraDuctin 转染试剂盒 (200 次装) 1 个, 0.25 万元/个, 共 0.25 万元;
NEB DNA 文库制备试剂盒 (24 次装) 1 个, 0.85 万元/个, 共 0.85 万元;
Illumina MiSeq 测序试剂盒 (V3 版本) 4 个, 0.35 万元/个, 共 1.4 万元;
Kapa qPCR 检测试剂盒 (5mL 装) 4 个, 0.25 万/个, 共 1.0 万元;
Covaris DNA 打断样品瓶 (0.2mL) 100 个, 0.004 万元/个, 共 0.4 万元;
Agilent BioAnalyzer 文库质量分析 Chip 2 个, 0.25 万元/个, 共 0.5 万元;
其他试剂盒预计需要 0.4 万元;

3、测试化验加工费 4.95 万元

用于 hMMP 筛选实验、靶向测序验证及载体序列测序分析, 说明如下:

- 1) LC-MS/MS 分析 18 个样品, 0.2 万元/样, 共 3.6 万元;
- 2) HPLC 分析 10 个样品, 0.12 万元/样, 共 1.2 万元;
- 3) Sanger 测序 60 个样品, 25 元/样, 共 0.15 万元;

4、差旅费 0.8 万元

学术交流用的外埠差旅费 0.5 万元, 市内交通费 0.3 万元, 累计 0.8 万元。

5、出版/文献/信息传播/知识产权事务费 1.0 万元

论文版面费 0.4 万元, 文献检索费 0.3 万元, 专业书籍购买及资料打印费 0.3 万元, 累计 1.0 万元。

6、劳务费 4.5 万元

用于支付直接参与本项目的硕博士研究生科研劳务费, 说明如下:

- 1) 博士生 1 人, 劳务费 0.167 万/月, 3 年累计 9 个月, 共 1.5 万元;
- 2) 硕士生 2 人, 劳务费 0.083 万/月, 3 年累计 36 个月, 共 3.0 万元;

二、间接费用 3.85 万元

申请经费合计 24.0 万元。

4. 其他需要说明的问题



吕德康 简历

大连医科大学，肿瘤干细胞研究院，讲师

教育经历（从大学本科开始，按时间倒排序）：

2006/9 - 2011/12，东北农业大学，植物学，博士，导师：朱延明

2002/9 - 2006/6，山东农业大学，生物技术，学士；

2002/9 - 2006/6，山东农业大学，计算机科学与技术，学士；

工作经历（科研与学术工作经历，按时间倒排序）：

2013/11 - 至今，大连医科大学，肿瘤干细胞研究院，讲师

2012/05 - 2013/09，中科院生化细胞所，生物学博士后流动站，博士后

曾使用证件信息（限 3 个）

无

主持或参加科研项目及人才计划项目情况（按时间倒排序）：

项目类别、批准号、名称、研究起止年月、获资助金额、项目状态（已结题或在研等）、主持或参加。

1、国家自然科学基金面上项目、81472637、DNMT1 通过与 RNA 聚合酶 polIII 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、2015/01-2018/12、72 万元、在研、参加。



王晓彬 简历

辽宁省肿瘤医院，主任医师

教育经历（从大学本科开始，按时间倒排序）：

2007/9 - 2011/7，辽宁中医药大学，中西医结合专业，硕士，导师：才丽萍

1982/9 - 1987/7，中国医科大学，临床医学系，学士

工作经历（科研与学术工作经历，按时间倒排序）：

1987/9 - 至今，辽宁省肿瘤医院，主任医师

曾使用证件信息（限 3 个）

无

主持或参加科研项目及人才计划项目情况（按时间倒排序）：

1. 辽宁省自然科学基金项目（优秀人才培养专题）、2014020105、PI3K 信号转导通路与宫颈癌分子靶向治疗的研究、2014/1-2016/12、5 万、在研、主持；
2. 辽宁省科技公关项目、2013225021、宫颈癌放射治疗插植消融阴道内置模板的应用、2013/1-2015/12、5 万、在研、主持；



张霞 简历

大连医科大学，肿瘤干细胞研究院，讲师

教育经历（从大学本科开始，按时间倒排序）：

2006/9 - 2013/1，中科院植物研究所，发育生物学，博士，导师：王台

2001/9 - 2005/7，内蒙古大学，生物学基地，学士

工作经历（科研与学术工作经历，按时间倒排序）：

2013/6 - 至今，大连医科大学，肿瘤干细胞研究院，讲师

曾使用证件信息（限 3 个）

无

主持或参加科研项目及人才计划项目情况（按时间倒排序）：

1、国家自然科学基金面上项目，81472637、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、2015/01-2018/12、72 万元、在研、参与。



张宇 简历

大连医科大学，肿瘤干细胞研究院，工程师

教育经历（从大学本科开始，按时间倒排序）：

2006/9 - 2009/4，哈尔滨理工大学，计算机应用技术，硕士研究生，
导师：郝忠孝

2002/9 - 2006/7，鲁东大学，信息与计算科学，学士

工作经历（科研与学术工作经历，按时间倒排序）：

2014/10 - 至今，大连医科大学，肿瘤干细胞研究院，工程师

2009/7 - 2014/10，东软集团(大连)有限公司，软件工程师

曾使用证件信息（限 3 个）

无

主持或参加科研项目及人才计划项目情况（按时间倒排序）：

无



侯率 简历

大连医科大学，肿瘤中心肿瘤干细胞研究院，助理实验师

教育经历（从大学本科开始，按时间倒排序）：

2008/09 - 2011/06，大连理工大学，生命科学与技术学院，硕士

导师：贾凌云

2004/09 - 2008/07，大连理工大学，生物工程系，学士

工作经历（科研与学术工作经历，按时间倒排序）：

2011/12 - 至今，大连医科大学，肿瘤中心肿瘤干细胞研究院，助理实验师

2011/07 - 2011/11，山东烟台先声麦得津生物制药有限公司，蛋白纯化员

曾使用证件信息（限 3 个）

无

主持或参加科研项目及人才计划项目情况（按时间倒排序）：

1、国家自然科学基金面上项目，81472491、长链非编码 RNA MEG3 结合蛋白调控乳腺癌发生发展的分子机制及临床意义、2015/01-2018/12、95 万元、在研、参与。

2、国家自然科学基金面上项目，31471328、早幼粒细胞白血病蛋白 PML 调节 TET2 在肿瘤发生发展中的作用及机制、2015/01-2018/12、90 万元、在研、参加。

3、国家自然科学基金青年项目，81402385、Septin2 通过调控内皮细胞 ITGB1 的表达影响肿瘤血管新生的机制研究、2015/01-2017/12、24 万元、在研、参加。



近5年（2010年1月1日以后）代表性研究成果列表

- 1、 Dekang Lv, Ying Ge, Bei Jia, Xi Bai, Peihua Bao, Hua Cai, Wei Ji, Yanming 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. SCI 期刊论文
- 2、 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. SCI 期刊论文
- 3、 Ge, Ying^{(#)(*)}, Li, Yong, Lv, De-Kang, Bai, Xi, Ji, Wei, Cai, Hua, Wang, Ao-Xue, Zhu, Yan-Ming, Alkaline-stress response in Glycine soja leaf identifies specific transcription factors and ABA-mediated signaling factors., Funct Integr Genomics, 2011, 11(2) : 369-379. SCI 期刊论文
- 4、 Ge, Ying^(#), Li, Yong, Zhu, Yan-Ming, Bai, Xi, Lv, De-Kang, Guo, Dianjing, Ji, Wei, Cai, Hua, Global transcriptome profiling of wild soybean (Glycine soja) roots under NaHCO₃ treatment., BMC Plant Biology, 2010, 10: 153-153. SCI 期刊论文
- 5、 Shu, Yongjun^(#), Li, Yong, Zhu, Yanming, Zhu, Zhenlei, Lv, Dekang, Bai, Xi, Cai, Hua, Ji, Wei, Guo, Dianjing, Genome-wide identification of intron fragment insertion mutations and their potential use as SCAR molecular markers in the soybean., Theoretical and Applied Genetics, 2010, 121 (1) : 1-8. SCI 期刊论文
- 6、 Gao, Peng^{(#)(*)}, Bai, Xi, Yang, Liang, Lv, Dekang, Li, Yong, Cai, Hua, Ji, Wei, Guo, Dianjing, Zhu, Yanming, Over-expression of osa-MIR396c decreases salt and alkali stress tolerance., Planta, 2010, 231 (5) : 991-1001. SCI 期刊论文



附件信息

序号	附件名称	备注	附件类型
1	代表论文1首页		代表性论著
2	代表论文2首页		代表性论著
3	代表论文3首页		代表性论著
4	伦理证明		其他

NSFC 2015



签字和盖章页

申请人：吕德康

依托单位：大连医科大学

项目名称：5hmC维持蛋白通过提高5hmC水平抑制肺癌细胞致瘤潜能的机制研究

资助类别：青年科学基金项目

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	证件号码	每年工作时间（月）	签字
1	王晓彬	辽宁省肿瘤医院	210102196407031824	3	
2	张霞	大连医科大学	110108198311271480	3	
3	张宇	大连医科大学	370321198302161829	3	
4	侯率	大连医科大学	210623198611112216	2	
5	康志杰	大连医科大学	211422197910063548	3	
6	陈富顺	大连医科大学	13050319900420063X	6	
7	陈成军	大连医科大学	371327199011250016	6	
8					
9					

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

日期：

合作研究单位公章1

日期：

合作研究单位公章2

日期：