



申请代码	H1614
受理部门	
收件日期	
受理编号	8157111565



国家自然科学基金 申 请 书

(2015 版)

资助类别：	面上项目		
亚类说明：			
附注说明：	常规面上项目		
项目名称：	基于微流控芯片研究靶向AURKA治疗中肿瘤微环境的作用及其机制		
申 请 人：	刘强	电 话：	0411-86110508
依托单位：	大连医科大学		
通讯地址：	辽宁省大连市旅顺口区旅顺南路西段9号大连医科大学		
邮政编码：	116044	单位电话：	0411-86110146
电子邮箱：	liuq9@mail.sysu.edu.cn		
申报日期：	2015年03月03日		

国家自然科学基金委员会



基本信息

申请人信息	姓名	刘强	性别	男	出生年月	1968年01月	民族	汉族
	学位	博士	职称	教授	每年工作时间（月）		6	
	电话	0411-86110508		电子邮箱	liuq9@mail.sysu.edu.cn			
	传真	0411-86110509		国别或地区	美国			
	个人通讯地址	辽宁省大连市旅顺口区旅顺南路西段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	肿瘤学；免疫学；微流控芯片						
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	基于微流控芯片研究靶向AURKA治疗中肿瘤微环境的作用及其机制						
	英文名称	Microfluidic Chip-Based Functional and Mechanistic Study of Tumor Microenvironment in AURKA Targeted Therapy						
	资助类别	面上项目				亚类说明		
	附注说明	常规面上项目						
	申请代码	H1614						
	基地类别							
	研究期限	2016年01月 -- 2019年12月				研究方向：细胞模型与应用		
	申请经费	150.0000万元						
中文关键词		靶向治疗；免疫细胞；肿瘤微环境；微流控芯片；AURKA						
英文关键词		Targeted therapy; Immune cell; Tumor microenvironment; Microfluidic; AURKA						



中文摘要	<p>分子靶向治疗因其疗效显著成为肿瘤研究的热点，但其作用于肿瘤微环境进而对疗效的影响却知之不多。我们前期研究确立靶向AURKA有效抑制肿瘤细胞上皮-间充质转化(EMT)及迁移，新近发现其影响免疫细胞及其细胞因子分泌。因此，我们推测靶向治疗能改变肿瘤微环境，进而影响肿瘤治疗的进程。微流控芯片这一新兴技术可有效模拟肿瘤微环境，其设计和制作方法我们已掌握。据此，本项目将利用微流控芯片模拟肿瘤微环境，探究靶向肿瘤AURKA治疗过程中微环境免疫细胞的动态变化及肿瘤细胞和免疫细胞的相互作用；通过靶向治疗对免疫细胞NF-κB的调控，对免疫功能及细胞因子分泌的影响，阐明靶向治疗抑制肿瘤细胞EMT及迁移的机制；通过动物模型实验、生物信息学分析和临床标本验证进一步探索靶向药物对微环境的改造机制。本项目旨在建立模拟肿瘤微环境的微流控新型平台，探索微环境在肿瘤分子靶向治疗中的作用，为靶向药物的研究和应用提供科学依据。</p>
英文摘要	<p>Targeted therapies have been intensively investigated with multiple acclaimed successes, however, little is known about how microenvironment is involved in these processes. We have established that targeting AURKA inhibits epithelial-mesenchymal transition (EMT) and migration of cancer cells. Based on our previous data that AURKA targeted reagent alters cytokine secretion of immune cells, we hypothesis that targeted therapies shape tumor microenvironment, which may in turn affects the process of therapy. Microfluidic chip is a novel platform for studying intercellular interactions, which has been successfully developed in our laboratory. In this project, we try to develop a microfluidic system that mimics the tumor niche during AURKA targeted therapy, in which we will investigate how targeted reagent modifies immune cells and how these processes affect the procedure of therapy. Specifically, how targeting AURKA alters secretion of chemokines via NF-κB pathway that modulate the EMT and migration of cancer cells. We will then validate the discoveries in mice model with spontaneous breast cancer. Moreover, exploration through bioinformatics database and clinical samples enable us to systematically solidify our findings. Collectively, our project is to develop a microfluidic platform for investigating the role of tumor niche in AURKA targeted therapy, which we believe will provide informative evidence for rational research and clinical application of targeted therapies.</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	王绍武	1962-09-24	男	教授	博士	大连医科大学	18098871177	wsu_2003@163.com	210203196209244775	6
2	徐洁	1974-01-19	女	副教授	博士	大连医科大学	0411-86110511	x20056198@126.com	21020219740119004X	6
3	张茜	1985-03-26	女	医师	硕士	大连医科大学	13591147605	13591147605@163.com	210211198503262922	6
4	郑飞猛	1982-06-02	男	博士后	博士	大连医科大学	13427598129	zhengfeimeng@gmail.com	460001198206020014	6
5	侯志杰	1986-09-24	女	助理实验师	硕士	大连医科大学	0411-86110511	houzhijie_818@126.com	370724198609246561	6
6	康志杰	1979-10-06	女	博士生	硕士	大连医科大学	0411-86110511	cathie1997@sina.com	211422197910063548	6
7	李婷婷	1991-01-20	女	硕士生	学士	大连医科大学	0411-86110511	kittyli0606@163.com	370704199101200828	9
8	杨梦萦	1992-03-09	女	硕士生	学士	大连医科大学	0411-86110511	602227985@qq.com	152201199203095023	9

总人数	高级	中级	初级	博士后	博士生	硕士生
9	3	0	2	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：基于微流控芯片研究靶向AURKA治疗中肿瘤微环境的作用及其机制

项目负责人：刘强

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	150.0000	/
2	(一) 直接费用	125.0000	
3	1、设备费	0.0000	
4	(1) 设备购置费	0.0000	
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	76.8400	试剂盒、抗体、实验动物、试剂、耗材费用
8	3、测试化验加工费	8.4400	免疫病理切片、测序、引物等费用
9	4、燃料动力费	0.0000	
10	5、差旅费	6.1400	参加国内学术会议，差旅
11	6、会议费	5.1600	组织开展学术研讨会
12	7、国际合作与交流费	4.0000	参加国外学术会议，差旅
13	8、出版/文献/信息传播/知识产权事务费	9.3000	资料费
14	9、劳务费	13.2000	直接参与本次项目研究的研究生、博后劳务费
15	10、专家咨询费	1.9200	临时聘请的专家费用
16	11、其他支出	0.0000	
17	(二) 间接费用	25.0000	
18	其中：绩效支出	6.2500	
19	二、自筹资金	0.0000	



预算说明书

1、材料费 76.84万

(1) 常规检测试剂盒 7.08万：用于核酸反转录，活细胞染色，细胞检测活性等。包括BCA蛋白浓度测定试剂盒、反转录试剂盒、活细胞染色试剂盒、流式检测试剂盒及CCK8检测试剂盒等。

(2) 抗体 15.81万：用于western blot与免疫组化实验中蛋白的检测，包括二抗及EMT相关分子、细胞干性表面分子标志物、肿瘤细胞表面标记物及AURKA等蛋白的一抗。

(3) 实验动物费 6.40万：用于SPF级BLG-Cre; Brca1F22-24/F22-24; p53+/-转基因小鼠的构建。

(4) 细胞因子检测试剂盒 8.20万：用于小分子靶向药物对肿瘤微环境中免疫相关细胞因子的影响的检测，主要包括IFN- γ 、IL-17及TGF- β 等，人与鼠的各种因子检测试剂盒等。

(5) 常用生化试剂 19.55万：用于配置培养基、琼脂糖凝胶电泳缓冲液、SDS-PAGE蛋白电泳液、细胞培养、免疫组化、微流控芯片的制作以及其他常规生化试剂等。

(6) 常规耗材 19.80万：用于常规western blot、细胞实验及微流控芯片及动物实验中的耗材，如国产吸头、离心管、培养皿和六孔板及培养瓶，测蛋白浓度用的酶标板，实验过程中必需的一次性口罩、手套和帽子等。

2、测试化验加工费 8.44万

(1) 免疫病理切片制作 4.20万：用于临床标本及动物模型实验中，通过免疫病理切片检测组织。临床标本500例，每例切4张片子，共2000片；小鼠动物模型共4组，每组取5只小鼠，切5张片子，共100片。每张片子20元。

(2) 测序及引物设计费 2.80万：用于转基因小鼠鉴定、相关基因的QPCR检测及相关产物的PCR产物测序。计划用引物40对，每对引物平均 38-45 碱基，约50元每对/OD，大约每对引物需要100D，所需费用合计2.00万元。

计划测序样本200个，平均40元每个样本，所需费用合计0.80万元。

(3) 实验相关其他测试费用 1.44万：用于与课题相关的紫外可见分光光度计检测，活细胞工作站维护，ELISA检测，蛋白纯度检测等，在大连医科大学公共实验平台完成。

3、燃料动力费：无。

4、差旅费 6.14万

用于本项目完成过程中在大连市内外埠进行实验，及参加国内免疫学会议或微流控芯片技术会议等过程中发生的交通费、住宿费、伙食补助及公杂费等。

(1) 外埠交通费 3.18万：去其它学校实验产生的费用，每年2次，每次2人，每人往返交通费1000元，平均每天住宿费200元/人，伙食补贴80元/人，市内交通费50元/人，每次3天。

(2) 参加国内全国肿瘤学年会或免疫学等学术交流研讨会 2.56万：每年1次，2人/次，会期3天，每人往返交通费1000元，会议注册或会务费1000元/人，住宿费平均每天250元/人，伙食补贴100元/人，市内交通费50元/人。

(3) 市内交通费 0.40万：用于本项目在完成过程中小规模研讨会，在大连医科大学或市内其他学校实验室或平台实验、送样、取实验动物或递送文字材料等的交通费等。

5、会议费 5.16万

项目进行期间，用于承办项目成果专家指导会议和项目成果鉴定会费用。

(1) 项目成果鉴定会会议场地、资料费 3.00万：用于本项目完成前对小分子靶向药物进行临床转化进行申报的专家指导会议和最后项目成果鉴定会。1次/年，会期2天，10名/次。会议室租用费用：7000元/天，会议资料费500元/次。

(2) 会议/会务费 2.16万：每次邀请2名专家对本项目进行指导，会期2天，平均每人往返机票2000元，住宿费每天300元/人，市内交通补贴100元/次。

6、国际合作与交流费 4.00万：用于项目研究开发过程中，项目组研究人员参加美国AACR学术研讨会，包括飞机票、签证费、住宿费和注册费等。

7、出版/文献/信息传播/知识产权事务费 9.30万：

用于SCI论文发表、书籍购买、文献检索和资料费，新药申请、专利申请与维持费及知识产权顾问费等。

(1) 学术论文发表费 4.00万：国际期刊平均8000元/篇，共计4篇；国内期刊平均2000元/篇，共计4篇。

(2) 论文、文献印刷费、购买文献资料费2.80万。

(3) 专利费 2.00万：申报2项国家发明专利，申请费1000元/项，审查费2500元/项，专利申请代理费5000元/项，专利维持费0.30万。

(4) 查新费 0.26万。

(5) 其它费用 0.24万：项目研究过程中所发生的项目相关的其他费用。

8、劳务费 13.20万：用于非在职的参加研究的在读研究生和博士后的劳务费发放。

9、专家咨询费 1.92万：在按照《药品注册管理办法》中生物制品注册分类及申报资料要求进行申报时邀请专家咨询。



报告正文

（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）；

研究意义：

肿瘤分子靶向治疗以肿瘤细胞表面或细胞内所具有的特异性或相对特异性过度表达的分子为靶点，干预标志性分子调控的信号转导通路，从而抑制肿瘤细胞的生长、转移或诱导其凋亡^[1]。然而分子靶向治疗也有一定的局限性，如耐药和非选择性作用等^[2-4]。因此，深入研究分子靶向药物的作用对肿瘤研究和治疗具有重要意义。肿瘤微环境的复杂性是肿瘤治疗的难题，近年研究发现肿瘤微环境中的免疫细胞对肿瘤侵袭和转移的过程起重要的促进作用^[5, 6]。然而在分子靶向治疗的探索中，杀伤肿瘤细胞一直是治疗肿瘤的研究重点，但对微环境在肿瘤靶向治疗中的作用知之甚少。因此，研究肿瘤靶向药物对微环境细胞的改造及其对治疗的影响是一个亟待解决的问题。同时，建立理想的模拟肿瘤微环境的模型体系成为本项目研究的关键。然而，免疫缺陷小鼠是应用广泛的肿瘤模型，但却不能反映免疫细胞在微环境中的角色^[7]；小鼠自发肿瘤模型^[8]虽然有健全的免疫系统，但无法区别物种间微环境组成的重大差异；体外三维细胞培养^[9]能更好地反映细胞在体内的环境，但在细胞组成及干预方法上有一定的局限。微流控芯片能够实现多种细胞的共培养、肿瘤细胞的实时观察及药物浓度的动态控制，从而真实的模拟肿瘤微环境，为肿瘤微环境的研究提供重要平台。因此，微流控芯片技术在本项目研究中显得尤为关键。

本研究旨在探索分子靶向药物治疗肿瘤时，肿瘤微环境内免疫细胞与肿瘤治疗的关系。我们将以微流控芯片为平台，通过靶向 Aurora kinase A (AURKA) 的研究为例，阐明分子靶向药物对肿瘤微环境改造的分子机制。本研究的开展有望建立一个研究肿瘤细胞与微环境作用的模型，用于阐述微环境因素在肿瘤治疗中的作用，并探索分子靶向药物对微环境改造的作用机制。肿瘤靶向治疗与微环境关系的阐述，不仅能鉴定微环境内与肿瘤治疗相关的关键因素，更为



靶向肿瘤微环境治疗肿瘤的研究方向提供新依据，同时为新靶点药物的研发和临床合理用药提供新思路。

国内外研究现状：

靶向治疗药物具有选择性强、疗效突出及毒副作用低等特点，近年来一大批抗肿瘤的分子靶向新药上市，且许多分子靶向药物进入 I -III 期临床试验^[10]。此外，小分子靶向药物在包括肾癌、慢性粒细胞白血病和多发性骨髓瘤等诸多肿瘤中已经成为临床一线用药^[11]。**我们长期致力于分子靶向治疗的研究^[12-16]，发现 AURKA 小分子靶向抑制剂可以诱导肿瘤细胞凋亡^[13, 16]，抑制肿瘤干细胞功能^[14]，抑制上皮-间充质转化^[15]。此外，靶向 AURKA 可以通过抑制 NF- κ B 信号通路活性从而抑制肿瘤细胞的增殖^[17]。同时，我们还自主研发了一系列靶向 AURKA 的小分子抑制剂^[14, 18]，为肿瘤靶向治疗的研究奠定了坚实的基础。**

免疫细胞是肿瘤微环境的重要组成部分，也是影响肿瘤治疗的关键因素^[6, 19, 20]。肿瘤细胞-免疫细胞的相互作用在肿瘤进展中起重要作用，如乳腺癌细胞和微环境的巨噬细胞通过分泌因子的相互交流促进了乳腺癌的转移^[20]。调节性 T 细胞(Treg)是 CD4⁺T 细胞中具有免疫抑制功能的细胞，可抑制效应性 CD4⁺、CD8⁺T 细胞抗肿瘤活性，参与肿瘤免疫逃逸^[21]。肿瘤微环境中的炎症因子可改变肿瘤的生物行为，Th17 细胞通过分泌 IL-17 细胞因子促进肿瘤细胞生长和增殖，促进肿瘤血管生成^[22]，TNF- α 可降低黑色素瘤肿瘤相关抗原，降低免疫细胞对肿瘤的识别能力，参与肿瘤的免疫逃逸^[23]，IL-6 通过 EMT 促进乳腺癌干细胞的干性和转移功能^[24]。**此外，我们曾研究发现免疫细胞产生的血清特异性抗体可以作为鼻咽癌预后的关键标志物^[25]，并从临床角度进一步证实了免疫系统在肿瘤治疗中的重要作用。由于发现靶向 AURKA 的小分子靶向抑制剂对白血病细胞有显著抑制作用^[13, 16]，我们推测靶向 AURKA 的治疗对免疫细胞也有一定影响。我们前期研究表明，AURKA 小分子靶向抑制剂 VX-680 可改变免疫细胞表面标志性特征及细胞因子 IFN- γ 与 IL-17 的分泌(见研究基础，图 9)，进而推测肿瘤治疗可以通过改变患者的免疫状态调控肿瘤的进展。**

肿瘤微环境的研究模型进展迅速，尤其在肿瘤体外三维培养领域^[9]。**我们近年致力于肿瘤三维培养的研究探索并在乳腺癌和鼻咽癌中取得了阶段性成果，成功构建了模拟体内乳腺肿瘤形成的三维系统，并应用鼻咽癌三维培养模型研究了鼻咽癌细胞的分化^[27, 28]。微流控芯片 (microfluidic chip) 由微通道构**

成网络，以可控流体贯穿整个系统，其高通量、集成化、可调控及易操作等优点（图 1），是用于模拟微环境进行肿瘤治疗研究的有利平台^[26]。微流控芯片目前使用的高分子有机硅化合物 PDMS 等材料具有良好的生物相容性及对氧气和二氧化碳的通透性。细胞培养、刺激、分选和裂解等过程都可以在芯片平台上实现。微流控芯片已经成为细胞生物学研究领域极为重要的研究平台。将不同细胞在微流控芯片中共培养，从而能更好地研究细胞间的相互作用，该方法在肺癌细胞和巨噬细胞中均已报道^[29]。我们通过与中国科学院大连化学物理研究所和大连理工大学合作，已开展微流控芯片模拟与仿生的相关研究，并在肿瘤的侵袭和迁移的动态模型中取得了阶段性成果^[30]（见研究基础，图 10，图 11）。

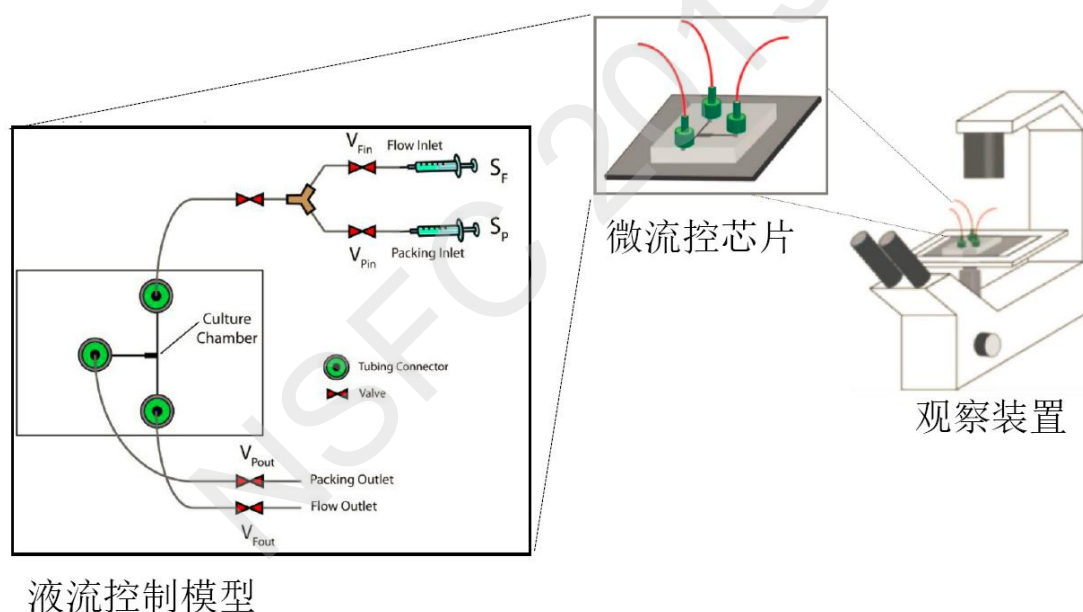


图 1 微流控芯片控制模型示意图^[26]

总结

近年来，肿瘤分子靶向治疗的研究主要集中于对肿瘤细胞的杀伤作用，而极少关注肿瘤微环境在治疗中的角色。我们在靶向肿瘤 AURKA 的研究中积累了扎实的研究基础，并已证实靶向 AURKA 对免疫细胞的显著作用。鉴于免疫细胞在肿瘤治疗中的重要地位，从免疫细胞的角度阐述靶向肿瘤治疗的生物效应，从而系统地评估肿瘤靶向治疗，是肿瘤靶向治疗研究的新思路。我们运用微流控芯片这一新型技术建立肿瘤微环境，进而模拟靶向 AURKA 治疗过程中



免疫细胞与肿瘤细胞相互作用及其对治疗的影响，是肿瘤微环境研究的前沿方法。基于微流控芯片系统研究靶向 AURKA 治疗，不仅是研究方法上的突破，而且是研究思路上的创新，在肿瘤靶向治疗研究领域具有重要意义。

参考文献：

- [1] Neal J W, Sledge G W. Decade in review-targeted therapy: successes, toxicities and challenges in solid tumours. *Nat Rev Clin Oncol*, 2014, 11(11):627-628.
- [2] Jones B. Targeted therapies: New rational design approach to optimize combination therapy strategies. *Nat Rev Clin Oncol*, 2014, 11(2):66.
- [3] Gillies R J, Verduzco D, Gatenby R A. Evolutionary dynamics of carcinogenesis and why targeted therapy does not work. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(7):487-493.
- [4] O'Hare T, Zabriskie M S, Eiring A M, et al. Pushing the limits of targeted therapy in chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(8):513-526.
- [5] Gajewski T F, Schreiber H, Fu Y X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol*, 2013, 14(10):1014-1022.
- [6] Barar J. Targeting tumor microenvironment: the key role of immune system. *Bioimpacts*, 2012, 2(1):1-3.
- [7] Cao X, Shores E W, Hu-Li J, et al. Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain. *Immunity*, 1995, 2(3):223-238.
- [8] Francia G, Cruz-Munoz W, Man S, et al. Mouse models of advanced spontaneous metastasis for experimental therapeutics[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(2):135-141.
- [9] Debnath J, Brugge J S. Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(9):675-688.
- [10] Ocana A, Pandiella A, Siu L L, et al. Preclinical development of molecular-targeted agents for cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 2011, 8(4):200-209.
- [11] Kummar S, Chen H X, Wright J, et al. Utilizing targeted cancer therapeutic agents in combination: novel approaches and urgent requirements. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9(11):843-856.



- [12] Liu Q, Ruderman J V. Aurora A, mitotic entry, and spindle bipolarity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(15):5811-5816.
- [13] Huang X F, Luo S K, Xu J, et al. Aurora kinase inhibitory VX-680 increases Bax/Bcl-2 ratio and induces apoptosis in Aurora-A-high acute myeloid leukemia[J]. *Blood*, 2008, 111(5):2854-2865.
- [14] Zheng F M, Long Z J, Hou Z J, et al. A novel small molecule aurora kinase inhibitor attenuates breast tumor-initiating cells and overcomes drug resistance. *Mol Cancer Ther*, 2014, 13(8):1991-2003.
- [15] Wan X B, Long Z J, Yan M, et al. Inhibition of Aurora-A suppresses epithelial-mesenchymal transition and invasion by downregulating MAPK in nasopharyngeal carcinoma cells. *Carcinogenesis*, 2008, 29(10):1930-1937.
- [16] Xu D R, Huang S, Long Z J, et al. Inhibition of mitotic kinase Aurora suppresses Akt-1 activation and induces apoptotic cell death in all-trans retinoid acid-resistant acute promyelocytic leukemia cells. *J Transl Med*, 2011, 9:74.
- [17] Yao J E, Yan M, Guan Z, et al. Aurora-A down-regulates IkappaBalpha via Akt activation and interacts with insulin-like growth factor-1 induced phosphatidylinositol 3-kinase pathway for cancer cell survival. *Mol Cancer*, 2009, 8:95.
- [18] Luo Y, Deng Y Q, Wang J, et al. Design, synthesis and bioevaluation of N-trisubstituted pyrimidine derivatives as potent aurora A kinase inhibitors. *Eur J Med Chem*, 2014, 78:65-71.
- [19] Swartz M A, Iida N, Roberts E W, et al. Tumor microenvironment complexity: emerging roles in cancer therapy. *Cancer Res*, 2012, 72(10):2473-2480.
- [20] Su S, Liu Q, Chen J, et al. A positive feedback loop between mesenchymal-like cancer cells and macrophages is essential to breast cancer metastasis. *Cancer Cell*, 2014, 25(5):605-620.
- [21] Dannull J, Su Z, Rizzieri D, et al. Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *J Clin Invest*, 2005, 115(12):3623-3633.
- [22] Numasaki M, Fukushi J, Ono M, et al. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood*, 2003, 101(7):2620-2627.



- [23] Landsberg J, Kohlmeyer J, Renn M, et al. Melanomas resist T-cell therapy through inflammation-induced reversible dedifferentiation. *Nature*, 2012, 490(7420):412-416.
- [24] Xie G, Yao Q, Liu Y, et al. IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition promotes the generation of breast cancer stem-like cells analogous to mammosphere cultures. *Int J Oncol*, 2012, 40(4):1171-1179.
- [25] Xu J, Wan X B, Huang X F, et al. Serologic antienzyme rate of Epstein-Barr virus DNase-specific neutralizing antibody segregates TNM classification in nasopharyngeal carcinoma. *J Clin Oncol*, 2010, 28(35):5202-5209.
- [26] Wan X B, Fan X J, Chen M Y, et al. Inhibition of Aurora-A results in increased cell death in 3-dimensional culture microenvironment, reduced migration and is associated with enhanced radiosensitivity in human nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8(15):1500-1506.
- [27] Yan M, Zhang Y, He B, et al. IKKalpha restoration via EZH2 suppression induces nasopharyngeal carcinoma differentiation. *Nat Commun*, 2014, 5:3661.
- [28] Toley B J, Ganz D E, Walsh C L, et al. Microfluidic device for recreating a tumor microenvironment in vitro. *J Vis Exp*, 2011(57).
- [29] Hsu T H, Kao Y L, Lin W L, et al. The migration speed of cancer cells influenced by macrophages and myofibroblasts co-cultured in a microfluidic chip. *Integr Biol (Camb)*, 2012, 4(2):177-182.
- [30] Zhang Q, Liu T, Qin J. A microfluidic-based device for study of transendothelial invasion of tumor aggregates in realtime. *Lab Chip*, 2012, 12(16):2837-2842.



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：

（1）检测靶向 AURKA 药物对免疫细胞的影响（已部分完成）

以靶向 AURKA 的小分子处理外周血免疫细胞，检测细胞形态、活性、表面标记物及分泌蛋白等的变化。确立受靶向 AURKA 药物影响的细胞主要类型（T 淋巴细胞），对靶向药物处理的免疫细胞条件培养基进行筛选检测并验证，以探索受靶向药物影响的微环境关键因子（如 IFN- γ 、IL-17 等）。

（2）建立模拟“肿瘤微环境”的微流控芯片系统（已部分完成）

建立模拟肿瘤细胞和免疫细胞生长环境的微流控芯片，通过芯片内部开关可控的微通道建立不同细胞间的联系，将肿瘤细胞和免疫细胞置入芯片进行共培养。通过对细胞的观察分析修改并完善适宜于细胞共培养的“肿瘤微环境”微流控芯片模型。

（3）靶向 AURKA 药物模拟肿瘤的治疗，研究微环境的动态变化

将肿瘤细胞与免疫细胞接种到“肿瘤微环境”模型中，观察肿瘤细胞-免疫细胞的相互作用。在“微环境”模型中加入靶向 AURKA 抑制剂模拟肿瘤治疗，检测免疫细胞形态和细胞因子分泌的变化，研究肿瘤细胞形态、EMT 表面标志物及迁移能力的动态变化。通过对免疫细胞与肿瘤细胞共培养及微流控芯片的操控研究分子靶向药物治疗过程中肿瘤-免疫细胞的相互作用，评价微环境对靶向治疗的影响。

（4）探索靶向 AURKA 药物影响肿瘤微环境的分子机制

通过操控微流控芯片内液流实现靶向 AURKA 抑制剂选择性作用芯片中的部分细胞，以探究其对不同肿瘤细胞和免疫细胞的效应及其对治疗的影响。检测治疗过程中细胞分泌因子（如 IFN- γ 、IL-17 等）在肿瘤细胞-免疫细胞相互作用中的角色，应用靶向 NF- κ B 通路药物及细胞因子中和抗体干预关键分子的交流以探索微环境参与肿瘤治疗的分子机制。



(5) 动物模型的构建及肿瘤与微环境相互作用的体内验证

应用转基因自发乳腺癌小鼠模型，对荷瘤小鼠进行靶向 AURKA 药物治疗，检测免疫细胞、肿瘤细胞在治疗过程中的变化及其对治疗的效应。结合前期成果干预 NF- κ B 通路影响治疗的关键因子，观察对靶向治疗效果及肿瘤组织表型的影响，在动物水平验证影响治疗的微环境因素并加以应用。

(6) 生物信息学及临床资料分析验证

检索数据库，搜集临床标本，对影响靶向 AURKA 药物治疗的免疫细胞（T 淋巴细胞）和关键微环境因子（如 IFN- γ 、IL-17 等）进行生物信息学及临床资料分析，为发现与治疗相关的分子及联合用药提供依据。

研究目标：

本课题旨在探索微环境因素在肿瘤靶向治疗中的作用，为靶向药物的研究和应用提供科学依据：

（1）探究靶向 AURKA 治疗肿瘤时微环境发挥主要作用的免疫细胞类型及分泌因子，阐明微环境在肿瘤靶向治疗中的作用及机制。

（2）建立微流控芯片系统模拟肿瘤微环境，研究抑制 AURKA 对免疫细胞功能及细胞因子的分泌影响，阐明其在靶向治疗过程中影响肿瘤细胞 EMT 及迁移的机制。

（3）通过动物模型实验、生物信息和临床资料分析进一步验证靶向 AURKA 药物对微环境改造的作用与机制。

拟解决的关键问题：

(1) “肿瘤微环境”微流控芯片模型的构建及鉴定

解决方案：本实验室与中国科学院大连化学物理研究所和大连理工大学合作开展微流控芯片模拟与仿生的研究，目前已具备良好的微流控芯片制作平台和丰富的微流控芯片应用经验，已成功建立了多种简单模拟细胞生长环境和诱导细胞迁移的微流控芯片模型。同时，本实验室已引进活细胞工作站所需的仪器设备，建立了一套完整的模拟体内肿瘤生长环境并能实时观察的体系。在本项目的支持下，我们将完成肿瘤微环境微流控芯片模型的建立和应用。



(2) 靶向 AURKA 肿瘤治疗中微环境的模拟和干预

解决方案：我们一直致力于肿瘤分子靶向治疗的研究，拥有自主研发的小分子抑制剂，在靶向 AURKA 的研究中积累了丰富的经验。微流控芯片可以对药物干预的时空分布进行灵活的控制，从而模拟治疗过程。在本项目的支持下，我们将实现在芯片上模拟肿瘤的靶向治疗，并对治疗和微环境因素进行干预。

(3) 肿瘤临床及动物模型的系统验证

解决方案：课题组依托大连医科大学，学校二所附属医院拥有丰富的乳腺癌病理资源库及临床预后资料，便于与本课题组开展合作进行临床资料的分析与验证。实验室在实体瘤、血液肿瘤中均成功的建立了与肿瘤发生、转移有关的动物模型，具备成熟的动物实验基础。我们已经从美国 Jackson 实验室引进了转基因自发乳腺癌小鼠及相关转基因工具小鼠模型。相信在本项目的支持下，我们能顺利完成肿瘤模型的构建及验证研究。

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）；

研究方案：

(1) 检测分子靶向药物对免疫细胞的作用，确立免疫细胞影响治疗的关键分子（已部分完成）

A. 收集人外周血用淋巴细胞分离试剂盒分离淋巴细胞，以含抗生素的培养基进行培养。将靶向 AURKA 小分子抑制剂 VX-680 加入细胞培养基，处理一段时间（48 小时）后，观察细胞形态变化。用 CD3、CD4、CD8 等细胞表面标志分子的流式细胞术检测免疫细胞组成（见研究基础，图 9）。

B. 收集药物处理后细胞的培养基（条件培养基），用人免疫相关细胞因子检测试剂盒的方法检测显著变化的免疫相关因子（如 IFN- γ 、IL-17 等）。用柱透析法对条件培养基进行浓缩，以 western blot 方法验证条件培养基中免疫细胞分泌因子（如 IFN- γ 、IL-17 等）表达量的变化（见研究基础，图 9）。

C. 将检测到可能影响治疗的因子（如 IFN- γ 、IL-17 等）处理乳腺癌肿瘤细胞 MDA-MB-231，确立免疫细胞在靶向 AURKA 治疗过程影响治疗的关键分



子:

a. 通过 western blot 及免疫荧光方法检测细胞因子对肿瘤细胞 EMT 表型 (E-cadherin、 β -catenin、Vimentin) 的影响。

b. 通过细胞迁移、侵袭及细胞划痕实验及细胞 Transwell 侵袭方法检测细胞因子对肿瘤细胞功能的影响。

(2) 建立模拟肿瘤微环境的微流控芯片系统 (已部分完成)

A. 根据肿瘤微环境中细胞相互作用的特点, 设计微流控芯片系统。采用光蚀刻法, 通过基板预处理、匀胶、前烘、曝光、后烘、显影、检查及坚膜等加工过程制作微流控芯片模板。将高分子有机硅化合物 PDMS 与固化剂 10:1 混匀后, 倒至模板上, 80℃烘箱加热 2h 使其凝固。用刀片将芯片揭下, 金属钻头打孔, 将 PDMS 芯片和载玻片或细胞培养皿表面先用等离子体清洗仪处理, 使两者不可逆键合, 封接处牢固和持久。

B. 针对不同细胞的生长条件, 在微流控芯片中对培养基、细胞因子及填充基质等进行优化, 分别得到适合不同类型细胞 (肿瘤细胞和免疫细胞) 生长的各项参数。将乳腺癌肿瘤细胞 MDA-MB-231 与免疫细胞分别置入微流控芯片进行培养观察 (见研究基础, 图 10, 图 11)。

C. 利用活细胞工作站对微流控芯片内的细胞进行连续观察, 记录细胞的实时生长状态, 并检测反映细胞活性和功能的各项参数:

a. 通过细胞荧光染色方法监测肿瘤细胞的迁移与侵袭, 通过免疫荧光标记法检测肿瘤细胞的 EMT 表型变化。

b. 通过细胞荧光染色方法监测免疫细胞的生长状态, 通过免疫荧光标记法检测免疫细胞的表面标志及细胞因子分泌的变化。

(3) 在微流控芯片中加入靶向药物模拟肿瘤的治疗, 研究微环境的动态变化

A. 在构建的微流控芯片模型中培养免疫细胞, 加入 AURKA 小分子靶向抑制剂 (VX-680、AKI603 等), 以活细胞工作站实时监测细胞生长状态, 检测细胞活性和免疫细胞因子 (如 IFN- γ 、IL-17 等) 分泌水平的变化, 探究靶向 AURKA 药物对免疫细胞的影响。

B. 在构建的微流控芯片模型中培养肿瘤细胞, 加入相同剂量的 AURKA 小分子靶向抑制剂 (VX-680、AKI603 等), 用活细胞工作站实时监测细胞生长状



态，通过细胞染色标记及免疫荧光方法对肿瘤细胞 MDA-MB-231 的 EMT 表型、细胞迁移、细胞侵袭等参数进行检测，在微流控芯片中探究靶向 AURKA 药物对肿瘤细胞的影响。

C. 在构建的“肿瘤微环境”模型中，加入相同剂量的 AURKA 小分子靶向抑制剂（VX-680、AKI603 等），动态模拟肿瘤治疗过程，通过上述方法探究靶向 AURKA 药物在肿瘤微环境中对免疫细胞及肿瘤细胞的影响，比较免疫细胞和肿瘤细胞在单独培养及微环境条件下受 AURKA 小分子靶向抑制剂影响的差异。

（4）探索靶向 AURKA 药物影响肿瘤微环境的分子机制

A. 通过操控芯片的液流系统实现靶向药物时空分布的灵活调控，通过仿生半透膜和液流开关干预细胞-细胞相互作用，通过细胞染色标记及免疫荧光方法检测肿瘤细胞 MDA-MB-231 EMT 表型、迁移能力及侵袭能力等的变化，免疫细胞生长状态和免疫细胞因子（如 IFN- γ 、IL-17 等）分泌水平的变化。进一步挖掘靶向 AURKA 治疗时肿瘤细胞-免疫细胞相互作用的机制及免疫细胞对治疗过程的影响。

B. 在微流控芯片中以 NF- κ B 通路抑制剂或细胞因子（如 IFN- γ 、IL-17 等）中和抗体对肿瘤微环境进行干预，研究靶向 AURKA 药物引起变化的免疫细胞分泌因子对肿瘤治疗的影响，探索其潜在分子机制。通过活细胞工作站实时观察肿瘤细胞、免疫细胞生长状态及肿瘤细胞的迁移、侵袭行为。同时，通过免疫荧光方法检测肿瘤细胞 MDA-MB-231 的 EMT 表型、免疫细胞因子（如 IFN- γ 、IL-17 等）分泌水平的变化，实现肿瘤治疗微环境中动态变化的研究。

（5）动物模型的构建及肿瘤与微环境相互作用的体内验证

A. 以 BLG-Cre; Brca1^{F22-24/F22-24}; p53^{+/-} 转基因小鼠为自发乳腺癌动物模型，对小鼠的基因型进行鉴定。待小鼠自发成瘤后（预计 31 周时间），利用流式细胞术，结合 CD3、CD4、CD8 等细胞表面标志分子来确定外周血 T 淋巴细胞的组成，通过 ELISA 法检测血清关键免疫分子细胞因子（如 IFN- γ 、IL-17 等）分泌水平。应用靶向 AURKA 的抑制剂对治疗组和对照组小鼠干预 6 周，每周一次收集血标本，动态观察监测 CD3、CD4、CD8 等细胞表面标志分子及 IFN- γ 、IL-17 等细胞因子分泌水平的变化。

B. 收集治疗组与对照组动物的肿瘤组织和血液标本。肿瘤组织进行石蜡包



埋切片，通过免疫组织化学方法检测组织切片中免疫细胞的组成，包括肿瘤细胞 EMT 表型（E-cadherin、 β -catenin、Vimentin）及功能（细胞侵袭、转移）的变化。通过 CD3、CD4、CD8 等细胞表面标志的免疫组织化学方法检测肿瘤组织中免疫细胞的类型、免疫细胞的活性和功能。

C. 对处死的荷瘤 BLG-Cre; Brca1^{F22-24/F22-24}; p53^{+/-}小鼠主要器官组织，包括肝、肺等进行解剖检查转移灶，观察并统计靶向 AURKA 治疗对肿瘤转移的影响。

（6）生物信息学分析验证

A. 通过数据库检索建立免疫细胞（T 淋巴细胞）特征性基因集 (signature)，通过影响治疗的关键信号通路及相关分子（NF- κ B 通路，细胞因子如 IFN- γ 、IL-17 等）建立特征性基因集 (signature)，并选少量的公共基因表达数据用 R 软件进行基因集的训练和优化。

B. 收集大量 TCGA 及其他肿瘤相关的数据库中有药物治疗及临床资料的数据。用 R 软件平台的软件包分析并验证影响靶向 AURKA 治疗的微环境相关基因集在乳腺癌及其他肿瘤治疗中的作用。

（7）临床资料分析验证

收集有临床资料的乳腺癌病例及相应石蜡标本，应用免疫组织化学标记的方法检测样本中免疫细胞（T 淋巴细胞，CD3、CD4、CD8 细胞表面分子）及关键因子（如 IFN- γ 、IL-17 等）的表达水平，同时检测肿瘤细胞 EMT 表型（E-cadherin、 β -catenin、Vimentin）。结合临床病理及预后资料，LogRank 分析检验免疫细胞及关键因子与 5 年预后生存率的关系，Cox 单因素及多因素回归法确定免疫细胞及关键因子与乳腺癌肿瘤 EMT 表型、临床分期、临床分型、病理类型、淋巴结转移及远处转移等的相关性。



技术路线:

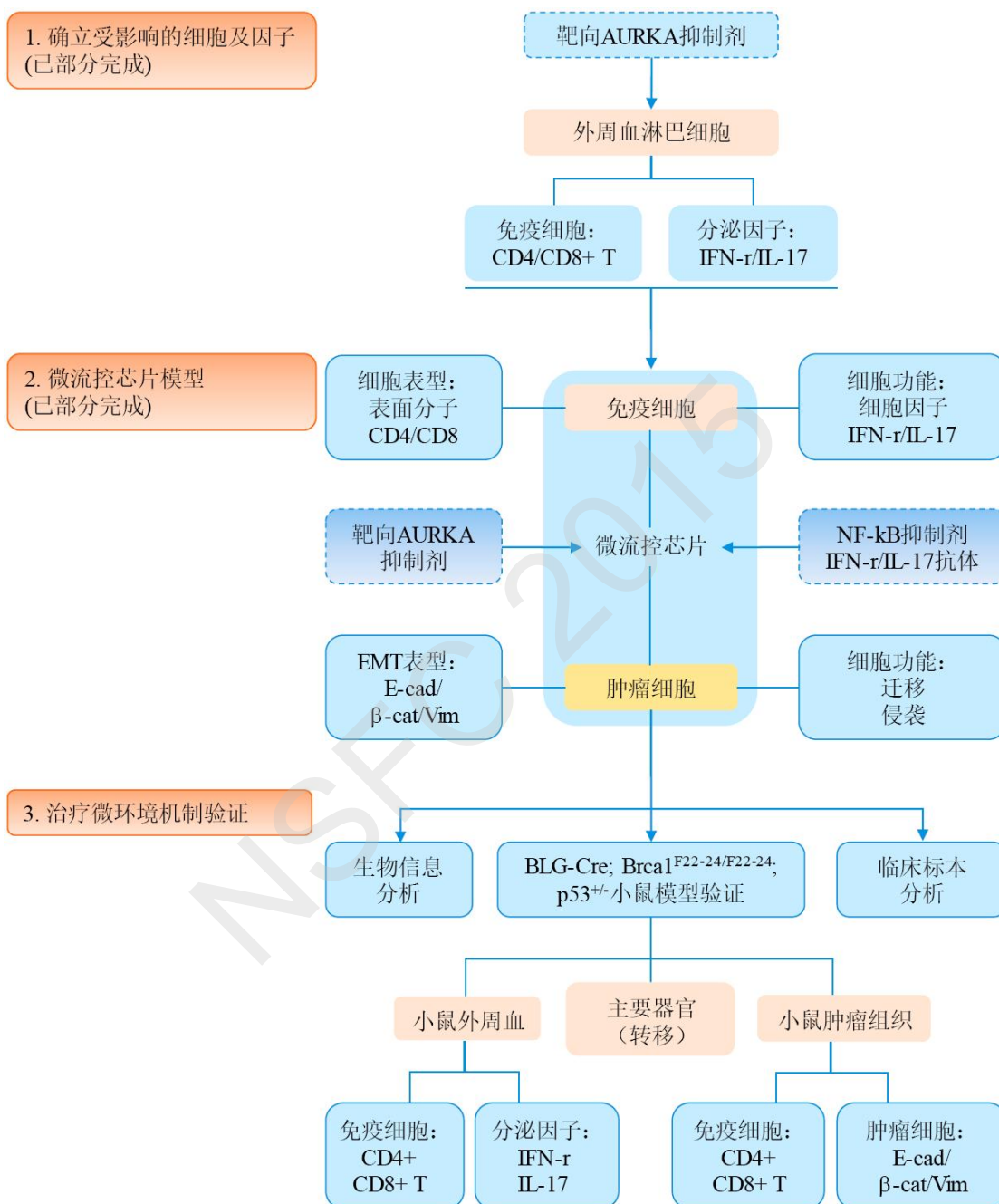


图 2 研究技术路线



可行性分析：

（1）立项有坚实的理论基础

本项目立足于课题组以往深厚的肿瘤分子靶向治疗研究基础及成熟的微流控芯片模型建立经验及熟练的运用技术，旨在利用微流控芯片技术研究肿瘤微环境中 AURKA 与肿瘤细胞增殖与转移的相关性，符合我国肿瘤发展的新趋势。前期研究结果表明，AURKA 靶向抑制剂可对免疫细胞产生影响，为开展靶向 AURKA 对肿瘤微环境影响的研究提供了重要线索。同时，本课题组在微流控芯片上的优势为基于微流控芯片建立肿瘤微环境的模型、研究肿瘤微环境影响靶向 AURKA 药物治疗的模式提供了有效手段。

（2）实验技术成熟，方案可行

我们本着细胞模型-微环境模型-动物模型这一研究方案，运用细胞生物学、分子生物学及病理学等相关学科的先进技术与先进设备进行研究。本项目将使用的实验技术，包括微流控芯片技术、细胞培养、免疫组化、免疫荧光、免疫印记、质粒构建、病毒包装及细胞转染、流式细胞术和动物模型的构建等，多数为国内外常用的经典方法，课题组成员均熟练掌握，少数新颖技术如制作微流控芯片、活细胞工作站运用，我们也正在完善和改进。实验方案经课题组成员反复推敲而成，技术路线可行，实验方案具体，预计在 4 年内完成预定目标。

（3）临床资源丰富

本课题组依托的大连医科大学，学校的二所附属医院拥有丰富的乳腺癌病理资源库及临床预后资料，便于临床标本的收集及分析。

（4）人员配备合理

项目负责人在相关研究领域有很好的工作基础；项目组成员学历、年龄结构合理，研究生思维活跃，有较扎实的理论知识及熟练的实验操作技能，覆盖了细胞生物学、分子生物学、病理学和生理学等各学科，学习氛围浓厚，科研队伍强大。主要研究人员承担过多项国家省部级项目，并在国际学术期刊上发表了论文。



(5) 实验设备及技术支持完善

本课题组所在实验室为依托大连医科大学的辽宁省肿瘤学重点实验室。大连医科大学几年来一直大力支持肿瘤干细胞研究院的发展，投入大量人力、物力及资金建设，硬件设施齐全，可提供本项目所需的全部仪器设备，实验室具有良好的公共技术支撑平台和优越的工作条件。因此，本课题组完全具有完成本项目的设备和条件。

4. 本项目的特色与创新之处：

(1) 靶向药物对肿瘤细胞的作用已有大量的研究报道，但微环境在分子靶向药物治疗肿瘤过程中作用的研究还很少。肿瘤微环境成分复杂，其中免疫细胞是重要的组成部分。**本项目从非肿瘤细胞角度，研究靶向 AURKA 药物对免疫细胞的作用，进而探讨在靶向 AURKA 药物作用下免疫细胞变化对肿瘤治疗的影响及其机制，在研究模式上有很大突破和创新。**

(2) 肿瘤微环境在肿瘤的发展和治疗中的重要性已经受到重视，然而目前尚缺乏理想的微环境研究模型。**我们将微流控芯片技术用于模拟肿瘤微环境，通过芯片液流控制调节不同细胞在靶向药物作用下的相互作用，以建立一个微环境参与肿瘤治疗的研究及应用模型。**

(3) 研究肿瘤微环境与靶向药物相互作用而影响肿瘤治疗的模式，既能找到合理用药和提高肿瘤疗效的方法，又为分子靶向药物的研究提供一条新思路。**本项目运用细胞模型-微环境模型-动物模型，结合生物信息学及临床资料分析，有利于开展全面综合的研究。**

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活动、国际合作与交流计划等）。

年度研究计划：

2016.1-2016.12

验证肿瘤微环境内影响靶向 AURKA 药物治疗肿瘤的主要细胞类型（T 淋巴细胞）和关键因子（如 IFN- γ 、IL-17 等），利用靶向 AURKA 药物处理的免疫细胞条件培养基进行验证，探索靶向药物在肿瘤微环境中影响的关键



因子。

2017.1-2017.12

以肿瘤细胞和免疫细胞为基础，建立可稳定培养细胞、加药及自动进样的肿瘤靶向 AURKA 治疗的微流控芯片模型。研究治疗过程中细胞分泌因子（如 IFN- γ 、IL-17 等）在肿瘤细胞-免疫细胞相互作用的角色，应用药物（NF- κ B 通路抑制剂）及中和抗体干预关键分子的作用以验证微环境参与肿瘤治疗的分子机制。

2018.1-2018.12

构建转基因自发乳腺癌小鼠模型，对荷瘤小鼠进行靶向 AURKA 药物治疗，检测免疫细胞在治疗过程的变化及其对治疗的效应。结合前期成果干预影响治疗的关键因子，观察对靶向 AURKA 治疗效果的影响。

2019.1-2019.12

检索数据库，搜集临床标本，对影响靶向药物治疗的免疫细胞（T 淋巴细胞）和关键肿瘤微环境因子（如 IFN- γ 、IL-17 等）进行生物信息学及临床资料分析。

预期研究结果；

（1）运用微流控芯片技术，根据具体的实验需要，建立模拟体内肿瘤微环境的微流控芯片平台。

（2）研究肿瘤微环境在靶向 AURKA 药物治疗肿瘤时的变化，并阐明靶向 AURKA 药物对肿瘤微环境改造的作用机制。

（3）在 SCI 收录期刊发表论文 5-10 篇。

（4）培养博士后 1-2 名，博士 4-6 名，硕士 6-8 名。

学术交流与国际合作与交流计划：

（1）拟邀请哈佛大学细胞生物学系主任、美国科学院院士 Dr. Joan Brugge 来华进行学术交流。Dr. Joan Brugge 首创了癌发生的三维细胞培养模式。本课题组将与 Brugge 实验室联合建立多种肿瘤细胞的原代三维培养模型。

（2）拟邀请美国 M.D. Anderson 癌症中心副院长，《Cell》杂志编委 Dr.



Mien-Chie Hung 来华进行学术交流。Dr. Mien-Chie Hung 在肿瘤细胞微环境及乳腺癌研究等方面有杰出成就。本课题组将与 Mien-Chie Hung 实验室联合建立实时观测肿瘤微环境动态变化的模型。

（二）研究基础与工作条件：

1. 研究基础（与本项目相关的研究工作积累和已取得的研究工作成绩）；

申请人自 1989 年从南京大学生物系毕业，之后赴美于伊利诺伊大学，西奈山医学中心和哈佛大学医学院从事肿瘤生物学方面的研究。分别于 1997 取得**免疫学博士学位（Ph.D.）**、2000 年取得**临床医学博士学位（M.D.）**。之后，作为美国 NIH 课题负责人（PI）在哈佛大学医学院从事有关 AURKA 在细胞分裂中作用的基础研究。**2005 年底回国，组建了肿瘤转移及微环境研究室，进一步研究 AURKA 在细胞周期及其异常导致乳腺癌变、转移的机制并取得进展。**同时，申请人构建了模拟体内乳腺及鼻咽癌形成的三维培养系统并取得了阶段性进展。先后获国家杰出青年基金资助，并作为首席科学家承担 973 项目及主持国自然重点项目。入选教育部长江学者特聘教授，科技部中青年科技创新领军人才及美国医学及生物工程院(AIMBE)Fellow。**近两年来申请人实验室一直致力于微流控芯片的研究，并与中科院大连化学物理研究所合作致力于微流控芯片模拟与仿生的研究，并取得了阶段性的成果。**在此基础上，这些研究为最终阐明肿瘤微环境在靶向药物治疗肿瘤中的作用机制奠定了良好的基础。



(1) AURKA 抑制剂 VX-680 对白血病细胞的作用，成果发表于 2008 年 *Blood (IF 10.432)*。

申请人的研究工作证明 AURKA 抑制剂 VX-680 选择性诱导 AURKA 高表达 AML 细胞周期凋亡，并阐明其机制。发现 VX-680 能引起单极纺锤体、细胞周期阻滞以及凋亡家族蛋白 Bax、Bcl2 水平变化，从而诱导细胞凋亡（图 3）。

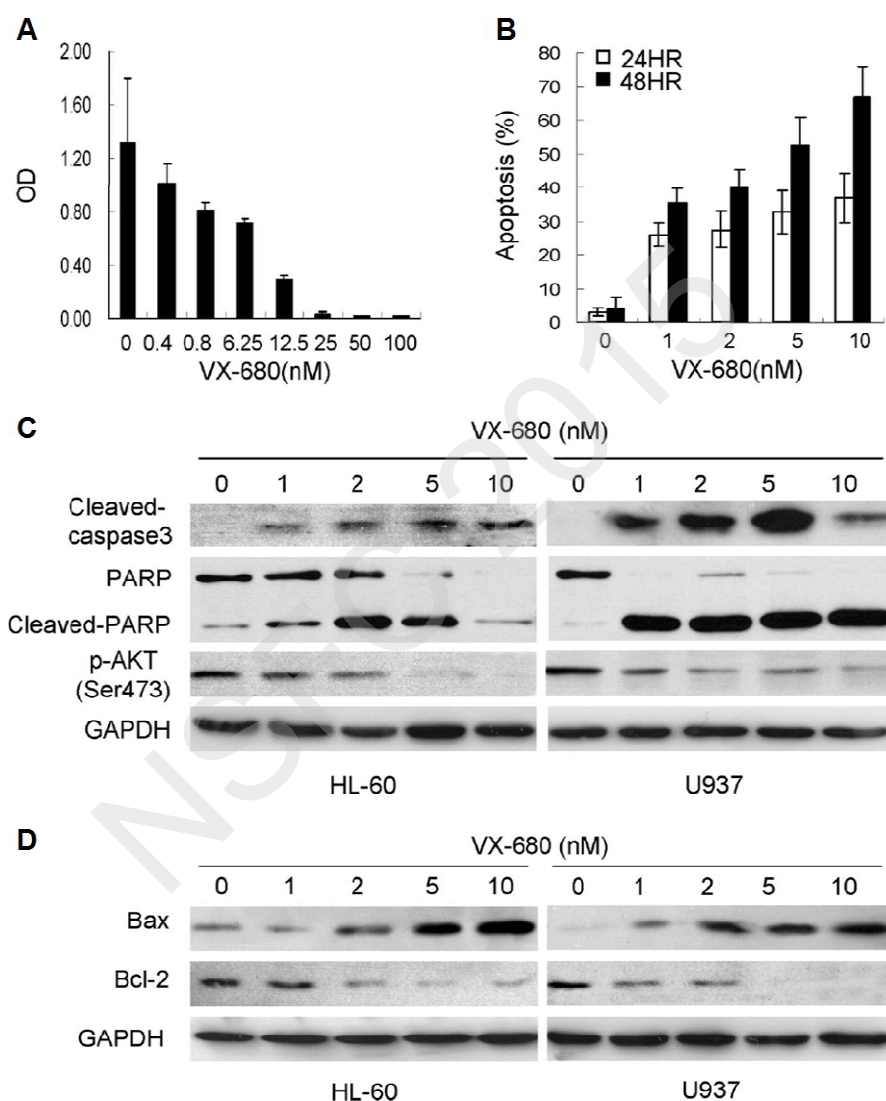


图 3 AURKA 抑制剂 VX-680 诱导 AML 细胞凋亡。

A: VX-680 剂量依赖性地抑制细胞增殖；B: VX-680 剂量依赖性地诱导细胞凋亡；C: VX-680 抑制磷酸化 AKT (Ser473)，促进凋亡相关蛋白 Cleaved-Caspase3/PARP 的积累；D: VX-680 促进凋亡相关蛋白 Bax、Bcl2 比例的增加。



(2) 阐明 AURKA 抑制剂 VX-680 对肿瘤细胞的作用，结果发表于 2009 年的 *Molecular Cancer* (IF 5.397)。

申请人的研究工作证明 AURKA 抑制剂 VX-680 抑制了肿瘤细胞中过表达的 AURKA 蛋白使微管蛋白运动受阻，导致维持染色体稳定的纺锤体结构破坏，抑制肿瘤细胞生长并诱导其凋亡（图 4）。

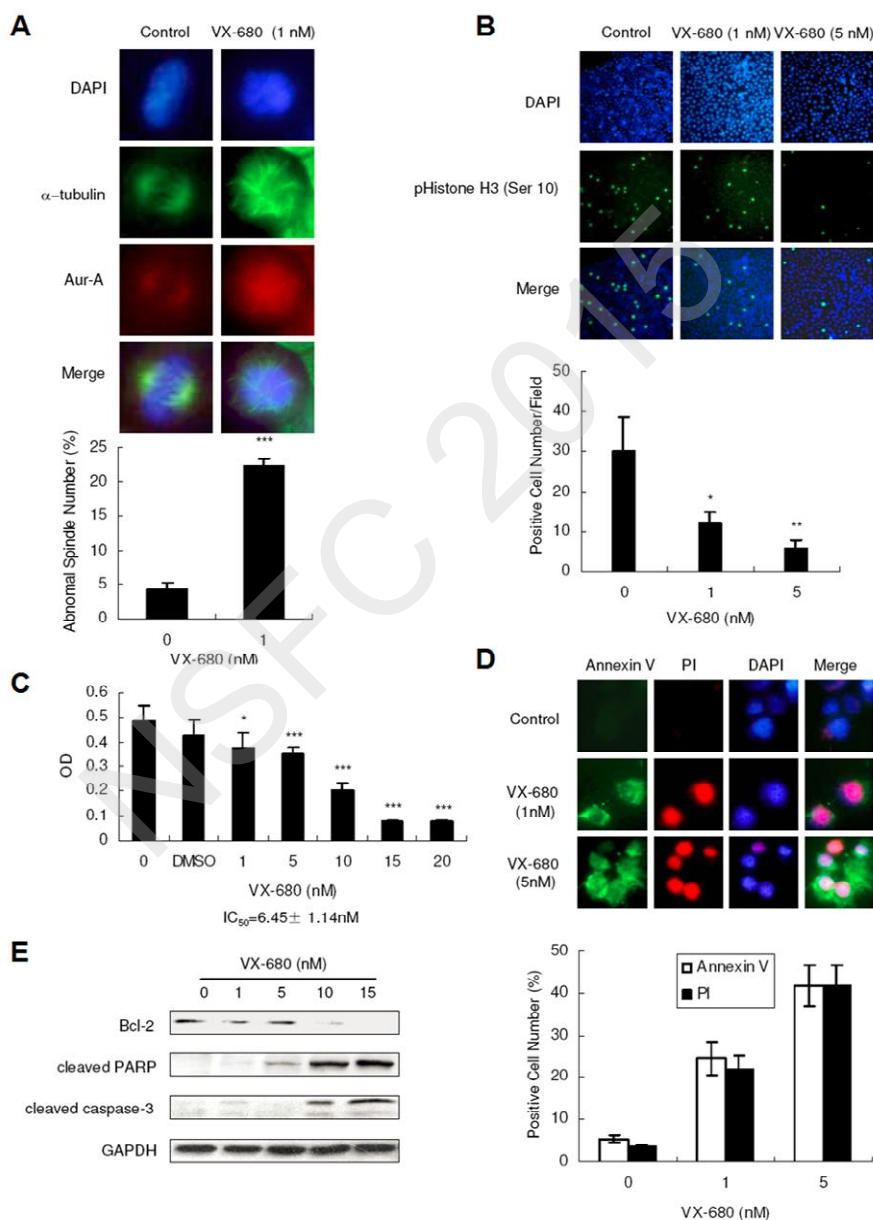


图 4 AURKA 抑制剂 VX-680 诱导肿瘤细胞凋亡。

A: VX-680 抑制细胞纺锤体的形成；B: VX-680 抑制细胞增殖期细胞（p-Histone H3 阳性）比例；C: VX-680 剂量依赖性地抑制细胞增殖；D: VX-680 诱导细胞凋亡（PI 阳性细胞）；E: VX-680 引起凋亡家族蛋白 Bcl2、Cleaved-Caspase3、PARP 水平变化。



(3) 发现 AURKA 抑制剂 VX-680 抑制肿瘤细胞 EMT 及侵袭，结果发表于 2008 年的 *Carcinogenesis* (IF 5.266)。

申请人的研究工作证明 AURKA 通过 MAPK 信号通路促进肿瘤细胞的 EMT 及侵袭功能，抑制剂 VX-680 抑制肿瘤细胞 EMT 及侵袭性（图 5）。

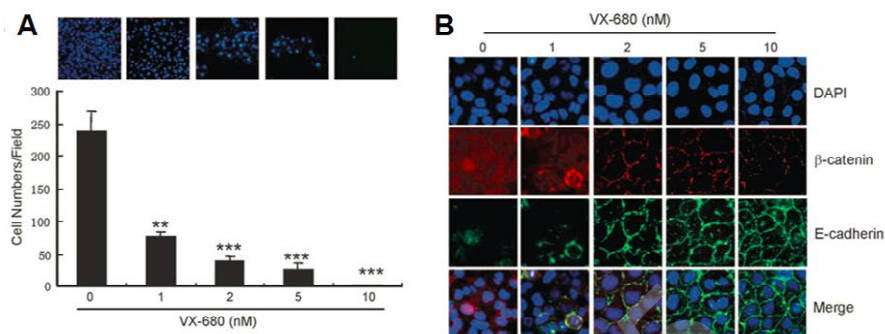


图 5 AURKA 抑制剂 VX-680 抑制肿瘤细胞 EMT 及侵袭性。

A: VX-680 剂量依赖性地抑制肿瘤细胞侵袭；B: VX-680 抑制肿瘤细胞 MAPK 蛋白的磷酸化，抑制 EMT 相关蛋白 β -catenin、E-cadherin 的表达。

(4) 发现 AURKA 通过 PI3K-Cofilin-F 促进乳腺肿瘤细胞的迁移与转移，结果发表于 2010 年的 *Cancer Research* (IF 9.284)。

申请人的研究工作证实 AURKA 能促进乳腺癌细胞的迁移能力，并促进小鼠模型中乳腺癌细胞肺转移，研究阐明了 AURKA 通过 PI3K 和 Cofilin-F 通路促进乳腺癌肿瘤细胞的迁移与转移的分子机制（图 6）。

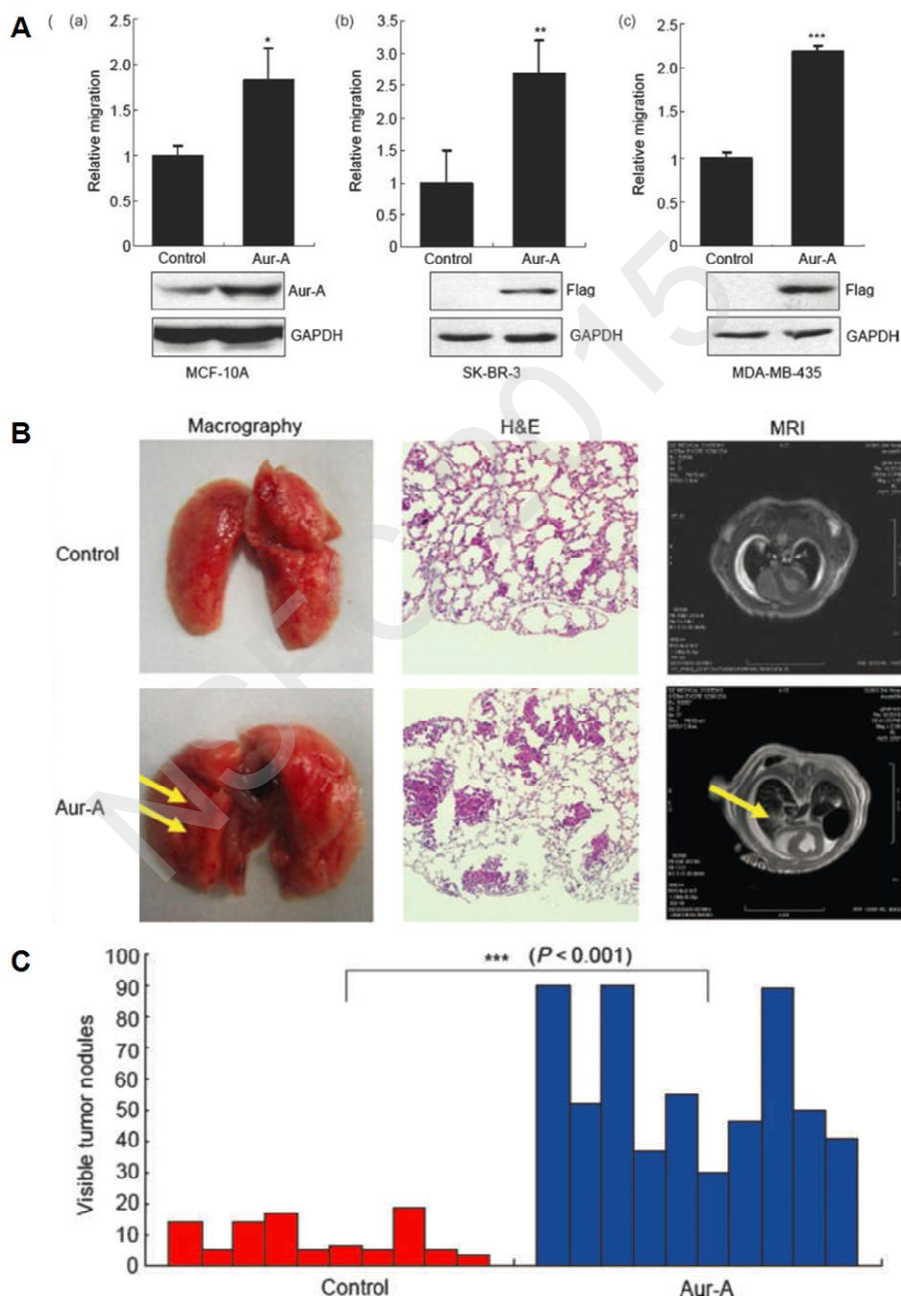


图 6 AURKA 促进肿瘤细胞的迁移与转移。

A: AURKA 促进乳腺癌 MCF-10A、SK-BR-3 和 MDA-MB-435 细胞的迁移；B: AURKA 促进乳腺癌细胞的肺转移组织、H&E 染色及动物 CT 扫描图；C: AURKA 促进小鼠乳腺癌细胞的肺转移统计结果。

(5) 发现 AURKA 抑制剂 VX-680 诱导肿瘤细胞的自噬，结果发表于 2012 年的 *Autophagy* (IF 12.042)。

申请人的研究工作证明 AURKA 抑制剂 VX-680 抑制肿瘤细胞生长的同时，细胞自噬相关蛋白 LC3-II 显著上调，引起肿瘤细胞自噬的发生。研究发现靶向 AURKA 的同时抑制自噬能更好地抑制肿瘤细胞生长并诱导其凋亡（图 7）。

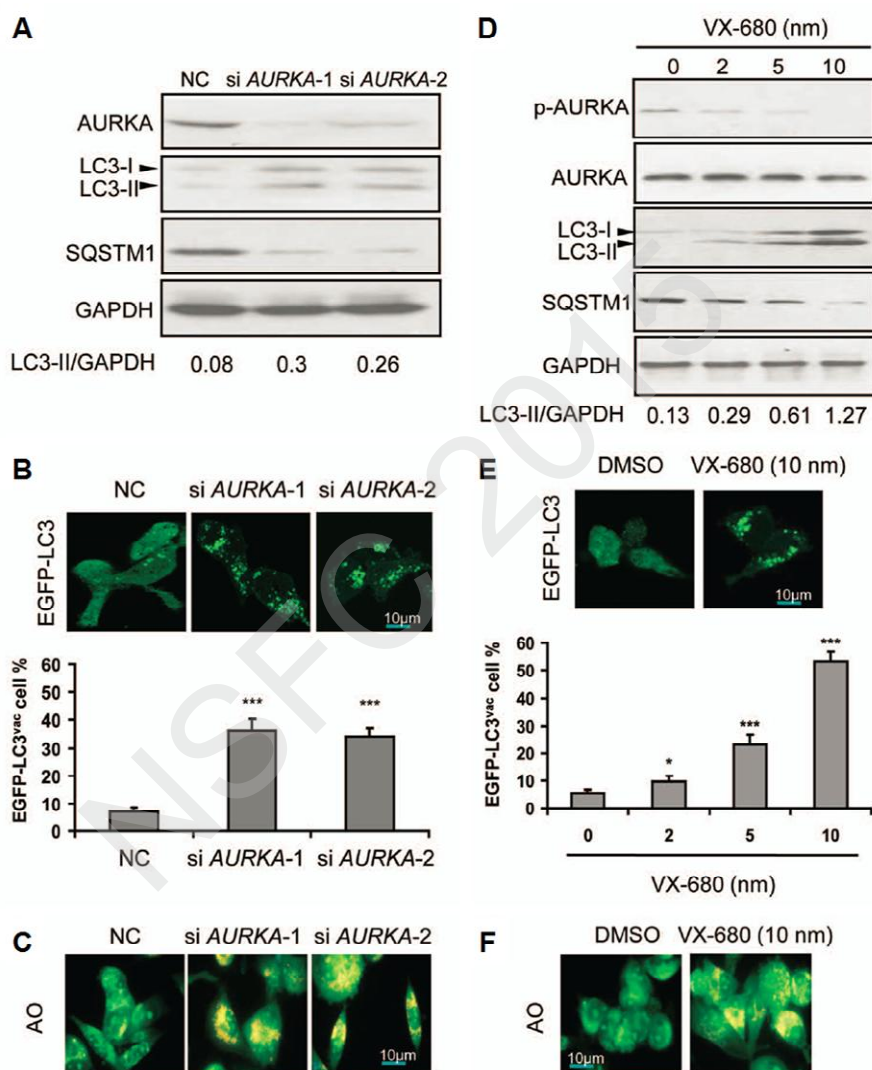


图 7 AURKA 抑制剂 VX-680 诱导肿瘤细胞自噬。

A: siRNA 干扰 AURKA 引起自噬相关蛋白的变化；B: siRNA AURKA 促进肿瘤细胞自噬体的形成；C: Acridine orange(AO) 染色 siRNA AURKA 促进肿瘤细胞自噬；D: VX-680 抑制 AURKA 引起自噬相关蛋白的变化；E: VX-680 抑制 AURKA 促进肿瘤细胞自噬体的形成；F: AO 染色 VX-680 抑制 AURKA 促进肿瘤细胞自噬。



(6) 自主研发 AURKA 抑制剂 AKI603 对肿瘤干细胞的作用, 结果发表于 2014 年的 *Molecular Cancer Therapeutics* (IF 6.107)。

申请人通过与药物化学实验室合作研发 AURKA 抑制剂 AKI603, 发现 AKI603 降低肿瘤干细胞相关分子的表达, 减少肿瘤干细胞表型, 抑制肿瘤干细胞的功能, 并发现 AKI603 与临床用药 Epirubicin 有显著的协同作用抑制肿瘤干细胞的功能 (图 8)。

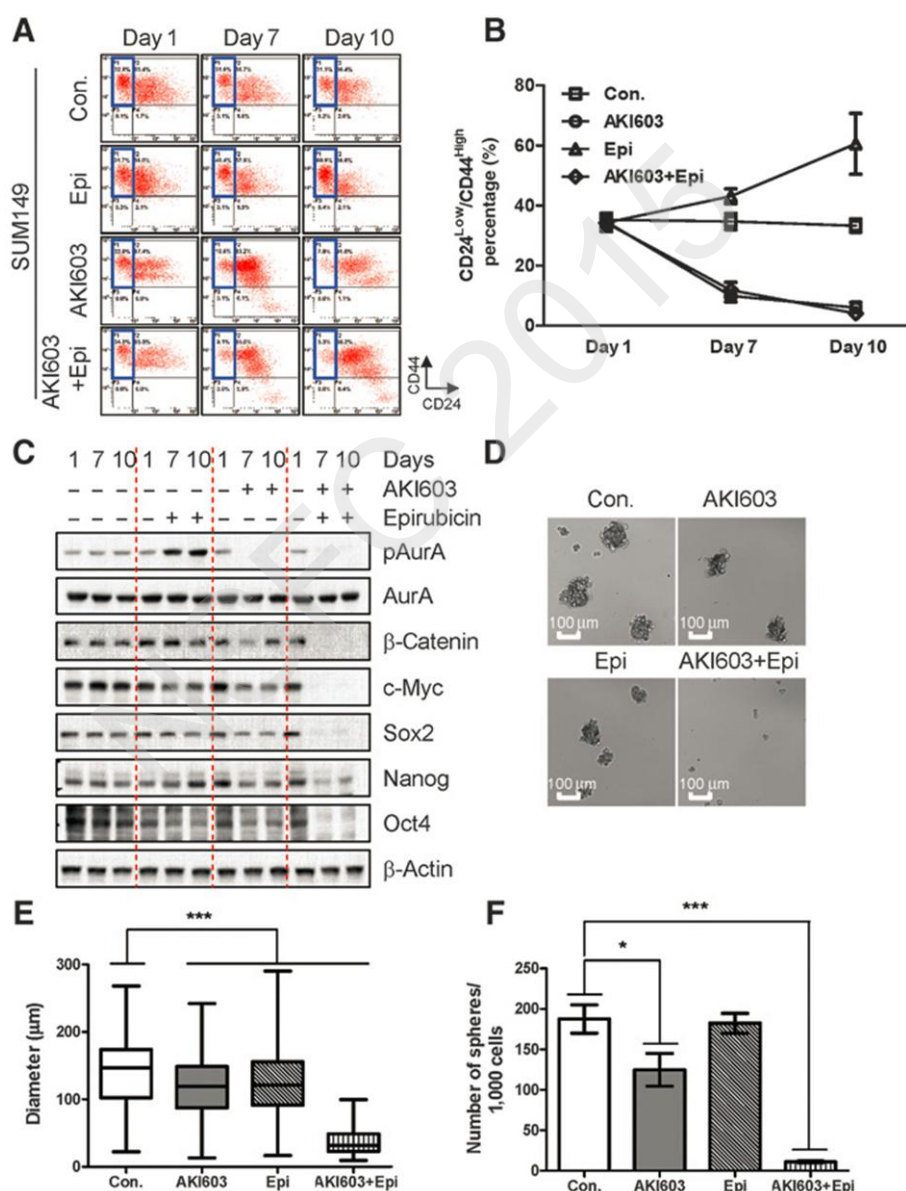


图 8 AURKA 抑制剂 AKI603 抑制肿瘤干细胞功能。

A-B: AKI603 抑制乳腺癌 SUM149 细胞肿瘤干细胞群的比例; C: AKI603 抑制肿瘤干细胞相关分子 c-Myc、Sox2 及 Nanog 等的表达; D: AKI603 抑制肿瘤干细胞球囊形成功能; E: AKI603 抑制肿瘤干细胞球囊大小; F: AKI603 抑制肿瘤干细胞球囊形成数目。



(7) AURKA 抑制剂对免疫细胞作用的探索

本课题组通过分离人外周血淋巴细胞，并对淋巴细胞进行靶向 AURKA 的抑制剂 VX-680 处理，与对照组（DMSO）相比，实验组（VX-680） $CD3^+$ ， $CD4^+$ ， $CD8^+$ T 细胞中 $IFN-\gamma^+$ 细胞的比例明显降低（图 9A），提示的 VX-680 可抑制 $CD4^+$ ， $CD8^+$ 淋巴细胞 $IFN-\gamma$ 的分泌能力。同时，实验组（VX-680） $CD4^+$ T 细胞中 $IL-17^+$ 细胞的比例明显降低（图 9B），提示的 VX-680 可抑制 $CD4^+$ 淋巴细胞 $IL-17$ 的分泌能力。 $CD8^+$ T 细胞识别表达异常抗原的肿瘤细胞，可分泌多种效应细胞因子如 $IFN-\gamma$ 、 $IL-2$ 及 $TNF-\alpha$ 等增强抗肿瘤免疫应答，也可通过穿孔素/颗粒酶途径和 $Fas/FasL$ 途径直接杀伤肿瘤细胞。 $IL-17$ 是一个很强的炎症反应因子，可促进肿瘤的生长、增殖及抗凋亡能力，也可促进肿瘤的血管生成。

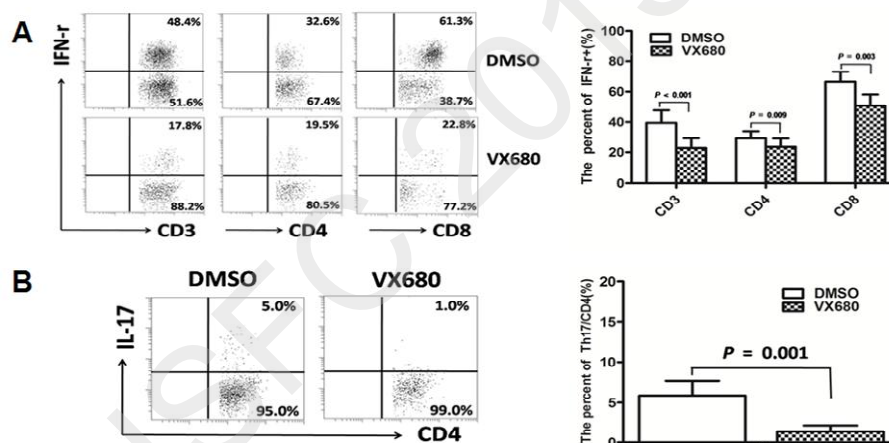


图 9 AURKA 抑制剂 VX-680 抑制 T 淋巴细胞的功能。

A: VX-680 抑制 T 细胞分泌 $IFN-\gamma$; B: VX-680 抑制 T 细胞分泌 $IL-17$ 。

(8) 项目组成员成功构建了动态研究肿瘤细胞团侵袭的微流控芯片模型，结果发表于 2014 年的 *Lab Chip* (IF 5.748)。

本项目组成员已建立可模拟肿瘤血管微环境的微流控芯片模型，在芯片中对血管腔、血管内皮及血管周细胞外基质等因素进行模拟，通过对肿瘤细胞团的实时成像记录研究肿瘤细胞的侵袭行为。该模型为体外研究肿瘤细胞侵袭穿越血管壁这一肿瘤转移关键步骤提供了适宜的平台（图 10）。

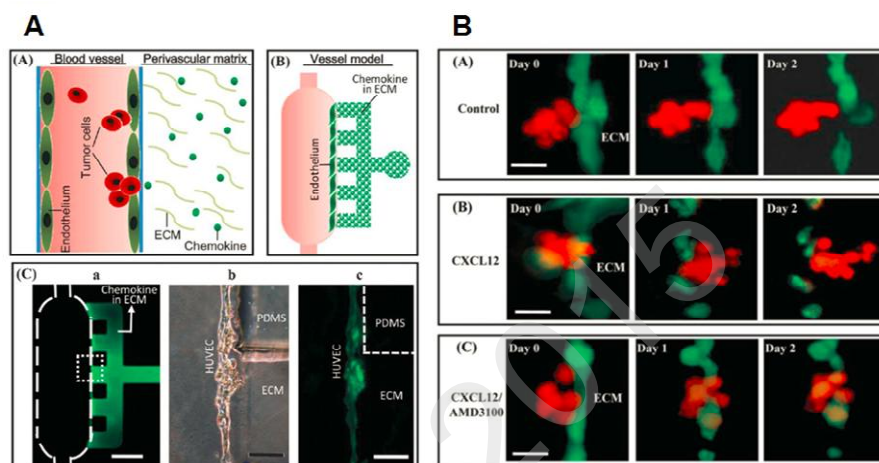


图 10 动态研究肿瘤细胞团侵袭的微流控芯片模型。

A: 模拟体内血管微环境的微流控装置,(A)-体内血管微环境的组成, (B)-微流控模型的组成, (C)-ECM、HUVEC（绿色标记）及 PDMS 组成的芯片; B: CXCL12 刺激肿瘤细胞穿过血管内皮侵袭(红-肿瘤细胞, 绿-血管内皮细胞), (A-C)分别为不同实验条件下对肿瘤细胞侵袭状态实时观察 0-2 天的结果。



(9) 模拟诱导细胞迁移的微流控模型的初步研究

本课题组已建立了可模拟肿瘤微环境的模拟细胞因子诱导细胞迁移的微流控芯片模型，即将乳腺癌细胞 MDA-MB-231 种于 Matrigel 一侧，由于 Matrigel 中包含层粘连蛋白，IV型胶原，巢蛋白/内毒素和蛋白聚糖，类似于基底膜的成分，具有渗透和屏障作用，在 Matrigel 中加入趋化因子（图 11A）或在 Matrigel 的另一侧加入趋化因子（图 11B），细胞会向趋化因子一侧迁移。而不加入趋化因子的一组，明显看出细胞迁移较慢。

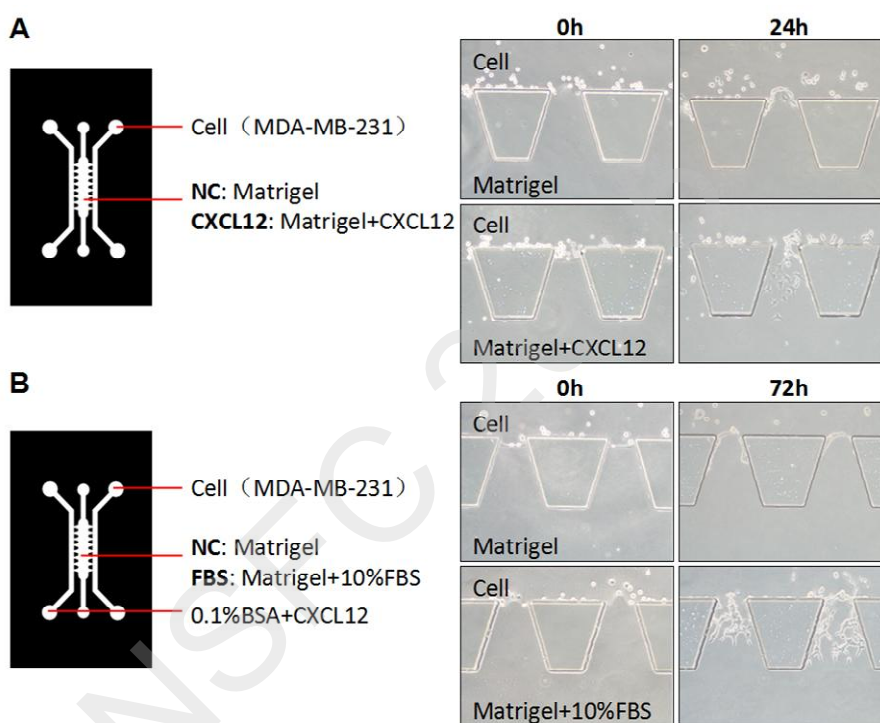


图 11 微流控模型初步研究肿瘤细胞迁移。

A: 趋化因子在 Matrigel 中; B: 趋化因子位于 Matrigel 另一侧。



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）；

本实验室是辽宁省肿瘤学重点实验室。公共服务区包括大型离心机房、超低温冰箱室、冷房、纯水供应室、实验动物中心以及公共仪器室。公共服务区提供多种公共试验技术服务，如病理切片制作、基因测序、比较基因组杂交、电子显微镜观察、荧光显微镜使用、核酸蛋白定量分析、高速双转盘激光共聚焦活细胞工作站、流式细胞仪分析及高效液相分析等。具有的大型仪器有：流式细胞仪、PE377A 和 373A 全自动 DNA 测序仪、冷冻离心干燥仪、实时定量 PCR 仪、同位素或荧光凝胶分析系统、超速冷冻离心机、高速大容量冷冻离心机、电子显微镜、CGH/FISH 系统、激光扫描共聚焦显微镜、倒置荧光显微镜、高通量基因分析系统、-140℃细胞冻存器、-80℃低温冰箱、高效液相色谱仪、BeckmanDU640 紫外分光光度计、Leica 冰冻切片机、Beckman 全自动液闪仪、全自动冲片机、Milipore 纯水系统、自动酶标检测仪、超声破碎仪、全胶洗脱仪以及光密度扫描仪等，具备本项目所需的试验仪器设备和条件。

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）；

（1）教育部创新团队发展计划、IRT13049、肿瘤干细胞的信号网络干预”、10 万、2014-2016、项目负责人。

（2）科技部国家重大科学研究计划（973）、2012CB967000、肿瘤干细胞的动态演进及干预研究、200 万、2012-2016、首席科学家，子课题负责人。

（3）国家自然科学基金重点项目、81130040、肿瘤分子靶向治疗产生多倍体的耐药机制、260 万、2012-2016、项目负责人。



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）。

国家杰出青年科学基金、30888003、肿瘤学（肿瘤分子靶向治疗）、2009-2012、按计划完成。

后续进展：

（1）利用外显子测序，在完全缓解的急髓白血病人中鉴定到一些 DNA 损伤修复相关的体细胞突变，由此我们提出了化疗对药物耐受细胞选择作用的假说现正进行深入的功能研究。

（2）通过比较正常鼻咽组织与低分化鼻咽癌组织的 mRNA 表达谱，发现对分化调控起关键作用的蛋白。进一步用全反式维甲酸(ATRA)处理低分化的鼻咽癌细胞发现可以诱导其分化，相关的分子机制正在研究中。

（3）在三维细胞培养模型中，发现 AURKA 能影响细胞极性相关蛋白 Scrib 的定位与表达，从而影响细胞极性，过表达 AURKA 表现为细胞极性破坏，发生癌转化。

（4）采用高通量的外显子测序，在 NKT 型淋巴瘤中鉴定到了 100 多个体细胞突变，基因包括 AKT2、EGFR、MAP3K3、DNMT3B 以及 ATP-binding cassette(ABC transporter)等。已完成项目为本项目的开展积累了丰富经验和研究基础。

结题摘要：

本课题组开展了肿瘤分子标志物鉴定、分子致癌功能确定及其靶点抑制等一系列的肿瘤临床与基础研究，创新性地对 AURKA 激酶等肿瘤标志关键蛋白进行深入研究，主要学术成绩如下：1.在多种肿瘤模型中证实了高表达 AURKA 能促进肿瘤细胞的增殖，抑制凋亡，降低放疗及化疗敏感性，并进一步明确了 AURKA 的致癌作用及分子机制 (Mol Cancer, 2009)。2.本课题组在揭示 AURKA 促进转移的新功能的基础上，进一步在体外实验和动物模型中揭示 AURKA 通过影响 Cofilin-F 肌动蛋白通路促进肿瘤细胞的远处转移 (Cancer Res, 2010)。3.



在国内率先建立再现体内微环境的三维培养模型。在此基础上,在多种肿瘤三维细胞模型中验证 AURKA 小分子抑制剂的抗肿瘤作用 (Cancer Biol Ther, 2009, 封面文章, BMC Cancer, 2010)。4.在乳腺癌临床标本中发现 AURKA 与自噬蛋白 p62 的相关性,进一步在细胞模型中发现 AURKA 有调节自噬的作用,联合靶向 AURKA 和自噬抑制剂能取得协同杀伤肿瘤细胞的作用,为探究 AURKA 抑制剂的耐药性提供了新思路 (Autophagy, 2012-1)。5.对大样本鼻咽癌患者的临床资料进行回顾性分析,明确了抗 EB 病毒 DNA 酶抗体活性与鼻咽癌预后的关系,对 TNM 分期具有补充作用,对鼻咽癌的精确诊断及个体化治疗具有重要的指导意义 (J Clin Oncol, 2010, 封面文章)。本课题组将荧光标记技术应用取代同位素标记方法,成功地开发出了特异性用于检测 EBV-DNA 酶的试剂盒。6.对多种肿瘤样本进行分析,明确了若干肿瘤分子标志物,并探讨靶向药物的抗癌作用 (Autophagy, 2012-2; J Transl Med, 2011)。

成果目录:

- [1] Rao J, Xu DR, Zheng FM, Long ZJ, Huang SS, Wu X, Zhou WH, Huang RW, **Liu Q** (通讯作者). Curcumin reduces expression of Bcl-2, leading to apoptosis in daunorubicin-insensitive CD34+ acute myeloid leukemia cell lines and primary sorted CD34+ acute myeloid leukemia cells. Journal of translational medicine. 2011, 9: 71.
- [2] Cao JX, Cui YX, Long ZJ, Dai ZM, Lin JY, Liang Y, Zheng FM, Zeng YX, **Liu Q** (通讯作者). Pluripotency-associated genes in human nasopharyngeal carcinoma CNE-2 cells are reactivated by a unique epigenetic sub-microenvironment. BMC cancer. 2010, 10: 68.
- [3] Wang LH, Xiang J, Yan M, Zhang Y, Zhao Y, Yue CF, Xu J, Zheng FM, Chen JN, Kang Z, Chen TS, Xing D, **Liu Q** (通讯作者). The mitotic kinase Aurora-A induces mammary cell migration and breast cancer metastasis by activating the Cofilin-F-actin pathway. Cancer research. 2010, 70(22): 9118-28.
- [4] Wan XB, Fan XJ, Chen MY, Xu J, Long ZJ, Hua YJ, Ji H, Liu L, Hong MH, Zeng YX, **Liu Q** (通讯作者). Inhibition of Aurora-A results in increased cell death in 3-dimensional culture microenvironment, reduced migration and is associated with enhanced radiosensitivity in human nasopharyngeal carcinoma. Cancer biology &



therapy. 2009, 8(15): 1500-6.

[5] Yao JE, Yan M, Guan Z, Pan CB, Xia LP, Li CX, Wang LH, Long ZJ, Zhao Y, Li MW, Zheng FM, Xu J, Lin DJ, **Liu Q** (通讯作者). Aurora-A down-regulates IkappaBalpha via Akt activation and interacts with insulin-like growth factor-1 induced phosphatidylinositol 3-kinase pathway for cancer cell survival. Molecular cancer. 2009, 8: 95.

[6] Zou Z, Yuan Z, Zhang Q, Long Z, Chen J, Tang Z, Zhu Y, Chen S, Xu J, Yan M, Wang J, **Liu Q** (通讯作者). Aurora kinase A inhibition-induced autophagy triggers drug resistance in breast cancer cells. Autophagy. 2012, 8(12): 1798-810.

[7] Zhou WH, Tang F, Xu J, Wu X, Yang SB, Feng ZY, Ding YG, Wan XB, Guan Z, Li HG, Lin DJ, Shao CK, **Liu Q** (通讯作者). Low expression of Beclin 1, associated with high Bcl-xL, predicts a malignant phenotype and poor prognosis of gastric cancer. Autophagy. 2012, 8(3): 389-400.

[8] Xu J, Wan XB, Huang XF, Chan KC, Hong MH, Wang LH, Long ZJ, Liu Q, Yan M, Lo YM, Zeng YX, **Liu Q** (通讯作者). Serologic antienzyme rate of Epstein-Barr virus DNase-specific neutralizing antibody segregates TNM classification in nasopharyngeal carcinoma. Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2010, 28(35): 5202-9.



(三) 资金预算说明

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其必要性。

无需购置单项经费 5 万元以上固定资产及设备。

项目资金预算说明书

直接费用 125.00

1、设备费：0 万元。

2、材料费：合计 76.84 万元。

(1) 常规检测试剂盒: 7.08 万元

主要用于检测蛋白、核酸浓度及相关实验所用试剂盒。

序号	货品名称	单价/元	数量	年数	小计/元
1	BCA蛋白浓度测定试剂盒	330	2	4	2640
2	反转录试剂盒	800	5	4	16000
3	活细胞染色试剂盒	2885	3	4	34620
4	流式检测试剂盒	2000	1	4	8000
5	CCK8检测试剂盒	800	3	4	9600
	合计				70860

(2) 抗体: 15.81 万元

主要用于 western blot、免疫组化与免疫荧光实验中蛋白的检测。

序号	货品名称	单价/元	数量	小计/元
1	鼠-二抗	300	4	1200
2	兔-二抗	300	4	1200
3	鼠 HRP-二抗	1200	2	2400
4	兔 HRP-二抗	1200	2	2400
5	Anti-human-E-cadherin	3990	1	3990
6	Anti-human-N-cadherin	3990	1	3990
7	Anti- human-Vemintin	3990	1	3990
8	Anti-Sox2-	3990	1	3990



9	Anti-Oct-4	3990	1	3990
10	Anti-Nanog	3990	1	3990
11	Anti-human-CD3	3000	2	6000
12	Anti-human-CD4	3000	2	6000
13	Anti-human-CD8	3000	2	6000
14	Anti-human-IL-17 (kit)	8000	2	16000
15	Anti-human-aurora A	2500	2	5000
16	Anti-human-IFN-r	3000	2	6000
17	Anti-caspase-3	3000	2	6000
18	Anti-Ki67	3000	2	6000
19	Anti-mice-E-cadherin	3990	1	3990
20	Anti-mice-N-cadherin	3990	1	3990
21	Anti-mice-Vemintin	3990	1	3990
22	Anti-mice-CD3	3000	2	6000
23	Anti-mice-CD4	3000	2	6000
24	Anti-mice-CD8	3000	2	6000
25	Anti-mice-IL-17	8000	2	16000
26	Anti-mice-aurora A	3000	2	6000
27	Anti-mice-IFN-r	3000	2	6000
28	Anti-b-catenin human	3000	2	6000
29	Anti-b-catenin mouse	3000	2	6000
	合计			158110

(3) 实验动物费：6.40 万元

SPF 级 BLG-Cre 及 BLG-Cre; Brcal^{F22-24/F22-24}; p53^{+/-}转基因小鼠的构建。

SPF 级 BLG-Cre 及 BLG-Cre; Brcal^{F22-24/F22-24}; p53^{+/-}转基因小鼠各 20 只，用于构建体内模型实验，对荷瘤小鼠和对照小鼠分别观察靶向药物的治疗效果，繁殖鉴定成本 200 元/只，饲养费 1.2 元/天，需要饲养 500 天，共 200 元/只×80 只+1.2 元/天/只×500 天×80 只=6.40 万元。

(4) 细胞因子检测试剂盒：8.20 万元。

主要用于小分子靶向药物抑制剂对肿瘤微环境中免疫相关细胞因子的影响的检测，主要包括 IFN-r、IL-17、TGF-β 等。



序号	货品名称	单价/元	数量	小计/元
1	MILLIPLEX MAP人免疫相关细胞因子检测试剂盒	30000	1	30000
2	人IFN- γ ELISA检测试剂盒	3500	2	7000
3	人IL-17 ELISA检测试剂盒	5000	2	10000
4	人TGF- β ELISA检测试剂盒	4500	2	9000
5	鼠IFN- γ ELISA检测试剂盒	3500	2	7000
6	鼠IL-17 ELISA检测试剂盒	5000	2	10000
7	鼠TGF- β ELISA检测试剂盒	4500	2	9000
	合计			82000

(5) 常用生化试剂：19.55 万元

主要用于配置培养基、琼脂糖凝胶电泳缓冲液、SDS-PAGE 蛋白电泳液、细胞培养、免疫组化、微流控芯片的制作以及其他常规生化试剂等。

	序号	货品名称	单价/元	数量/年	年数	小计/元
制作芯片所需试剂	1	SYLGARD 184	1000	5	4	20000
	2	Matrigel	4000	2	4	32000
	3	SU-8光刻胶	8000	1桶		8000
	4	乳酸乙酯	40	10	4	1600
	5	硫酸	40	10	4	1600
	6	氨水	10	10	4	400
	7	双氧水	10	10	4	400
western blotting 所需试剂	8	Tris	400	2	4	3200
	9	RIPA 裂解液	160	2	4	1280
	10	甘氨酸	240	3	4	2880
	11	脱脂奶粉	280	4	4	4480
	12	PBS	590	1	4	2360
	13	30%丙烯酰胺	175	5	4	3500
	14	10 \times 丽春红	90	1	4	360
	15	ECL超敏发光液	210	5	4	4200
	16	蛋白marker	940	2	4	7520



	17	5×G250	120	1	4	480
	18	膜封闭液	100	5	4	2000
核酸相关试剂	19	50×TAE缓冲液	180	2	4	1440
	20	Goldview核酸染色剂	180	5	4	1440
	21	琼脂糖粉	280	5	4	5600
	22	SYBR Green	800	5	4	16000
	23	琼脂粉	150	1	4	600
	24	DNA marker	180	5	4	3600
	25	氯仿	30	10	4	1200
	26	异丙醇	30	10	4	1200
免疫组化相关试剂	27	4%多聚甲醛	200	5	4	4000
	28	抗荧光衰减封片剂	240	2	4	1920
	29	Mayer'苏木素染液	420	3	4	5040
细胞相关实验	30	淋巴细胞分离液MP	300	5	4	6000
	31	血清/瓶	1200	6	4	28800
	32	培养基/箱	720	5	4	14400
	33	其它	2000	1	4	8000
		合计				195500

(6) 常规耗材：19.80 万元

主要用于常规 western blot、细胞实验、微流控芯片实验及动物实验中所需的耗材。

序号	货品名称	单价/元	数量/年	年数	小计/元
1	0.2ml进口PCR反应管/箱	2200	1	4	8800
2	国产吸头10ul/箱	1700	1	4	6800
3	国产吸头200ul/箱	1700	1	4	6800
4	国产吸头1000ul/箱	450	2	4	3600



5	50ml/15ml/10ml/1.5ml/1ml 离心管/箱	850	1*5	4	17000
6	8联排pcr管/箱	678	1	4	2712
7	6孔培养板/箱	525	5	4	10500
8	NC膜/盒	1400	3	4	16800
9	一次性 PE 手套/箱	350	1	4	1400
10	乳胶手套/箱（大/中/小）	580	6	4	13920
11	口罩/箱	400	5	4	8000
12	帽子/箱	180	3	4	2160
13	25cm 细胞培养瓶/箱	933	1	4	3732
14	流式上样管/箱	1317	1	4	5268
15	100mm细胞培养皿/箱	891	5	4	17820
16	35mm细胞培养皿/箱	1443	5	4	28860
17	细胞筛网/箱	1100	3	4	13200
18	10ml 移液管/箱	510	3	4	6120
19	巴氏吸管/箱	1061	2	4	8488
20	96孔酶标板/个	30	20	4	2400
21	蛋白浓缩管/个	70	20	4	5600
22	其它	2000	1	4	8000
	合计				197980

3、测试化验加工费：合计 8.44 万元

(1) 免疫病理切片制作：4.20 万元。

用于临床标本及动物模型实验中通过免疫病理切片检测组织。临床标本 500 例，4 张片子/例，共 2000 片；动物模型共 4 组，每组取 5 只小鼠，5 张片子/个，共 100 片，共 2100 片。委托大连医科大学病理实验室完成，20 元/片，合计 20 元/片×2100 片=4.20 万元。

(2) 测序及引物设计费：2.80 万元。

用于在转基因小鼠鉴定、相关基因的 QPCR 检测及相关产物的 PCR 测序，主要委托英潍捷基（上海）贸易有限公司完成。

普通引物约 40 对，主要英潍捷基（上海），1.2 元/碱基，每对引物平均 38-



45 碱基, 约 50 元每对/OD, 大约每对引物需要 10OD, 大约需要合成 40 对, 总共 50 元/对/OD \times 40 对 \times 10OD=2.00 万元。

平均 40 元/样本(含 PCR 产物测序前纯化), 大约检测 200 个样本, 40 元/样本 \times 200 样本=0.80 万元。

(3) 实验相关其他测试费用: 1.44 万元。

用于与课题相关的紫外可见分光光度计检测, 活细胞工作站维持, ELISA 检测, 蛋白纯度检测等, 在大连医科大学公共实验平台完成。

4、燃料动力费: 无

5、差旅费: 合计 6.14 万元

主要用于本项目完成过程中在大连市内和外埠进行实验, 及参加国内免疫学会议或微流控芯片技术会议等过程中发生的交通费、住宿费、伙食补助、公杂费。

(1) 外埠交通费: 去其它学校实验产生的外埠交通费、住宿费以及伙食补助等, 每年 2 次(学生), 每次 2 人, 每人往返交通费(火车) 1000 元, 平均每天住宿费 200 元/人, 伙食补贴 80 元/人, 市内交通费 50 元/人, 每次 3 天左右。合计 $[1000 + (200 + 80 + 50) \times 3 \text{ 天}] \times 2 \text{ 人} \times 2 \text{ 次} \times 4 \text{ 年} = 3.18$ 万元。

(2) 参加国内全国肿瘤学年会或免疫学等学术交流研讨会(一般在北京/上海): 每年 1 次, 每次参加 2 人, 会期 3 天, 每人往返交通费(火车) 1000 元, 会议注册或会务费 1000 元/人, 住宿费平均每天 250 元/人, 伙食补贴 100 元/人, 市内交通费 50 元/人。合计 $1 \text{ 次} \times 2 \text{ 人} \times [1000 + 1000 + (250 + 100 + 50) \times 3 \text{ 天}] \times 4 \text{ 年} = 2.56$ 万元。

(3) 市内交通费: 用于本项目在完成过程中小规模研讨会, 在大连医科大学或市内其他学校实验室或平台实验、送样、取实验动物或递送文字材料等的交通费等: $0.10 \text{ 万/年} \times 4 \text{ 年} = 0.40$ 万元。

6、会议费: 合计 5.16 万元。

本项目进行期间, 用于承办项目成果专家指导会议和项目成果鉴定会, 包括会议场地费、会务费, 资料费等。

(1) 项目成果鉴定会会议场地, 资料费: 用于本项目完成前对本项目中小分子靶向药物进行临床转化进行申报的专家指导会议和最后项目成果鉴定会。每年举行 1 次, 会期 2 天, 每次预计参加人员 10 名(包括项目组成员 5 人, 学生 3 人, 以及 2 名专家)。会议室租用费用: 7000 元/天, 会议资料费 500 元/



次，合计（7000 元/天+500 元）×4 次=3.00 万元。

（2）会议/会务费：2.16 万元

每次邀请 2 名专家对本项目进行指导，会期 2 天，交通费平均每人往返机票 2000 元，住宿费每天 300 元/人，市内交通补贴 100 元/次。
(2000+300×2+100)×2×4 次=2.16 万元。

7、国际合作与交流费：合计 4.00 万元。

用于在项目研究开发过程中，项目组研究人员参加美国 AACR 学术研讨会，拟派 2 人，费用包括飞机票、签证费、住宿费和注册费等。

费用包括：[机票（12000 元）+签证保险费（2000 元）+食宿（1000 元×3 天）+会议注册费 3000 元/人]×2 人=4.00 万元。

8、出版/文献/信息传播/知识产权事务费：合计 9.30 万元

用于 SCI 论文发表，书籍购买、文献检索、资料费，新药申请、专利申请与维持费以及知识产权顾问费等。

（1）学术论文发表费用：4.00 万元。

国际期刊平均 8000 元/篇，四年共计 4 篇，计 3.20 万元；国内期刊平均 2000 元/篇，四年共计 4 篇，计 0.80 万元。

（2）论文、文献印刷费、上网费、文献资料费：2.80 万元。

①文献、资料印刷费：文献打印、印刷 0.50 万元×4 年=2.00 万元。

②文献资料费：其他用于购买相关中外专业书籍等费用，计 0.20 万×4 年=0.80 万元

（3）专利费用：2.00 万元。

①专利申请费：申报 2 项国家发明专利，包括申请费 1000 元/项，审查费 2500 元/项，专利申请代理费 5000 元/项，（1000+2500+5000）元/项×2 项=1.70 万元。

②专利维持费：500 元/项×2 项×3=0.30 万元

（4）查新费用：0.26 万元。

用于专利申请，新药申请等项目的查新，1300 元/项×2 项=0.26 万元。

（5）其它费用：0.24 万元。

项目研究过程中所发生的项目相关的其他费用。

**9、劳务费：合计 13.20 万元**

用于非在职的参加研究的在读研究生和临时聘用人员的劳务费发放。

(1) 一名博士研究生，每月 1000，一年工作 6 个月： $1000/\text{月} \times 6 \text{ 月} \times 4 \text{ 年} = 2.40 \text{ 万元}$ 。

(2) 两名硕士研究生，每月 500，一年工作 9 个月： $500/\text{月} \times 2 \text{ 人} \times 9 \text{ 月} \times 4 \text{ 年} = 3.60 \text{ 万元}$ 。

(3) 一名博后，每月 3000，一年工作 6 个月： $3000/\text{月} \times 6 \text{ 月} \times 4 \text{ 年} = 7.20 \text{ 万元}$ 。

10、专家咨询费：合计 1.92 万元

在进行微流控模型构建及转基因动物应用、进行有关专利申报时邀请专家咨询。拟邀请 4 次，每次 3 名专家。专家咨询费 $(800 \text{ 元/天} \times 2 \text{ 天}) \times 3 \text{ 人} \times 4 \text{ 次} = 1.92 \text{ 万元}$ 。

(四) 其他需要说明的问题

无



刘强 简历（申请者）

大连医科大学，肿瘤干细胞研究院，教授

教育经历（按时间倒排序）：

1994/09 - 2000/05，美国伊利诺伊大学芝加哥分校，临床医学，医学博士

1990/01 - 1997/05，美国伊利诺伊大学香槟分校，免疫学，理学博士，导师：

Keith W. Kelley

1985/09 - 1989/07，南京大学，生理学，理学学士

工作经历（科研与学术工作经历，按时间倒序排序）：

2013/01 - 至今，大连医科大学，肿瘤干细胞研究院，教授

2006/01 - 2013/01，中山大学，肿瘤防治中心，教授

2003/07 - 2006/01，哈佛大学，医学院，研究学者、NIH课题负责人

2000/07 - 2003/07，纽约西奈山医院，医学中心，住院医师

1997/05 - 2000/05，伊利诺伊大学，血液肿瘤学实验室，博士后研究员

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（按时间倒序排序）：

1、长江学者（特聘教授）、2014年、病理学与病理生理学。

2、教育部创新团队发展计划、IRT13049、肿瘤干细胞的信号网络干预、2014-2016、10万元、在研、主持。

3、科技部国家重大科学研究计划（973）、2012CB967000、肿瘤干细胞的动态演进及干预研究、2012-2016、200万元、在研、首席科学家。

4、国家自然科学基金重点项目、81130040、肿瘤分子靶向治疗产生多倍体的耐药机制、2012-2016、260万元、在研、主持。

5、科技部973项目、2011CB504305、致癌病毒及细胞内信号通路靶向治疗的基础研究、2011-2014、145万元、已结题、子课题主持。

6、美国中华基金会（CMB）杰出教授基金、86000-4209331、治疗治疗基础、2010-2014、40万、已结题、主持。

7、罗氏研发中国心研发创新基金、303041389010、三维细胞/组织抗肿瘤药物筛选模型、2009-2011、已结题、主持。

8、国家杰出青年科学基金、3088800、肿瘤学（肿瘤分子靶向治疗）、2009-2012、200万元、已结题、主持。



9、科技部国家重点实验室专项基金、303041389004、靶向治疗的作用机制研究、2008-2012、110万、已结题、主持。

10、国家自然科学基金面上项目、30873084、Aurora-A激酶靶向抑制剂VX-680协同全反式维甲酸治疗急性早幼粒细胞白血病的作用机制研究、2008-2010、38万、已结题、主持。

11、国家自然科学基金面上项目、30772476、在三维细胞培养模型中Aurora-A激酶对乳腺细胞癌变及转移作用机制的相关性研究、2008-2010、28万、已结题、主持。

12、科技部863项目、303041389003、鼻咽癌的分子分型及个体化治疗、2008-2010、20万、已结题、子课题主持。

NSFC 2015



王绍武 简历(参加者)

大连医科大学, 附属第二医院, 教授

教育经历(从大学本科开始, 按时间倒排序):

1994/08 - 1997/07, 天津医科大学, 影像医学专业, 博士, 导师: 吴恩惠

1987/09 - 1990/07, 大连医科大学, 放射诊断专业, 硕士, 导师: 郎志谨

1979/09 - 1983/07, 山东省莱阳卫生学校, 医疗专业, 学士, 导师: 姜元庆

工作经历(科研与学术工作经历, 按时间倒排序):

1999/07 - 至今, 大连医科大学附属第一、第二医院, 影像科, 教授、主任医师

1995/06 - 1999/06, 大连医科大学附属第一医院, 影像科, 副主任医师

1990/07 - 1995/06, 大连医科大学附属第一医院, 影像科, 医师、主治医师

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、国家自然科学基金、30840086、急性脊髓挫裂伤的 MRI-DWI 的运动表象及其病理基础研究、2009-2010、18 万元、已结题、主持。

2、国家自然科学基金、30971539、急性脊髓损伤的 MRI-DWI 的运动表象及其病理基础研究、2011-2014、64 万元、已结题、主持。



徐洁 简历(参加者)

大连医科大学, 肿瘤干细胞研究院, 副教授

教育经历(从大学本科开始, 按时间倒排序):

2004/09 - 2009/07, 清华大学协和医学院血液学研究所, 内科学, 博士, 导师: 韩忠朝

1996/09 - 2001/09, 大连医科大学临床医学系, 医学学士

工作经历(科研与学术工作经历, 按时间倒排序):

2012/01 - 至今, 大连医科大学, 肿瘤干细胞研究院, 副教授

2009/09 - 2011/12, 美国耶鲁大学, 医学院干细胞中心, 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):

1、国家自然科学基金青年基金、81201686、Lin28/let7 信号通路调控肿瘤干细胞糖代谢的机制研究、2013/01-2015/12、23 万、在研、主持。

2、辽宁省自然科学基金杰出人才培养计划、2014029102、肿瘤干细胞靶向治疗的临床应用研究、2014/06-2017/06、50 万、在研、参加。



张茜 简历(参加者)

大连医科大学, 口腔医学院, 医师

教育经历 (从大学本科开始, 按时间倒排序):

2008/09 - 2011/01, 大连医科大学, 口腔基础医学硕士, 导师: 刘婷姣

2003/09 - 2008/07, 中国医科大学, 口腔医学学士

工作经历 (科研与学术工作经历, 按时间倒排序):

2012/03 - 至今, 大连医科大学, 口腔医学院, 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):

无

NSFC 2015



郑飞猛 简历(参加者)

大连医科大学, 肿瘤干细胞研究院, 博士后

教育经历(从大学本科开始, 按时间倒排序):

2007/09 - 2012/07, 中山大学, 肿瘤学, 博士, 导师: 刘强

2001/09 - 2006/07, 华中科技大学, 临床医学, 学士

工作经历(科研与学术工作经历, 按时间倒排序):

2013/12 - 至今, 大连医科大学, 肿瘤干细胞研究院, 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):

1、国家自然科学基金青年项目、81201547、三维模型中 Aurora-A 异常导致极性破坏在乳腺细胞恶性转化的作用与机制研究、2013-2015、23 万、在研、参加。

2、国家自然科学基金重点项目、81130040、肿瘤分子靶向治疗产生多倍体的耐药机制、2012-2016、在研、260 万、参加。

3、广东省卫生厅医学科研基金面上项目、A2011198、三维模型中 Aurora-A 对乳腺细胞极性及其癌变的影响、2011-2012、1 万、已结题、参加。

4、广东省卫生厅医学科研基金青年基金项目、B2008056、Aurora-A 激酶抑制剂靶向治疗鼻咽癌的实验研究、2008-2009、1 万、已结题、参加。

5、863 计划课题子课题、2006AA02A404、鼻咽癌的分子分型和个体化诊疗、2008-2010、20 万、已结题、参加。



侯志杰 简历(参加者)

大连医科大学, 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):

2009/09 - 2012/07, 大连医科大学, 基础医学院生物化学专业, 硕士, 导师:

孙明忠

2005/09 - 2009/07, 大连医科大学, 生物技术系, 学士, 导师: 孙明忠

工作经历(科研与学术工作经历, 按时间倒排序):

2012/11 - 至今, 大连医科大学, 肿瘤干细胞研究院, 助理实验师

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、国家自然科学基金青年科学基金项目、81402071、共同分子机制的反向表达调控引发的反向生物学效应是神经退行性疾病降低癌症风险的重要原因、2015/01-2017/12、23 万、在研、参加。

2、国家自然科学基金面上项目、81272431、弥散肿瘤细胞发生“肿瘤干细胞”样上皮间质转换在鳞癌中的作用机制研究、2013/01-2016/12、70 万、在研、参加。

3、国家自然科学基金青年科学基金项目、81201656、血小板上调乳腺癌细胞膜的整合素表达进而促进癌细胞转移的分子机制研究、2013/01-2015/12、23 万、在研、参加。

4、国家自然科学基金青年科学基金项目、81100722、遗传性耳聋小鼠内耳毛细胞缺失的分子机制研究、2012/01-2014/12、22 万、结题、参加。



近5年（2010年1月1日以后）代表性研究成果列表

- 1、 Xu LZ^(#), Long ZJ, Peng F, Liu Y, Xu J, Wang C, Jiang L, Guo T, Kamran M, Li SS, Wang CL, Wang HJ, Zhao YF, Wan XY, Liu Q^(*), Aurora kinase A suppresses metabolic stress-induced autophagic cell death by activating mTOR signaling in breast cancer cells, *Oncotarget*, 2014, 5 (17) : 7498-7511. 1, SCI 期刊论文
- 2、 Zheng FM^(#), Long ZJ^(#), Hou ZJ^(#), Luo Y, Xu LZ, Xia JL, Lai XJ, Liu JW, Wang X, Kamran M, Yan M, Shao SJ, Lam EW, Wang SW, Lu G^(*), Liu Q^(*), A Novel Small Molecule Aurora Kinase Inhibitor Attenuates Breast Tumor-Initiating Cells and Overcomes Drug Resistance, *Molecular Cancer Therapeutics*, 2014, 13 (8) : 1991-2003. 1, SCI 期刊论文
- 3、 Xu J^(#), Yue CF^(#), Zhou WH^(#), Qian YM, Zhang Y, Wang SW^(*), Liu AW^(*), Liu Q^(*), Aurora-A contributes to cisplatin resistance and lymphatic metastasis in non-small cell lung cancer and predicts poor prognosis, *Journal of Translational Medicine*, 2014, 12. 1, SCI 期刊论文
- 4、 Luo Y^(#), Deng YQ^(#), Wang J, Long ZJ, Tu ZC, Peng W, Zhang JQ, Liu Q^(*), Lu G^(*), Design, synthesis and bioevaluation of N-trisubstituted pyrimidine derivatives as potent aurora A kinase inhibitors, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2014, 78: 65-71. 3, SCI 期刊论文
- 5、 Yan M^(#), Zhang Y^(#), He B^(#), Xiang J, Wang ZF, Zheng FM, Xu J, Chen MY, Zhu YL, Wen HJ, Wan XB, Yue CF, Yang N, Zhang W, Zhang JL, Wang J, Wang Y, Li LH, Zeng YX, Lam EW, Hung MC, Liu Q^(*), IKK alpha restoration via EZH2 suppression induces nasopharyngeal carcinoma differentiation, *Nature Communications*, 2014, 5. 3, SCI 期刊论文
- 6、 Liu LL^(#), Long ZJ^(#), Wang LX, Zheng FM, Fang ZG, Yan M, Xu DF, Chen JJ, Wang SW, Lin DJ, Liu Q^(*), Inhibition of mTOR Pathway Sensitizes Acute Myeloid Leukemia Cells to Aurora Inhibitors by Suppression of Glycolytic Metabolism, *Molecular Cancer Research*, 2013, 11 (11) : 1326-1336. 5, SCI 期刊论文
- 7、 Xu J^(#), Wu X^(#), Zhou WH^(#), Liu AW, Wu JB, Deng JY, Yue CF, Yang SB, Wang J, Yuan ZY^(*), Liu Q^(*), Aurora-a Identifies Early Recurrence and Poor Prognosis and Promises a Potential Therapeutic Target in Triple Negative Breast Cancer, *PLoS One*, 2013, 8 (2) . 7, SCI 期刊论文
- 8、 Zou Z^(#), Yuan Z, Zhang Q, Long Z, Chen J, Tang Z, Zhu Y, Chen S, Xu J, Yan M, Wang J, Liu Q^(*), Aurora kinase A inhibition-induced autophagy triggers drug resistance in breast cancer cells, *Autophagy*, 2012, 8 (12) : 1798-1810. 21, SCI 期刊论文



- 9、Wan XB^(#), Fan XJ^(#), Huang PY^(#), Dong D, Zhang Y, Chen MY, Xiang J, Xu J, Liu L, Zhou WH, Lv YC, Wu XY, Hong MH^(*), Liu Q^(*), Aurora-A activation, correlated with hypoxia-inducible factor-1 alpha, promotes radiochemoresistance and predicts poor outcome for nasopharyngeal carcinoma, Cancer Science, 2012, 103 (8) : 1586-1594. 11, SCI 期刊论文
- 10、Xu DR^{(#)(*)}, Huang S^(#), Long ZJ^(#), Chen JJ, Zou ZZ, Li J, Lin DJ, Liu Q^(*), Inhibition of mitotic kinase Aurora suppresses Akt-1 activation and induces apoptotic cell death in all-trans retinoid acid-resistant acute promyelocytic leukemia cells, Journal of Translational Medicine, 2011, 9. 8, SCI 期刊论文
- 11、Xu J^(#), Wan XB^(#), Huang XF^(#), Chan KC, Hong MH, Wang LH, Long ZJ, Liu Q, Yan M, Lo YM, Zeng YX, Liu Q^(*), Serologic Antienzyme Rate of Epstein-Barr Virus DNase-Specific Neutralizing Antibody Segregates TNM Classification in Nasopharyngeal Carcinoma, Journal of Clinical Oncology, 2010, 28 (35) : 5202-5209. 13, SCI 期刊论文
- 12、Wang LH^(#), Xiang J, Yan M, Zhang Y, Zhao Y, Yue CF, Xu J, Zheng FM, Chen JN, Kang Z, Chen TS, Xing D^(*), Liu Q^(*), The Mitotic Kinase Aurora-A Induces Mammary Cell Migration and Breast Cancer Metastasis by Activating the Cofilin-F-actin Pathway, Cancer Research, 2010, 70 (22) : 9118-9128. 29, SCI 期刊论文
- 13、张晓实, 陈映波, 黄文林, 刘继彦, 刘强, 张星, 朱孝峰, 丁娅, 王尧, 王岩, 王丽辉, 龙梓洁, 关远祥, 安欣, 李焱, 李疆, 李丹丹, 李春燕, 宋立兵, 张超, 张念华, 张福君, 陈实, 岳彩峰, 周强, 周启明, 贾卫华, 夏青, 夏云飞, 曹素梅, 彭星辰, 彭瑞清, 黑色素瘤基础与临床, 人民卫生出版社, 731000字, 2010。 书/著作
- 14、詹启敏, 赵仲堂, 刘佳, 刘强, 于双成, 李一石, 吴尚洁, 张晋昕, 邵淑娟, 黄国荣, 章静波, 熊鸿燕, 医学科学导论, 人民卫生出版社, 592000字, 2010。 书/著作
- 15、刘强(1/1), 长江学者奖励计划, 中国教育部, 长江学者特聘教授, 国家级, 2015。(刘强) 奖励
- 16、刘强(1/1), 科技部创新人才推进计划, 中国科学技术部, 科技部中青年科技创新领军人才, 国家级, 2014。(刘强) 奖励
- 17、刘强(1/1), 卫生部有突出贡献中青年专家, 卫生部国家食品药品监督管理局、国家中医药管理局, 卫生部有突出贡献中青年专家, 国家级, 2012。(刘强) 奖励
- 18、刘强(1/10), 靶向细胞周期关键蛋白Aurora-A的抗肿瘤治疗研究, 中国抗癌协会, 中国抗癌协会科技奖(二等奖), 国家级, 2012。(刘强, 关中, 严敏, 龙梓洁, 万香波, 王静, 徐大志, 夏良平, 李传行, 袁中玉) 奖励
- 19、刘强(1/1), 辽宁省高等学校“攀登学者”, 辽宁省教育厅, 辽宁省高等学校“攀登学者”, 省级, 2012。(刘强)

**奖励**

- 20、 刘强(1/1)，肿瘤干细胞的动态演进及干预研究，中国科学技术部，重大科学研究项目（973）首席科学家，国家级，2012。（刘强） **奖励**
- 21、 刘强(1/1)，肿瘤靶向治疗，美国医学及生物工程院（AIMBE），院士(Fellow)，国际级，2012。（刘强） **奖励**
- 22、 刘强(1/1)，肿瘤治疗基础，美国中华医学基金会（CMB），杰出教授，国家级，2010。（刘强） **奖励**
- 23、 鲁桂，邓延秋，罗羽，刘强，彭伟，龙梓洁，王静，具有Aurora激酶抑制活性的嘧啶衍生物及其制备方法以及应用，中国，201310010184.5。 **专利**
- 24、 刘强，龙梓洁，一种嘧啶衍生物在制备预防和/或治疗和/或辅助治疗癌症的药物中的用途，中国，201310010182.6。
专利
- 25、 刘强，龙梓洁，一种嘧啶衍生物在制备预防和/或治疗和/或辅助治疗肿瘤的药物中的用途，中国，201310010183.0。
专利
- 26、 万香波，刘强，吴祥元，一种塑形器及采用该塑形器构建三维细胞培养模型的方法，中国，201110413925.5。 **专利**



附件信息

序号	附件名称	备注	附件类型
1	附件1.1：代表文章	代表文章，第一篇	代表性论著
2	附件1.2：代表文章	代表文章，第二篇	代表性论著
3	附件1.3：代表文章	代表文章，第三篇	代表性论著
4	附件1.4：代表文章	代表文章，第四篇	代表性论著
5	附件1.5：代表文章	代表文章，第五篇	代表性论著
6	附件2：奖励证书	奖励证书复印件	奖励
7	附件3：专利	专利复印件	专利
8	附件4.1：国际会议报告邀请	国际会议邀请信、通知第一部分	会议报告
9	附件4.2：国际会议报告邀请	国际会议邀请信、通知第二部分	会议报告

**签字和盖章页(此页自动生成, 打印后签字盖章)**

申请人: 刘强

依托单位: 大连医科大学

项目名称: 基于微流控芯片研究靶向AURKA治疗中肿瘤微环境的作用及其机制

资助类别: 面上项目

亚类说明:

附注说明: 常规面上项目

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	王绍武	大连医科大学	210203196209244775	6	
2	徐洁	大连医科大学	21020219740119004X	6	
3	张茜	大连医科大学	210211198503262922	6	
4	郑飞猛	大连医科大学	460001198206020014	6	
5	侯志杰	大连医科大学	370724198609246561	6	
6	康志杰	大连医科大学	211422197910063548	6	
7	李婷婷	大连医科大学	370704199101200828	9	
8	杨梦紫	大连医科大学	152201199203095023	9	
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: