

镇江市财政局文件 镇江市科学技术局

镇财教〔2024〕48号

关于下达 2024 年度市科技计划（社会发展） 项目经费的通知

各市（区）财政局、科技局，镇江经开区财政局、科信局，镇江高新区财政国资局、科发局，各有关单位：

为全面贯彻党的二十届三中全会精神和习近平总书记对江苏、镇江工作重要讲话精神以及市委全会精神，推动《镇江市“十四五”科技创新规划》《镇江市科技创新引领产业强市行动方案》加快实施，进一步提升科技惠民水平。经研究，决定将 2024 年度市科技计划（社会发展）项目和经费下达给你们。本批共安排项目 112 项，下达经费 480 万元（项目及经费表见附件），列 2024 年度“重点研发计划”（财政收支分类科目编码：2060902）预算支出指标。

各地、各部门接到本通知后，尽快组织项目承担单位与市

科技局签订科技计划项目合同，所在地财政部门根据科技计划项目合同办理拨款手续。各主管部门要严格按照市级科技计划项目管理相关规定，加强对项目的实施管理，确保项目经费专款专用，项目按期完成，早出成果。

附件：1. 2024 年度市科技计划（社会发展）项目经费汇总表

2. 2024 年度市科技计划（社会发展）项目表



2024 年 9 月 30 日

信息公开选项：依申请公开

镇江市财政局

2024 年 9 月 30 日印发

镇江市科技计划项目合同

计划类别 市重点研发计划--社会发展

项目编号 SH2023066

项目名称 黄芪-乳香通过CircZNF608对 α β 与 γ δ T谱系选择重塑卵巢

癌免疫抑制微环境机制的研究

项目类别 面上项目

起止年限 2023 年 7 月 至 2025 年 6 月

项目负责人 刘晓健 电话及手机 13655285906

承担单位 镇江市第一人民医院

参加单位

单位地址 镇江市电力路8号 邮政编码

212000

项目主管部门 镇江市卫生和计划生育委员会

镇江市科学技术局

2021 年 8 月修订

委托单位（甲方）： 镇江市科学技术局

法定代表人：肖敬东

地址：镇江市南徐大道 68 号

邮政编码：212050

承担单位（乙方）：

承担单位： 镇江市第一人民医院

法定代表人： 蒋鹏程

地址： 镇江市电力路 8 号 邮政编码： 212000

项目负责人： 刘晓健

电话： 13655285906 传真： 0511-85234387

电子邮件： jingxiaojingx@163.com

保证单位（丙方、项目主管部门）： 镇江市卫生健康委员会

法定代表人： 杨 毅

地址： 镇江市南徐大道 18 号 邮政编码： 212000

甲方批准由乙方承担市科技计划 黄芪-乳香通过
CircZNF608 对 α β 与 γ δ T 谱系选择重塑卵巢癌免疫抑制微环境机
制的研究 项目（编号： SH2023066）的研究开发或建设任务。

依据政策法律规定，为明确甲、乙、丙三方的权利和责任，保证项目的顺利实施和科研经费的规范合理使用，签订本合同。

五、项目经费预算

(一) 项目经费来源预算 经费单位：万元

	合计	2023 年	2024 年	2025 年	2026 年	验收后
合计	4	4	0	0	0	0
1、市拨款	2	2	0	0	0	0
2、承担单位自筹	2	2	0	0	0	0
3、其他来源	0	0	0	0	0	0

(二) 项目经费支出预算 经费单位：万元

	预算数	其中：市拨款	备注
(一) 直接费用	3.9	1.9	
1、设备费	0	0	
2、业务费	3.6	1.75	试剂、抗体、检测、细胞、实验动物等、会议交流、交通补助
3、劳务费	0.3	0.15	结题、专家评审等
(二) 间接费用	0.1	0.1	
1、管理费	0.1	0.1	课题实验项目协调、管理等
2、绩效支出	0	0	
合计	4	2	

(三) 其他需要列明的事项（如需列明的新增仪器设备清单等）

六、其他条款

(一) 签约方的权利、义务

第一条 签约方均应共同遵守国家、省、市有关科技计划与经费管

计划类别：市重点研发计划（社会发展）

指南代码：1001-1

项目受理号：SSH20230140026

镇江市科技计划项目申报书

（社会发展）

项目名称：黄芪-乳香通过 CircZNF608 对 α β 与 γ δ T 谱系选择重
塑卵巢癌免疫抑制微环境机制的研究

项目类别：面上项目

承担单位：镇江市第一人民医院

单位地址：镇江市电力路 8 号

项目负责人：刘晓健 电话：13655285906

项目联系人：刘晓健 电话：13655285906

主管部门：镇江市卫生健康委员会

申报日期：2023 年 5 月 8 日

镇江市科学技术局



202300171-SSH20230140026

项目单位法人及负责人 科研诚信承诺书

本人承诺严格遵守《镇江市市级科技创新专项资金管理办法》《镇江市市级科技计划项目管理办法》和《镇江市市级科技计划项目信用管理办法》等有关规定，为项目实施提供承诺的条件，严格执行经费管理等相关规定。承诺所提供申报资料真实可靠，项目组成员身份真实有效，无编报虚假预算、篡改单位财务数据、侵犯他人知识产权等失信行为。

本人承诺如有失实或失信行为，愿意根据相关规定，承担以下责任：

1. 取消项目评审资格；
2. 撤销项目立项，并退回市拨经费；
3. 记入不良信用记录，并接受相应处理；
4. 其它相关法律责任等。

项目负责人（签字）：

单位法人（签字）：

（公 章）

____年____月____日



项目主管部门科研诚信承诺书

按照市科技计划项目申报的要求，我们对该项目进行了认真审查，该项目单位提交的项目申报资料完整齐全、真实有效，该单位无不良信用记录，项目负责人和申报单位符合本计划申报资格要求。

本主管部门承诺在审查推荐项目过程中，无违规推荐、审查不严等失信行为。承诺按照相关管理规定，切实履行项目主管部门管理职责。如有失实或失信行为，本部门承诺承担相关责任。

（公 章）

____年____月____日



一、立项依据

1、本项目国内外科技创新发展概况和最新发展趋势

1. $\gamma\delta$ T 和 $\alpha\beta$ T 细胞关系失衡是免疫抑制微环境的重要原因

$\gamma\delta$ T 在肿瘤免疫中具有抗癌和促癌双重性，是肿瘤微环境中关键的 T 细胞。其不仅在特异性免疫中起重要作用，而且在非特异性免疫中发挥关键作用。 $\gamma\delta$ T 对抗原的识别不依赖于经典的 MHC 分子抗原呈递，可以直接识别抗原，因此 $\gamma\delta$ T 的免疫反应可以轻易启动，已经注册了多种 CAT- $\gamma\delta$ T 临床试验[1]。 $\alpha\beta$ T 是起抗肿瘤免疫作用的关键效应 T 细胞，其激活依赖于 MHC 分子抗原呈递。 $\gamma\delta$ T 和 $\alpha\beta$ T 关系密切，活化的 $\gamma\delta$ T 起抗原呈递的作用，促进肿瘤细胞表达 MHC-I 分子，增强共刺激分子的表达，如 CD80 和 CD86，处理抗原并将它们交叉呈递给 $\alpha\beta$ T 细胞，从而引起强烈的共刺激信号，诱导幼稚的 $\alpha\beta$ T 增殖和分化，分泌 IL2 和 TNF- α ，起直接杀伤肿瘤的作用。 $\gamma\delta$ T 的抗原呈递不依赖于 MHC，抗原呈递效率远高于树突状细胞[2]。如果无法将抗原递呈给 $\alpha\beta$ T，则 $\alpha\beta$ T 无法进行增殖分化，发挥抗肿瘤作用，则产生免疫逃逸。免疫抑制微环境是肿瘤细胞增殖和转移的重要原因[3]。

2. $\gamma\delta$ T 向产 IL17 的 $\gamma\delta$ T17 极化是导致 $\gamma\delta$ T 和 $\alpha\beta$ T 细胞关系失衡的关键

幼稚型 $\gamma\delta$ T 在不同细胞因子作用下，可以向不同的 $\gamma\delta$ T 细胞极化。例如，在细胞因子 IL2 及 IL21 的作用下， $\gamma\delta$ T 可以极化为分泌 IFN- γ 的 $\gamma\delta$ T1，发挥抗肿瘤作用。在 IL1 β 的作用下，可以向产 IL17 的 $\gamma\delta$ T17 极化，发挥促进肿瘤进展的作用[4, 5]。据《Cell》报道，胰腺癌的 $\gamma\delta$ T17 高度表达 PD-L1，通过和 $\alpha\beta$ T 表面 PD1 结合，进一步诱导免疫抑制状态，抑制 $\alpha\beta$ T 的抗肿瘤作用[6]（图 1）。我们前期研究发现： $\gamma\delta$ T17 是衡量卵巢癌肿瘤组织免疫抑制微环境的关键淋巴细胞，是免疫逃逸的风向标。通过检测新鲜卵巢癌组织肿瘤微环境中各成分的表达发现，IL-17 在卵巢癌组织中高表达，且 IL-17 表达水平与肿瘤细胞分化、淋巴结转移呈正相关。卵巢癌组织中， $\gamma\delta$ T 细胞是产生 IL-17 的主要细胞（而非 Th17 和 Tc17）， $\gamma\delta$ T17 细胞与肿瘤大小、淋巴结转移及血清 CA125 呈正相关[7]（该研究内容已发表于 Human Immunology）。进一步分析 TCGA 数据库发现，卵巢癌的 $\gamma\delta$ T 全蛋白表达谱和脾脏的 $\gamma\delta$ T 全蛋白表达谱显著不同，卵巢癌 $\gamma\delta$ T 全蛋白表达谱与 5 年生存率显著相关，表达 IL-17 水平在卵巢癌中和脾脏中显著不同。

那么为何 $\gamma\delta$ T 向产 IL17 的 $\gamma\delta$ T17 极化后，肿瘤微环境趋向免疫抑制， $\alpha\beta$ T 无法很好的发挥抗肿瘤作用呢？其一是《cell》已经报道的， $\gamma\delta$ T17 高度表达 PD-L1，通过和 $\alpha\beta$ T 表面 PD1 结合，激活了 PDL1/PD1 通路，产生免疫逃逸。其二，由于 $\alpha\beta$ T 的抗肿瘤活性主要依赖于 $\gamma\delta$ T 的抗原呈递，我们推测卵巢癌中极化后的 $\gamma\delta$ T17 相比原始的 $\gamma\delta$ T 共刺激分子 CD80 和 CD86 表达减弱，无法提呈抗原给 $\alpha\beta$ T， $\alpha\beta$ T 无法增殖分化，数量减少，分泌 IL2 和 TNF- α 功能减退，从而无法发挥直接杀伤肿瘤细胞的作用。

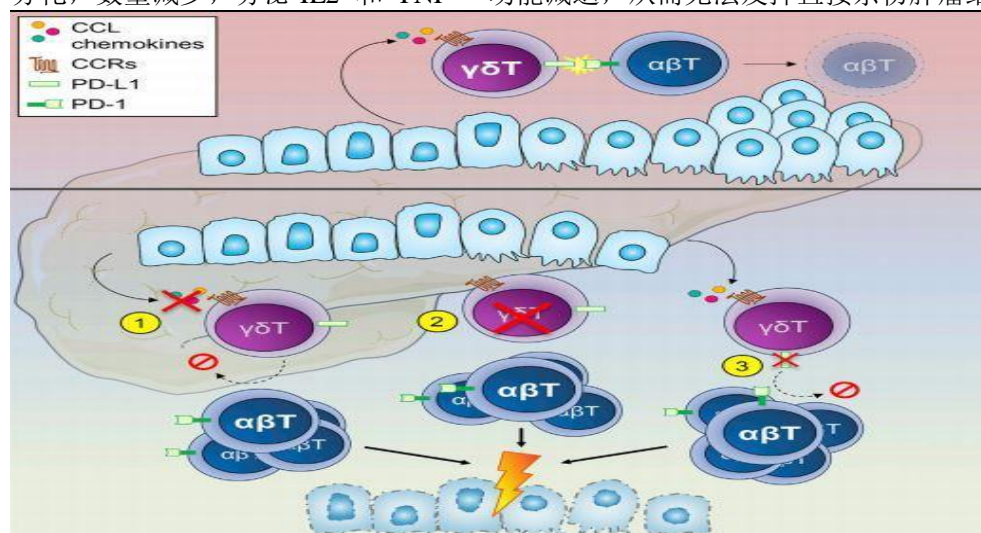


图 1. δ T17 对 $\alpha\beta$ T 作用机制图



3. CircZNF608-miR-152-5p-IL1 β 通路是 $\gamma\delta$ T17 极化的关键环节

CircRNA 与线性 RNA 不同, 没有传统的线性 RNA 的终端 5' 帽和 3' 尾, 具有共价闭环结构, 不容易被 RNase R 水解, 具有丰度高、特异性好和稳定性强的特性, 具有调节肿瘤微环境中细胞因子生成、血管生成和免疫功能等作用, 被认为具有广泛参与肿瘤微环境的潜力, 其主要通过海绵化线性的 miRNA 发挥功能[8-10]。microRNA (miRNA) 是一类长链非编码单链小分子 RNA, 可以通过降解 mRNA 或抑制 mRNA 的翻译, 抑制靶基因的表达。miRNA 在肿瘤的发生、发展和转归过程中发挥着重要作用, 是肿瘤微环境的重要调控因子。miRNA 参与调控 T 细胞的功能, 例如 miR-179、miR-181 和 miR-142 会影响 T 细胞稳态。此外, miRNA 可以调节细胞因子的生成, 例如 miR-142 可以调节 IL1 β 的生成, miR-30a 可以调节 IL-21R 的生成[11-13]。IL1 β 是诱导幼稚 $\gamma\delta$ T 成熟为产 IL17 的 $\gamma\delta$ 17 的关键细胞因子[14-16]。在小鼠模型中, IL-1 β , IL6, 和 TGF- β 可以诱导 $\gamma\delta$ T 成熟为产 IL17 的 $\gamma\delta$ 17。而在人体内, IL1 β 是更关键的诱导 $\gamma\delta$ T 成熟为产 IL17 的 $\gamma\delta$ 17 的细胞因子, 而不是 IL6 和 TGF- β [1]。

我们对 20 例卵巢癌和正常卵巢组织进行 RNA 测序, 与正常卵巢细胞及组织相比, CircZNF608 在卵巢癌细胞及组织中均低表达。CircZNF608 与 CA125 表达水平负相关, 与 PFS 正相关, 可能是卵巢癌预后的相关因素, 有成为卵巢癌标志物的潜能。CircZNF608 的过表达可以阻滞卵巢癌细胞的增殖和侵袭, 是卵巢癌的“抑癌基因”。CircZNF608 是本团队首次发现, 真实存在于卵巢癌细胞质中的 CircRNA。我们利用 CircMir 软件 (www.bio-inf.cn/circmir) 预测了 52 种 CircZNF608 和 miRNA 的交互, 并对 52 种 miRNA-circRNA 相互作用共转染实验, 发现仅有 miR-152-5p 被 CircZNF608 海绵吸附, CircZNF608 可以通过海绵吸附 miR-152-5p 抑制卵巢癌细胞增殖。然而其抑制卵巢癌增殖的下游机制尚不清楚[17] (该研究内容已发表于 Frontiers in Genetics)。预实验中我们发现, CircZNF608 的过表达抑制了 IL1 β 的生成, 我们推测 CircZNF608-miR-152-5p-IL1 β 通路是 $\gamma\delta$ T17 极化的关键环节。

CircZNF608- $\gamma\delta$ T17- $\alpha\beta$ T 机制假说

综上, 我们推测, 卵巢癌中 CircZNF608-miR-152-5p-IL1 β 通路抑制幼稚 $\gamma\delta$ T 向产 IL17 的成熟 $\gamma\delta$ T17 极化, 并抑制 $\gamma\delta$ T 表面的 PD-L1 和 $\alpha\beta$ T 的 PD1 结合, 从而抑制免疫逃逸, 此外, $\gamma\delta$ T17 极化后, 提呈抗原的共刺激分子 CD80 和 CD86 表达减弱, 无法提呈抗原给 $\alpha\beta$ T, $\alpha\beta$ T 增殖分化减弱, 数量和免疫功能下降, 从而无法发挥抗癌作用。卵巢癌细胞中起抑癌作用的 CircZNF608 的下降, 则导致了免疫抑制微环境的产生, 最终导致 $\gamma\delta$ T 和 $\alpha\beta$ T 关系由“协同抗癌”转向“ $\gamma\delta$ T 抑制 $\alpha\beta$ T 抗癌活性”。即由“阴阳平衡”变为“阴盛阳衰”。

黄芪-乳香对 CircZNF608- $\gamma\delta$ T17- $\alpha\beta$ T 通路的作用机制

CircZNF608-miR-152-5p-IL1 β 通路通过影响 $\gamma\delta$ T 极化, 最终导致 $\gamma\delta$ T 和 $\alpha\beta$ T 关系由同抗癌”转向“ $\gamma\delta$ T 抑制 $\alpha\beta$ T 活性”。该现象与中医学“阴阳失衡”存在共通点: 机阳消长失去相对平衡, 出现“阴盛阳衰”的病理变化; 同时, 脏腑、经络、气血等相互关系失调, 正气与邪气相互争持, 正衰邪胜, 进而促进疾病的发生与发展。《内经》云: “正气存内, 邪不可干; 邪之所凑, 其气必虚。”正虚邪实、阴阳失衡是肿瘤微环境的核心病机, “扶正祛邪”“调和阴阳平衡”是重塑肿瘤微环境的总则。“扶正固本”法可增强免疫, 重建正气[18]。

中医认为, 肿瘤的主要病机为“毒聚、瘀滞、痰凝”。《血证论》曰: “瘀血在经络脏腑之间, 则结为癥瘕, 瘕者或聚或散, 气为血滞, 则聚而成形”。由此可知肿瘤具有血瘀证的属性。现代药理实验证明, 活血化瘀方药具有保护血管内皮细胞、减少肿瘤血管异常生成以及诱导肿瘤良性血管生成等作用[19]。

卵巢癌归属于中医学的“积聚”、“微瘤”等疾病范畴。《妇人大全良方》记载: “夫妇人积年血癥块者, 由寒温失节, 脏腑气虚, 风冷在内, 与血气相结, 渐生颗粒, 盘牢不移动者也。”东汉张仲景、唐代王焘、宋代陈自明、明代《陈素庵妇科补解》和清朝《医宗金鉴·妇科心法要诀》均认为寒证为癥瘕的重要病因, 应予以温经行气活血[20]。由于气虚血瘀是肿瘤免疫抑制微环境的基本病机, “扶正固本”法可增强机体免疫, 改善肿瘤微环境免疫抑制状态。我们想到了黄芪这一扶正补气中药。据《本草纲目》记载“黄耆色黄, 为补药之长, 故名”, 其性微温, 具有补气升阳, 益卫固表, 扶正固本、升阳固表之功效。扶正益



气是黄芪防治肿瘤的基本原则。现代药理研究证实黄芪具有增强机体免疫功能、靶向调控 TME 中的免疫细胞、细胞因子及肿瘤外基质，并抑制 TME 的炎症反应，诱导细胞凋亡的作用[21]。

乳香其性温，味辛，苦，具有辛散温通，调气活血定痛，追毒，活血化瘀，消肿生肌之“温阳化瘀”功效，主治气血凝滞心腹疼痛等。本课题组在 2015-2018 年度国家自然科学基金面上项目《基于 WAVE3 调控和代谢组学的黄芪-乳香配伍对卵巢癌耐药及侵袭能力作用的机制研究》(81473636)的研究中发现，乳香的活性成分 11-羰基- β -乳香酸 (11-keto- β -boswellic acid, AKBA) 在卵巢癌体内、外模型中均可发挥抗肿瘤作用[22] 该研究内容已发表于 Biomedicine & Pharmacotherapy)。

补气活血配伍黄芪-乳香最早取于李幼昌的《李幼昌临床经验选集》，取益气活血，脱毒溃脓之效。黄芪及乳香同用可攻补兼施治虚劳，予补剂中加乳香通活气血，以其善破血，行气，消积，止痛，尤善调气。补剂中以为佐使，有淤者淤可缓消，即使无淤者亦可借其流通之力，以行补涩药之滞，乃使补药之力愈大也，这与卵巢癌病机相应（图 2）。在前一次国家自然科学基金立项中，我们探索了黄芪-乳香对于卵巢癌侵袭转移的研究，黄芪-乳香可以抑制卵巢癌肿瘤细胞生长，降低肿瘤的侵袭转移能力，然而其对卵巢癌免疫微环境调节作用尚不清楚，有待进一步探索。

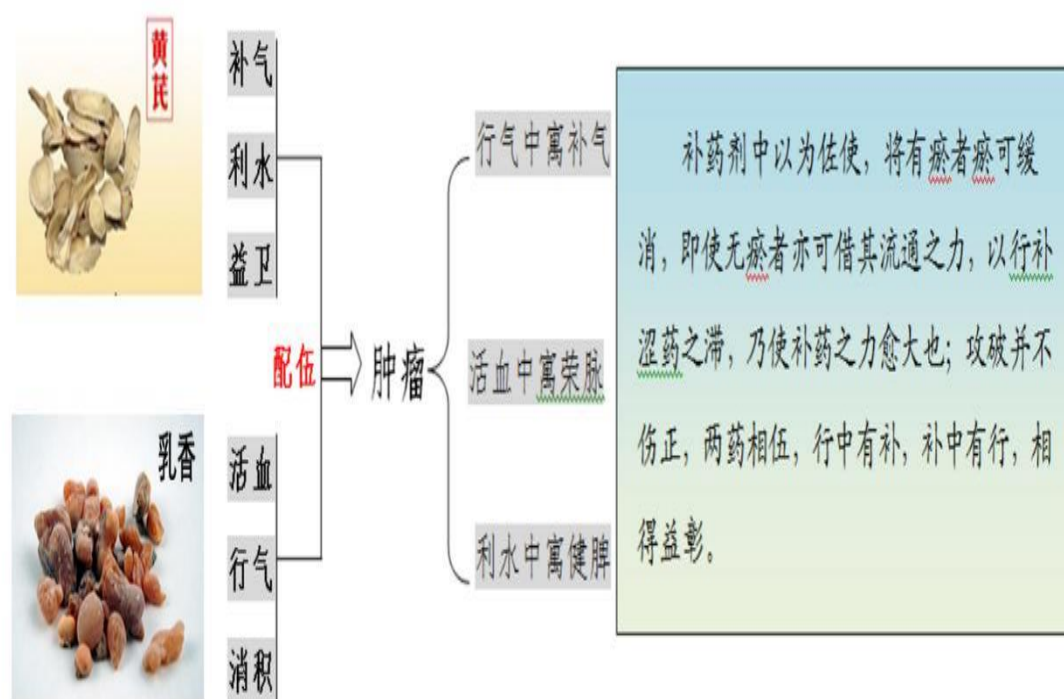


图 2 黄芪-乳香配伍理论意义

气虚血瘀是卵巢癌肿瘤免疫抑制微环境的基本病机，而 CircRNA 在肿瘤微环境中起核心地位，那么气虚血瘀和 CircRNA 是否有联系呢？北京中医药大学王阶教授团队通过生物信息学发现气虚血瘀症患者 CircRNA_09849 有差异表达[23]。高氏等通过收集冠心病、脑梗死、慢性胃炎、类风湿性关节炎气虚血瘀证患者血样，研究气虚血瘀患者 CircRNA 差异表达，结果发现 4 个差异表达的 CircRNA。将差异表达的 CircRNA 进行信号通路富集分析，发现其参与了 NK 细胞毒性通路和细胞周期通路的调控[24]。综上所述，我们提出假说，补气活血配伍黄芪-乳香能够提高 CircZNF608 表达，通过 CircZNF608-miR-152-5p-IL1 β 通路抑制幼稚 $\gamma\delta$ T 向产 IL17 型 $\gamma\delta$ T17 极化，抑制 $\gamma\delta$ T 表面的 PD-L1 和 $\alpha\beta$ T 的 PD1 结合，从而抑制免疫逃逸，此外，抑制 $\gamma\delta$ T17 极化后，提呈抗原的共刺激分子 CD80 和 CD86 表达增强，从而促进 $\alpha\beta$ T 发挥抗癌作用。使“ $\gamma\delta$ T17 抑制 $\alpha\beta$ T 抗癌活性”的关系转向“协同抗癌”，由“阴盛阳衰”逆转为“阴阳平衡”，重塑免疫微环境。



我们拟开展的研究内容如下：

- 1.模拟卵巢癌肿瘤免疫抑制微环境，明确黄芪-乳香对卵巢癌肿瘤微环境的干预效应。
- 2.明确黄芪-乳香对 CircZNF608-miR-152-5p-IL1 β 通路的相关 CircRNA、miRNA、细胞因子的影响及作用机制。
- 3.探索黄芪-乳香通过 CircZNF608-miR-152-5p-IL1 β 通路对 $\gamma\delta$ T17 极化效应，并进一步探索 $\gamma\delta$ T17 极化后对下游 $\alpha\beta$ T 免疫功能的调节作用，阐述黄芪-乳香如何使“ $\gamma\delta$ T17 抑制 $\alpha\beta$ T 抗癌活性”的关系转向 $\gamma\delta$ T 和 $\alpha\beta$ T “协同抗癌”。以明确黄芪-乳香通过以“CircZNF608- $\gamma\delta$ T17”为核心的重塑卵巢癌免疫抑制微环境的机制（图 3）。

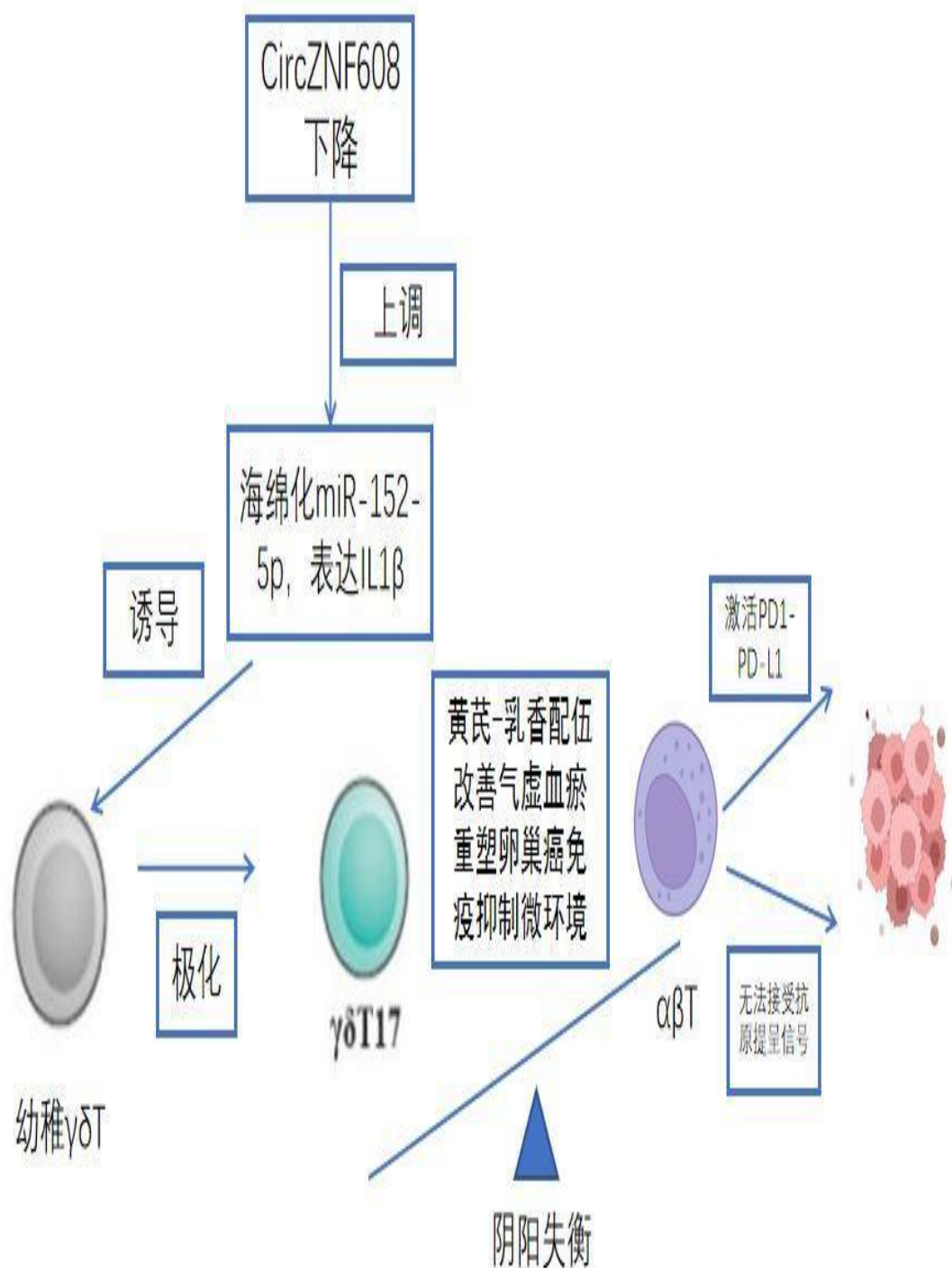


图 3 黄芪-乳香配伍对卵巢癌肿瘤免疫微环境的作用机制假说



参考文献:

1. De Vries NL, Van de Haar J, Veninga V, et al. $\gamma \delta$ T cells are effectors of immunotherapy in cancers with HLA class I defects. *Nature* 2023 ;613(7945).
2. Bordon Y. $\gamma \delta$ T cells mediate immunotherapy responses when cancers lack MHC class I. *Nature Reviews Immunology* 2023 ;23(3).
3. Mensurado S, Blanco-Domínguez R, Silva-Santos B, et al. The emerging roles of $\gamma \delta$ T cells in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2023 ;20(3).
4. Treis BS, Darcy PW, Khan IZ, et al. CR-V $\gamma \delta$ usage distinguishes protumor from antitumor intestinal $\gamma \delta$ T cell subsets. *Science* 2022;377(6603).
5. Silva-Santos, B., Mensurado, S. & Coffelt, S. B. et al. gammadelta T cells: pleiotropic immune effectors with therapeutic potential in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2019;19:392 - 404
6. Daley D, Zambirinis CP, Seifert L, et al. $\gamma \delta$ T Cells Support Pancreatic Oncogenesis by Restraining $\alpha \beta$ T Cell Activation. *Cell* 2016 ;166(6):1485-1499.
7. Hen X, Zhang X, Xu R, et al. Implication of IL-17 producing $\alpha \beta$ T and $\gamma \delta$ T cells in patients with ovarian cancer. *Hum Immunol* 2020;81(5):244-248. (本团队发表)
8. Lee BD, Neri U, Roux S, et al. Mining metatranscriptomes reveals a vast world of viroid-like circular RNAs. *Cell* 2023; 02(3): 186.
9. Broto M, Kaminski MM, Adrianus C, et al. Nanzyme-catalysed CRISPR assay for preamplification-free detection of non-coding RNAs. *Nature nanotechnology*. 2022 ;17(10)
10. Liu CX, Chen LL, et al. Circular RNAs: Characterization, cellular roles, and applications. *Cell* 2022 ;185(12)
11. Meister G, et al. MicroRNA uses a gym to get fit for cuts by Dicer enzyme. *Nature* 2023 ;615(7951)
12. Lee YY, Lee H, Kim H, et al. Structure of the human DICER-pre-miRNA complex in a dicing state. *Nature* 2023 615(7951)
13. Lee YY, Kim H, Kim VN, et al. Sequence determinant of small RNA production by DICER. *Nature* 2023;615(7951)
14. Mair F, Erickson JR, Frutoso M et al. Extricating human tumour immune alterations from tissue inflammation. *Nature* 2022;605(7911)
15. Li X, Wang H, Yu X, et al. Maladaptive innate immune training of myelopoiesis links inflammatory comorbidities. *Cell* 2022 ;185(10)
16. Orecchioni M, Kobiyama K, Winkels H, et al. Olfactory receptor 2 in vascular macrophages drives atherosclerosis by NLRP3-dependent IL-1 production. *Science* 2022 ;375(6577)
17. Lyu M, Li X, Shen Y, et al. CircATRNL1 and circZNF608 Inhibit Ovarian Cancer by Sequestering miR-152-5p and Encoding Protein. *Front Genet*. 2022; 13: 784089. (本团队发表)
18. 王静, 岳嘉, 郑贵森等. 参芪扶正注射液辅助治疗胃癌的研究现状 [J]. *中国医药*, 2023, 18(03): 458-462.
19. 马一鸣, 李仁廷, 张洁等. 活血化瘀疗法干预肿瘤微环境与血管新生的研究进展 [J]. *四川中医*, 2019, 37(03): 218-222.
20. 姚芃. 温阳化瘀法治疗中晚期卵巢癌的文献研究及临床应用探讨 [D]. 广州中医药大学, 2018.
21. 郑集美, 吴飞鹏, 宋素彩等. 抗肿瘤中药对肿瘤微环境免疫调节的研究进展 [J]. *亚太传统医药*, 2020, 16(06): 185-189.
22. Lu J, Wang YC, Shi ZJ, et al. 3-acetyl-11-keto-beta-boswellic acid decreases the malignancy of taxol resistant human ovarian cancer by inhibiting multidrug resistance (MDR) proteins function. *Biomed Pharmacother*. 2019;116:108992. (本团队发表)
23. 何浩强. 气滞血瘀证 RNA 差异表达谱生物信息学分析及潜在的诊断生物标志物研究 [D]. 北京中医药大学, 2018.
24. 高嘉良. 气滞血瘀证诊断量表及其 circRNA 差异表达研究. 中国中医科学院 [D], 2017.



2、本项目研究的目的、意义

- 1.探索黄芪-乳香配伍重塑卵巢癌免疫微环境的调节作用，验证黄芪-乳香通过 CircZNF608-miR-152-5p-IL1 β 通路对 $\gamma\delta$ T17 极化效应进行调节，阐述黄芪-乳香如何使“ $\gamma\delta$ T17 抑制 $\alpha\beta$ T 抗癌活性”的关系转向 $\gamma\delta$ T 和 $\alpha\beta$ T “协同抗癌”；
- 2.为黄芪-乳香配伍在卵巢癌免疫治疗中应用提供理论依据。

3、本项目研究现有起点科技水平及已存在的知识产权情况

随着肿瘤免疫研究的不断深入，免疫治疗已成为一种新型治疗手段。卵巢癌是妇科常见的恶性肿瘤之一，其死亡率居妇科肿瘤之首，相较于宫颈癌和子宫内膜癌等其他恶性肿瘤，其免疫治疗有效性较低，如何有效提高卵巢癌免疫治疗应答具有重要的临床意义。 $\gamma\delta$ T 细胞在肿瘤免疫中具有抗癌和促癌双重性质， $\gamma\delta$ T 细胞的抗癌作用主要在于不依靠经典 MHC 分子途径提呈抗原给效应 $\alpha\beta$ T 细胞，而 $\alpha\beta$ T 细胞可发挥杀伤肿瘤作用，此时 $\gamma\delta$ T 和 $\alpha\beta$ T 关系表现为“协同抗癌作用”。而 $\gamma\delta$ T 又可以在 IL1 β 作用下，被极化为产 IL17 的 $\gamma\delta$ T17 细胞， $\gamma\delta$ T17 可抑制 $\alpha\beta$ T 表面抗原表达，阻断 PD-L1 和 PD1 结合，抑制 $\alpha\beta$ T 抗癌效应， $\gamma\delta$ T 和 $\alpha\beta$ T 关系为“ $\gamma\delta$ T 抑制 $\alpha\beta$ T 抗癌活性”，发挥促进肿瘤进展的作用。前期通过检测新鲜卵巢癌组织肿瘤微环境中各成分的表达发现，IL-17 在卵巢癌组织中高表达，且 IL-17 表达水平与肿瘤细胞分化、淋巴结转移呈正相关。卵巢癌组织中， $\gamma\delta$ T 细胞是产生 IL-17 的主要细胞（而非 Th17 和 Tc17）， $\gamma\delta$ T17 细胞与肿瘤大小、淋巴结转移及血清 CA125 呈正相关， $\gamma\delta$ T17 是衡量卵巢癌肿瘤组织免疫抑制微环境的关键淋巴细胞，是免疫逃逸的风向标。进一步研究发现卵巢癌肿瘤组织中 CircZNF608 表达下调，并通过海绵化 miR-152-5p 发挥抑癌作用。扶正化癌方黄芪-乳香可以抑制卵巢癌肿瘤细胞生长和侵袭转移，但对卵巢癌肿瘤免疫微环境影响尚不清楚。结合前期研究，乳香酸可下调 SKOV3 细胞 PDL1 基因和蛋白表达，我们推测黄芪-乳香配伍可以调节卵巢癌肿瘤免疫微环境，通过 CircZNF608-miR-152-5p-IL1 β 通路影响 $\gamma\delta$ T 极化为 $\gamma\delta$ T17，使 $\gamma\delta$ T17 重新抗原呈递给 $\alpha\beta$ T 细胞，并且阻断 $\gamma\delta$ T17 和 $\alpha\beta$ T 细胞的 PD-L1-PD1 通路，重塑肿瘤免疫微环境，使“ $\gamma\delta$ T17 抑制 $\alpha\beta$ T 抗癌活性”逆转为“协同抗癌”。目前国内外在调节卵巢癌肿瘤免疫微环境的研究中，尚未有黄芪-乳香通过 CircZNF608-miR-152-5p-IL1 β 通路对 $\gamma\delta$ T17 极化效应机制的研究。

本研究不存在侵犯其他知识产权情况。

4、本项目研究国内外竞争情况及产业化前景

本项目研究国内外竞争情况：

$\gamma\delta$ T 细胞在肿瘤免疫作用中具有抗癌和促癌双重性作用，当 $\gamma\delta$ T 提呈抗原给 $\alpha\beta$ T 细胞时， $\alpha\beta$ T 杀伤肿瘤细胞，此时 $\gamma\delta$ T 和 $\alpha\beta$ T 为协同抗癌；在 IL1 β 作用下， $\gamma\delta$ T 被极化为能产生 IL17 的 $\gamma\delta$ T17 时，则抑制 $\alpha\beta$ T 抗癌活性，促进肿瘤发展。前期研究课题组发现扶正化癌方黄芪-乳香配伍具有抑制卵巢癌生长和侵袭转移的作用，但对肿瘤免疫微环境作用及其机制尚不清楚；CircZNF608 在卵巢癌中表达下调，并通过海绵化 miR-152-5p 发挥抑癌作用。本课题拟通过卵巢癌类器官模型及原位移植瘤等实验，观测黄芪-乳香配伍对卵巢癌免疫微环境的作用，验证其通过 CircZNF608-miR-152-5p-IL1 β 通路调节 $\gamma\delta$ T 极化为 $\gamma\delta$ T17，增强抗原呈递，促进 $\alpha\beta$ T 细胞抗癌作用，使“ $\gamma\delta$ T17 抑制 $\alpha\beta$ T 抗癌活性”逆转为“协同抗癌作用”，从而重塑肿瘤免疫微环境，经文献检索目前国内外尚未有相似文献报道。



产业化前景:

本研究创新了中西医结合治疗卵巢癌的理论,通过中医的阴阳理论,运用扶正化癥方黄芪-乳香使“ $\gamma\delta$ T17 抑制 $\alpha\beta$ T 抗癌活性”的关系转向 $\gamma\delta$ T 和 $\alpha\beta$ T “协同抗癌”。探索 CircZNF608 通过海绵化 miR-152-5p 影响 $\gamma\delta$ T 极化为 $\gamma\delta$ T17,并进一步研究 $\gamma\delta$ T17 对下游 $\alpha\beta$ T 的免疫功能的影响,对于探索环状 RNA 和 $\gamma\delta$ T 在肿瘤微环境中的作用和联系有重要意义,具有首创性。实验技术创新,通过 Tcr $\delta^{-/-}$ 小鼠移植瘤模型的建立,研究无 $\gamma\delta$ T 下黄芪-乳香配伍通过 CircZNF608 对下游 $\alpha\beta$ T 的免疫功能的影响,更好的说明 $\gamma\delta$ T17 是否是机制的关键点。

二、研究内容

1、具体研究开发内容和要重点解决的关键技术问题

具体研究开发内容:

1 黄芪-乳香对卵巢癌肿瘤免疫微环境 (TIM) 的作用

1-1 卵巢癌类器官模型实验

取新鲜卵巢癌肿瘤标本,构建类器官模型以模型肿瘤免疫抑制微环境。通过划痕、Transwell 迁移、Matrigel 侵袭实验,模拟肿瘤细胞迁移、侵袭过程,观察黄芪-乳香对肿瘤的迁移、侵袭力的作用。利用 Western Blot、RT-PCR 方法检测转移相关蛋白表达。Western Blot、RT-PCR 流式细胞仪检测肿瘤免疫抑制微环境标志物肿瘤相关巨噬细胞 M1/M2,髓源性抑制细胞 (MDSC),肿瘤浸润淋巴细胞 TILs 的变化。

1-2 SKOV3 卵巢癌原位移植瘤实验

建立 SKOV3 卵巢癌原位移植瘤模型,利用活体荧光系统,计算肿瘤生长曲线,转移的位数,转移病灶部分。小鼠处死后,检测肿瘤体积,肿瘤质量,检测肿瘤及肿瘤旁组织 MMP2、MMP9 蛋白表达和变化。肿瘤免疫抑制微环境标志物肿瘤相关巨噬细胞 M1/M2,髓源性抑制细胞 (MDSC),肿瘤浸润淋巴细胞 TILs 的数量变化。

2.黄芪-乳香对 CircZNF608-miR-152-5p-IL1 β 通路的相关 CircRNA, miRNA,细胞因子的影响及机制研究

2-1 卵巢癌类器官模型实验

使用 SiRNA 沉默 circZNF608,卵巢癌类器官模型中检测 miR-152-5p 表达水平,并检测 TNF β , IL2, IL21, IL23, IL1 β 的表达水平。用药后,再次检测相关指标。

2-2 SKOV3 卵巢癌原位移植瘤模型实验

建立 SKOV3 卵巢癌原位移植瘤模型,用药后检测 CircZNF608, miR-152-5p, Western Blot 检测 TNF β , IL2, IL21, IL23, IL1 β 的变化。

3 幼稚 $\gamma\delta$ T 极化为 $\gamma\delta$ T17 后对 $\alpha\beta$ T 免疫功能的影响

3-1 体外细胞实验

取脾脏 $\gamma\delta$ T,使用 IL1 β 极化为 $\gamma\delta$ T17,和 $\alpha\beta$ T 共培养后,检测脾脏 $\gamma\delta$ T 和 $\gamma\delta$ T17 免疫耗竭受体 PD-L1 和 Galectin-9 表达,检测脾脏 $\gamma\delta$ T 和 $\gamma\delta$ T17 表面 CD80 和 CD86 表达以验证其抗原呈

递作用,检测 $\alpha\beta$ T PD1 的表达, $\alpha\beta$ T 细胞数量及体现 $\alpha\beta$ T 免疫功能的 IL2 和 TNF- α 的改变。

3-2 SKOV3 卵巢癌原位移植瘤模型

IL1 β 刺激 $\gamma\delta$ T 极化为 $\gamma\delta$ T17,检测 $\gamma\delta$ T17 免疫耗竭受体 PD-L1 和 Galectin-9 表达,检测 $\gamma\delta$ T17 表面 CD80 和 CD86 表达以验证其抗原呈递作用,检测 $\alpha\beta$ T PD1 的表达, $\alpha\beta$ T 细胞数量及体现 $\alpha\beta$ T 免疫功能的 IL2 和 TNF- α 的改变。

3-3 Tcr $\delta^{-/-}$ 小鼠转移瘤模型

即小鼠中无 $\gamma\delta$ T,检测 $\alpha\beta$ T PD1 的表达, $\alpha\beta$ T 细胞数量及体现 $\alpha\beta$ T 免疫功能的 IL2 和 TNF- α 的改变。

4.黄芪-乳香通过 CircZNF608-miR-152-5p-IL1 β 通路对 $\gamma\delta$ T17 极化和 $\alpha\beta$ T 功能状态的影响



202300171-SSH20230140026

4-1 卵巢癌类器官模型实验

建立卵巢癌类器官模型，研究黄芪-乳香配伍对 CircZNF608, miR-152-5p, IL-1 β , IL17, γ δ T 17 的数量及 PD-L1 的表达，并检测 γ δ T 17 抗原提呈分子 CD80 和 CD86 的表达，检测 α β T 的数量及 PD1 的表达，体现 α β T 功能的 IL2 和 TNF- α 的改变。

4-2 SKOV3 卵巢癌原位移植瘤实验

建立 SKOV3 卵巢癌移植瘤模型，研究黄芪-乳香配伍对 CircZNF608, miR-152-5p, IL-1 β , IL17, γ δ T 17 的数量及 PD-L1 的表达，并检测 γ δ T 17 抗原提呈分子 CD80 和 CD86 的表达，检测 α β T 的数量及 PD1 的表达，体现 α β T 功能的 IL2 和 TNF- α 的改变。

4-3 Tcr δ -/- 小鼠移植瘤模型实验

建立 Tcr δ -/- 小鼠移植瘤模型，即小鼠无 γ δ T，研究黄芪-乳香配伍对 CircZNF608, miR-152-5p, IL-1 β , IL17, 检测 α β T 的数量及 PD1 的表达，体现 α β T 功能的 IL2 和 TNF- α 的改变。

重点解决的关键技术：

1. 质粒转染技术，ShRNA, SiRNA 等沉默循环 RNA 及蛋白的技术，本课题组博士研究生指导老师王金华教授在 2015-2018 年度国家自然科学基金面上项目《基于 WAVE3 调控和代谢组学的黄芪-乳香配伍对卵巢癌耐药及侵袭能力作用的机制研究》曾使用 SiRNA 沉默 WAVE3，技术成熟。

2. 建立卵巢癌类器官模型，使其更接近卵巢癌的肿瘤微环境 本课题组预实验中曾尝试使用，和南京医科大学药学院建立合作关系，已培育卵巢癌类器官模型。

3. Tcr δ -/- 小鼠移植瘤模型的建立。本研究小组已经熟练掌握了 Tcr δ -/- 小鼠移植瘤模型，和南京医科大学药学院建立合作关系，积累了丰富的技术研究经验。

2、项目的特色和创新之处

1. 视角创新：环状 RNA 和 γ δ T 在肿瘤微环境中均起重要作用被广泛研究，然而环状 RNA 和 γ δ T 两者的关系及机制研究不明确。本研究探索 CircZNF608 通过海绵化 miR-152-5p 影响 γ δ T 极化为 γ δ T17，并进一步研究 γ δ T17 对下游 α β T 的免疫功能的影响，对于探索环状 RNA 和 γ δ T 在肿瘤微环境中的作用和联系有重要意义，具有首创性。

2. 中西医结合的理论创新：对于 γ δ T 极化的下游，对 α β T 免疫功能的影响，黄芪-乳香配伍使“ γ δ T17 抑制 α β T 抗癌活性”的关系转向 γ δ T 和 α β T “协同抗癌”和中医的阴阳理论不谋而合，为扶正化瘀方黄芪-乳香在卵巢癌中的运用提供理论依据。

3. 技术创新：Tcr δ -/- 小鼠移植瘤模型的建立，研究无 γ δ T 下黄芪-乳香配伍通过 CircZNF608 对下游 α β T 的免疫功能的影响，更好的说明 γ δ T17 是否是机制的关键点。

3、要达到的主要技术、经济指标及社会、经济效益

1、确定 CircZNF608- γ δ T17- α β T 机制通路

2、阐明黄芪-乳香配伍对 CircZNF608- γ δ T17- α β T 通路影响

3、发表 3 篇论文，国内核心期刊论文 1 篇；SCI 论文 2 篇；在学术会议进行报告交流。



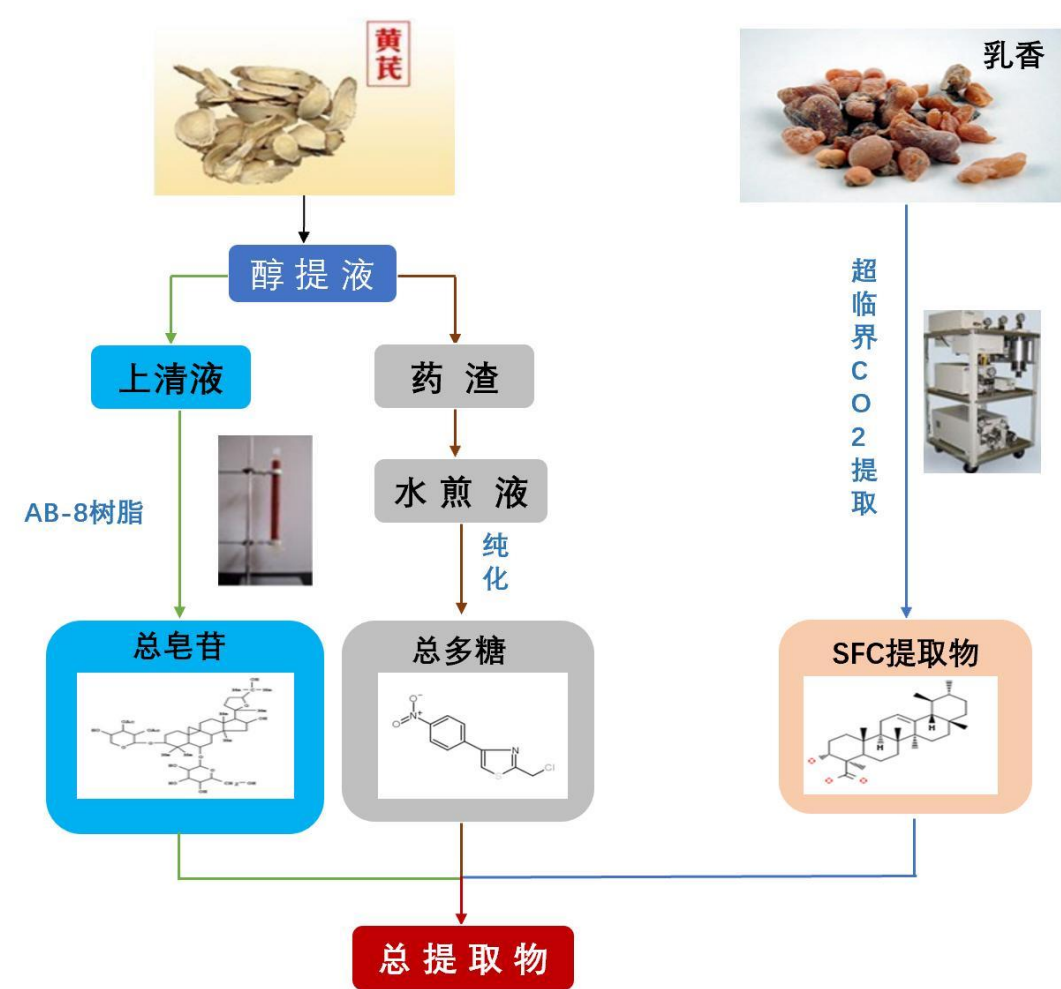
三、研究试验方法、技术路线（框图）以及工艺流程

(1) 黄芪、乳香药液质量标准研究及含药血清学制备

选择代表性药物：黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus*(Fisch)、*Bge.var.mongholicus*(Bge)Hsiao 的干燥根。乳香为橄榄科植物乳香树 *Boswellia carterii* Birdw、鲍达乳香树 *B bhaw —dajiana* Birdw 及同属植物皮部渗出的油胶树脂。黄芪抗肿瘤活性成分主要为三萜皂苷类、多糖类等，通过查阅相关文献确定了黄芪抗肿瘤活性成分提取方案。（参见：石忠峰,陈蔚文,李卫民等，大孔吸附树脂纯化黄芪总皂苷的研究；王淑萍,李晓静,张桂珍，黄芪多糖提取分离纯化工艺的优化研究）。乳香中萜类和挥发油为主要的药效成分。使用超临界 CO₂ 流体作萃取剂，萃取时加入夹带剂（参见：李敏等，基于 CO₂ 超临界萃取的乳香、没药及配伍药对挥发性成分抗肿瘤活性研究）

1) 制法黄芪，加 70%乙醇回流 2 次，合并二次滤液，浓缩至无醇味，以水溶解，上 AB-8 大孔吸附树脂，得黄芪总皂苷；乙醇回流后的药渣用水煎煮 3 次，合并 3 次煎液，浓缩，纯化得黄芪多糖；乳香采用超临界 CO₂ 流体萃取技术得 SFC 提取物，上述三种物质合并得黄芪、乳香抗肿瘤活性提取物。

2) 工艺流程



黄芪、乳香总提取物制备工艺路线图

3) 质量标准的研究

定性鉴别

制备对照品溶液、对照药材溶液、供试品溶液，阴性供试品溶液，照薄层色谱法(中国药典 2010 年版一部附录VIB)试验，将上述样品点于薄层板上，配制适当展开剂，展开，取出，晾干，显色。检查供试品色谱，与对照品、对照药材色谱相应位置上是否显相同颜色的斑点，



且阴性对照无干扰。

定量分析

①以提取物中 α -BA、 β -BA、 α -ABA、 β -ABA、KBA 和 AKBA 为定量考察指标，采用 HPLC 法测定，经方法学考察，进行含量测定。

②以提取物中黄芪甲苷为定量考察指标，采用 HPLC-ELSD 法，经方法学考察，进行含量测定。

③以提取物中多糖为定量考察指标，采用蒽酮-浓硫酸比色法，经方法学考察，进行含量测定。

4) 含药血清制备

选用 4 周龄雌性 BALB/C. nu 裸鼠，体质量(200±20g)。随机分为空白对照组、阴性对照组、黄芪组、乳香组、黄芪乳香配伍组(高中低剂量)，每组按照临床剂量折算为动物剂量，再配成 2ml/kg 溶液灌胃，正常组以生理盐水 2ml/kg 灌胃。给药组，每天灌胃给药 1 次，连续 7 天，对照组每天灌服等量生理盐水。末次给药 1 后，腹主动脉取血，4℃静置 4 h，3000r/min 离心 10 min 分离血清，微孔滤膜除菌，灭活补体，同组血清合并，低温冰箱保存备用。细胞实验时，分别加入对应组别的含药血清。(2) 黄芪-乳香对卵巢癌侵袭转移和肿瘤免疫抑制微环境的作用

1) 卵巢癌类器官模型的建立

收集 2023 年 8 月至 2023 年 9 月在镇江市第一人民医院手术的 3 例卵巢癌患者。编号为 OC1, OC2, OC3, 纳入标准: 1.病理诊断为高级别浆液性卵巢癌。2 术前无化疗史。无菌条件下将 OC 样本转移至无菌培养皿中，将肿瘤组织切成小块组织块，随后用 1×胶原酶/透明质酸酶/DNase I 酶混合液在 37℃条件下消化，加入完全培养基终止消化。收集细胞后过滤、离心、重悬和计数。按每孔 $(0.5\sim1)\times10^4$ 个细胞/孔的密度接种。OC PDO 模型传代用预冷枪头吹打 PDO 和 Matrigel 后，培养基中，洗涤、离心，待 PDO 分离成单个细胞时，加入完全培养基终止消化。按照 1:2 至 1:5 的比例重悬于培养基/Matrigel 混合物中，按照前述步骤接种于 24 孔板中培养。接着进行 HE 染色 ①脱蜡。60℃烘箱烤片 2 h，后转入二甲苯溶液；②水化。将切片转入 100%~75%梯度乙醇；③抗原修复。将切片转移至 EDTA 抗原修复液(pH 9.0)中进行热修复④封闭。OC PDO 模型经培养和传代后，显微镜下可见从单细胞或小微球状态长到紧致实性球体或带有囊腔样结构球体。每 1~2 周传代，OC PDO 模型能稳定传代并维持增殖活力。最后通过组织病理学观察和免疫组织化学染色确定模型稳定性。

通过划痕、Transwell 迁移、Matrigel 侵袭实验，模拟肿瘤细胞迁移、侵袭过程，观察黄芪、乳香对肿瘤的迁移、侵袭力的作用。利用 Western Blot、RT-PCR 方法检测转移相关蛋白表达。利用 Western Blot、RT-PCR 流式细胞仪检测肿瘤免疫抑制微环境标志物肿瘤相关巨噬细胞 M1/M2，髓源性抑制细胞(MDSC)，肿瘤浸润淋巴细胞 TILs 的变化。

2) SKOV3 小鼠移植瘤模型建立

SKOV3 原位移植瘤模型。原位瘤移植术前 1 周，将 SKOV3 细胞注射到裸鼠小鼠右前肢皮下，待皮下瘤直径约 1cm 时处死小鼠，在无菌条件下取出瘤块，置于 PBS 溶液中，剪刀切割为 1mm³ 小块。2%戊巴比妥钠麻醉后用组织胶进行原位肿瘤移植，缝合腹壁。分为空白组，荷瘤组，荷瘤组+黄芪，荷瘤组+乳香，荷瘤组+黄芪+乳香，给药剂量为荷瘤组+黄芪+乳香 1.6g/kg，荷瘤组+黄芪 0.8g/kg，荷瘤组+乳香 0.8g/kg。其余给药等体积生理盐水，连续给药 3 周。

3) 肿瘤转移情况

黄芪-乳香提取物灌胃治疗，连续给药 21 d 后 CO2 窒息处死后腹腔解剖，剥离瘤体称重后用卡尺测量肿瘤的短径(a)和长径(b)，肿瘤体积使用以下拉姆公式估算： $\pi (a^2 \times b) / 6$ 。

(4)部分

瘤体用于 H&E 染色检测细胞形态及免疫组化。另一部分用于制备肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)，使用肿瘤解离试剂盒(德国)和 TIL gen- tleMACS 解离仪(德国)。通过使用梯度 Percoll II 溶液(USA)的密度梯度离心从肿瘤悬浮液中分离 TIL。采用流式细胞术检测胞内细胞因子的水平、细胞内分子表达检测。

利用活体荧光系统，计算肿瘤生长曲线，转移的位数，转移病灶部分。小鼠处死后，检测肿瘤体积，肿瘤质量，检测肿瘤及肿瘤旁组织 MMP2、MMP9 蛋白表达和变化。肿瘤免疫



抑制微环境标志物肿瘤相关巨噬细胞 M1/M2, 髓源性抑制细胞 (MDSC), 肿瘤浸润淋巴细胞 TILs 的数量变化。

(3) 黄芪-乳香对 CircZNF608-miR-152-5p-IL1 β 通路的相关 CircRNA, miRNA, 细胞因子的影响及机制研究

类器官模型实验

使用 SiRNA 沉默 circZNF608, 卵巢癌类器官模型中检测 miR-152-5p 表达水平, WB 及 PCR 检测 TNF β , IL2, IL21, IL23, IL1 β 的表达水平。根据用药情况, 分为空白组, 黄芪组, 乳香组, 黄芪乳香组, 再次检测相关指标。

SKOV3 卵巢癌原位移植瘤模型实验

取 20 只 SKOV3 卵巢癌原位移植瘤模型, 分为空白组, 荷瘤组, 荷瘤组+黄芪, 荷瘤组+乳香, 荷瘤组+黄芪+乳香, 给药剂量为荷瘤组+黄芪+乳香 1.6g/kg, 荷瘤组+黄芪 0.8g/kg, 荷瘤组+乳香 0.8g/kg。用药后检测 CircZNF608, miR-152-5p, Western Blot 检测 TNF β , IL2, IL21, IL23, IL1 β 的变化。

(4) 幼稚 $\gamma\delta$ T 极化为 $\gamma\delta$ T17 后对 $\alpha\beta$ T 免疫功能的影响

4-1 体外细胞实验

取脾脏 $\gamma\delta$ T, 使用 IL1 β 极化为 $\gamma\delta$ T17, 和 $\alpha\beta$ T 共培养后, WB 及 PCR 检测脾脏 $\gamma\delta$ T 和 $\gamma\delta$ T17 免疫耗竭受体 PD-L1 和 Galectin-9 表达, 流式细胞仪检测脾脏 $\gamma\delta$ T 和 $\gamma\delta$ T17 表面 CD80 和 CD86 表达以验证其抗原呈递作用, 检测 $\alpha\beta$ T PD1 的表达, 流式细胞仪, WB 及 PCR 检测 $\alpha\beta$ T 细胞数量及体现 $\alpha\beta$ T 免疫功能的 IL2 和 TNF- α 的改变。

4-2 SKOV3 卵巢癌原位移植瘤模型

取 20 只 SKOV3 卵巢癌原位移植瘤模型。检测注射 IL1 β 前后, 检测 $\gamma\delta$ T17 免疫耗竭受体 PD-L1 和 Galectin-9 表达, 检测 $\gamma\delta$ T17 表面 CD80 和 CD86 表达以验证其抗原呈递作用, 检测 $\alpha\beta$ T PD1 的表达, 流式细胞仪检测, WB 及 PCR 检测 $\alpha\beta$ T 细胞数量及体现 $\alpha\beta$ T 免疫功能的 IL2 和 TNF- α 的改变。

4-3 Tcr $\delta^{-/-}$ SKOV3 小鼠转移瘤模型

取 20 只 Tcr $\delta^{-/-}$ SKOV3 小鼠转移瘤模型, 即小鼠中无 $\gamma\delta$ T。检测注射 IL1 β 前后, WB 及 PCR 检测 WB 及 PCR 检测 $\alpha\beta$ T PD1 的表达, 流式细胞仪, WB 及 PCR 检测检测 $\alpha\beta$ T 细胞数量及体现 $\alpha\beta$ T 免疫功能的 IL2 和 TNF- α 的改变。

(5) 黄芪-乳香通过 CircZNF608-miR-152-5p-IL1 β 通路对 $\gamma\delta$ T17 极化和 $\alpha\beta$ T 功能状态的影响

5-1 卵巢癌类器官模型实验

建立卵巢癌类器官模型, 根据用药情况, 分为空白组, 黄芪组, 乳香组, 黄芪乳香组, 研究黄芪-乳香对 CircZNF608, miR-152-5p, IL-1 β , IL17, $\gamma\delta$ T17 的数量及 PD-L1 的表达, 流式细胞仪, WB, PCR 检测 $\gamma\delta$ T17 抗原提呈分子 CD80 和 CD86 的表达, 检测 $\alpha\beta$ T 的数量及 PD1 的表达, 体现 $\alpha\beta$ T 功能的 IL2 和 TNF- α 的改变。

5-2 SKOV3 卵巢癌原位移植瘤实验

取 20 只 SKOV3 卵巢癌移植瘤模型, 分为空白组, 荷瘤组, 荷瘤组+黄芪, 荷瘤组+乳香, 荷瘤组+黄芪+乳香。流式细胞仪, WB, PCR 检测黄芪-乳香对 CircZNF608, miR-152-5p, IL-1 β , IL17, $\gamma\delta$ T17 的数量及 PD-L1 的表达, 并检测 $\gamma\delta$ T17 抗原提呈分子 CD80 和 CD86 的表达, 检测 $\alpha\beta$ T 的数量及 PD1 的表达, 体现 $\alpha\beta$ T 功能的 IL2 和 TNF- α 的改变。

5-3 Tcr $\delta^{-/-}$ SKOV3 小鼠移植瘤模型实验

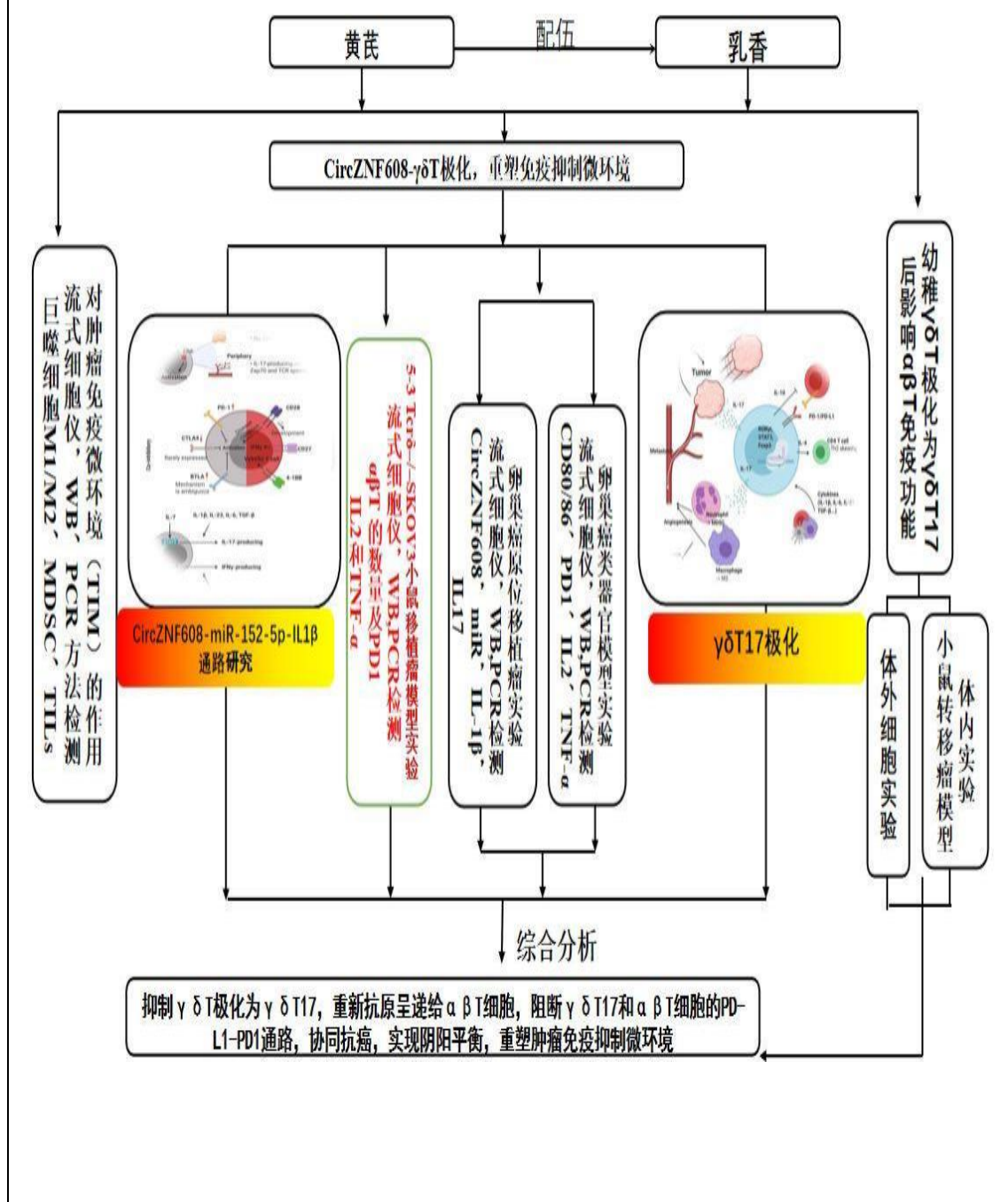
取 20 只 Tcr $\delta^{-/-}$ SKOV3 小鼠转移瘤模型, 即小鼠无 $\gamma\delta$ T, 分为空白组, 荷瘤组, 荷瘤组+黄芪, 荷瘤组+乳香, 荷瘤组+黄芪+乳香。流式细胞仪, WB, PCR 检测黄芪-乳香配伍对

CircZNF608, miR-152-5p, IL-1 β , IL17, 检测 $\alpha\beta$ T 的数量及 PD1 的表达, 体现 $\alpha\beta$ T 功能的 IL2

和 TNF- α 的改变。



技术路线图：



四、工作基础和条件

1、承担单位概况，与项目相关的知识产权状况

申请人所在江苏大学附属人民医院，拥有独立的中心实验室，中心实验室拥有细胞培养实验室、细胞生物学实验室、分子生物实验室和动物研究基地。申请人的博士指导老师王金华教授所在的南京医科大学附属肿瘤医院是江苏省最大的三级甲等肿瘤专科医院和省肿瘤防治研究所，拥有独立的中心实验室，中心实验室是江苏省重点实验室，长期合作单位南京中医药大学基础医学院为国家教育部理科基地建设点单位之一，所在学科点为国家中医药管理局重点学科，江苏省政府重点学科建设点，拥有江苏省中医优势学科“现代生物技术与中医药研究中心”，学校建有 SPF 级标准动物房，有先进的仪器设备，完全可以提供课题所需的实验平台、场所、仪器设备等软硬件支撑。

具备的主要实验条件：

1、恒温恒湿 CO ₂ 培养箱	1、恒温恒湿 CO ₂ 培养箱
2、real-time PCR 仪	2、real-time PCR 仪
3、电影凝胶成像体系	3、电影凝胶成像体系
4、western blot 系统	4、western blot 系统
5、蛋白/核酸分析仪	5、蛋白/核酸分析仪
6、荧光风光光度仪	6、荧光风光光度仪
7、流式细胞仪	7、流式细胞仪
8、冰冻切片仪	8、冰冻切片仪

尚缺有关单克隆抗体、各种检测试剂盒，可通过国内外有关生物试剂公司购买和国外科研合作单位赠送。

2、本项目现有的研究工作基础

研究基础:

项目课题组一直致力于女性生殖系统肿瘤尤其是卵巢癌生物行为的分子研究，前期已成功建立起卵巢癌顺铂和紫杉醇耐药细胞株，并运用于卵巢癌耐药逆转的系列研究，相关成果发表于《中华肿瘤防治杂志》（2010 年）和《肿瘤研究与临床》（2010 年）等杂志[1]。在临床工作中，以临床问题为导向，结合传统的中医药理论、现代药理学和代谢组学基础上，完成了黄芪与乳香配伍抑制卵巢癌侵袭转移的分子机理研究，结果显示：补气活血配伍不仅能消除活血化瘀药，尤其破血药带来的负面效应，且能协同增效及延缓肿瘤转移。项目组研究同时还发现乳香酸的提取物中的活性成分 11-羧基-B-乳香酸(11-keto-B-boswellic acid, AKBA)对卵巢癌细胞有明显的抑制作用，可以逆转卵巢癌耐药细胞的多药耐药，降低肿瘤细胞侵袭能力，并能增强紫杉醇抗肿瘤作用，促进细胞凋亡；构建的裸鼠卵巢癌动物模型中，给与乳香酸干预 2 周，发现肿瘤生长呈剂量依赖性抑制。研究结果表明，乳香酸在体内、外均可发挥抗肿瘤作用（该研究内容已发表于 Biomedicine & Pharmacotherapy）[2]。（见研究基础图 1-3）

1.王金华*,赵万洲,陈小祥,赵一兵,曲军卫,彭素蓉.人卵巢癌紫杉醇耐药细胞株 OV1228/Taxol 的建立.中华肿瘤防治杂志,2010,17(23):1920-1923.（通讯作者，唯一），被引用次数：6

2、王金华*, 赵万洲, 陈小祥, 赵一兵, 曲军卫, 朱步鑫. 人类卵巢癌顺铂耐药细胞株 OV1228/cDDP 的建立及其生物学特性.肿瘤研究与临床, 2010, 22（6）:361-365.（通讯作者，唯一）。

3.Jin L,Yingchun W, Jinhua W et al.3-acetyl-11-keto-beta-boswellic acid reverses taxol resistance in human ovarian cancer by inhibiting multidrug resistance (MDR) proteins function.Biomed. Pharmacother.2019;116（通讯作者）

我们对 20 例卵巢癌和正常卵巢组织进行对照研究发现，CircZNF608 主要位于卵巢癌细胞质中且高度保守，CircZNF608 的过表达可以阻滞卵巢癌细胞的增殖和侵袭；运用 CircMir 软件(www.bio-inf.cn/circmir) 预测了 52 种 CircZNF608 和 miRNA 的交互，并对 52 种



miRNA-circRNA 相互作用共转染实验进行荧光素酶报告基因分析,发现只有 miR-152-5p 抑制荧光素酶活性超过 50%,即仅有 miR-152-5p 被 CircZNF608 海绵吸附,CircZNF608 可以通过海绵吸附 miR-152-5p 发挥抗肿瘤作用。生信分析和实验表明 CircZNF608 包含了一个核糖体进入位点,且编码 131 aa 蛋白质。(该研究内容已发表于 Frontiers in Genetics) (见研究基础图 4-7)

Mengmeng Lyu , Xiujuan Li, Jinhua Wang et al.CircATRNL1 and circZNF608 Inhibit 5. Ovarian Cancer by Sequestering miR-152-5p and Encoding Protein. Front. Genet.2022,13;784089 (通讯作者)

$\gamma \delta$ T17 是衡量肿瘤组织免疫抑制微环境的关键,是免疫逃逸的风向标。通过检测新鲜卵巢癌组织 TME 中各成分的表达发现,IL-17 在卵巢癌组织中高表达,且 IL-17 表达水平与肿瘤细胞分化、淋巴结转移呈正相关。卵巢癌组织中, $\gamma \delta$ T 细胞是产生 IL-17 的主要细胞(而非 Th17 和 Tc17), $\gamma \delta$ T17 细胞与肿瘤大小、淋巴结转移及血清 CA125 呈正相关(该研究内容已发表于 Human Immunology)。通过分析 TCGA 数据库发现,卵巢癌 $\gamma \delta$ T 全蛋白表达谱与 5 年生存率显著相关,卵巢癌的 $\gamma \delta$ T 全蛋白表达谱和脾脏的 $\gamma \delta$ T 全蛋白表达谱显著不同。(见研究基础图 8-14)

Xian Chen, Xiaojie Zhang,Jinhua Wang et al. Implication of IL-17 producing $\alpha \beta$ T and $\gamma \delta$ T cells in patients with ovarian cancer.Human Immunology.2020,81(5) (通讯作者)

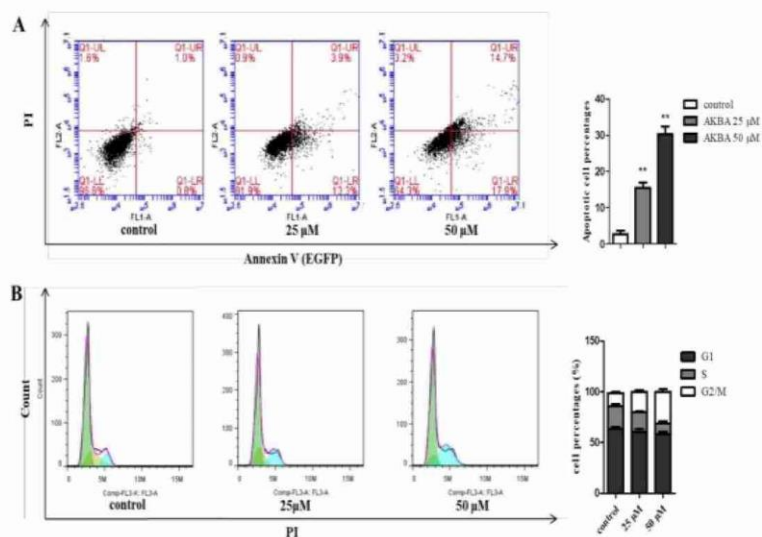
研究基础图



研究基础图

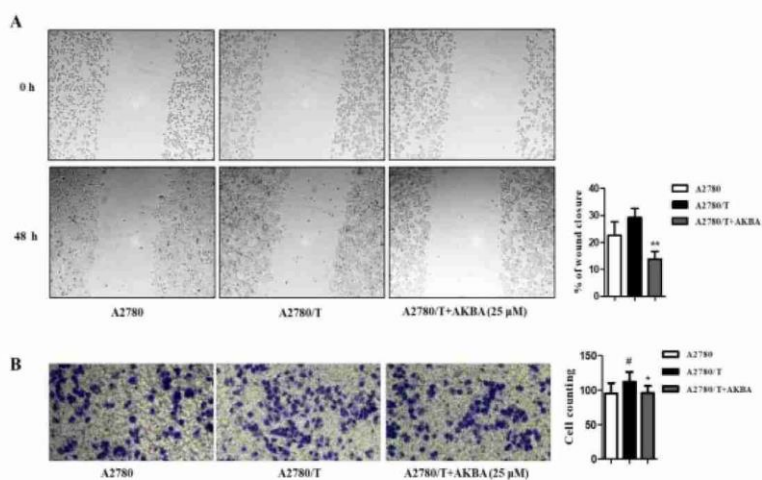
1. 乳香酸改变卵巢癌细胞周期分布，促进细胞株 A2780/T 凋亡

通过流式细胞仪检测发现乳香酸可将卵巢癌细胞阻滞于 G2 期，抑制细胞增殖，促进耐药细胞株 A2780/T 凋亡。



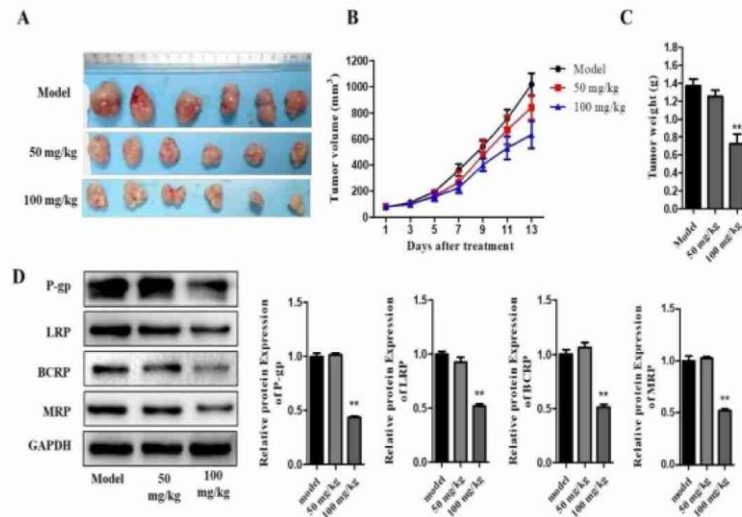
2. 乳香酸抑制卵巢癌 A2780/T 细胞的侵袭及转移能力

划痕实验及 Transwell 小室实验发现，乳香酸（25ug）可以明显抑制卵巢癌 A2780/T 细胞的侵袭及转移能力。

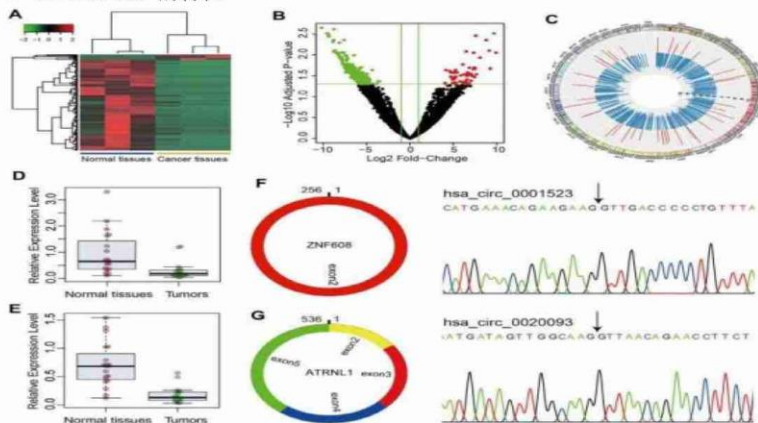


3. 乳香酸抑制卵巢细胞株 A2780/T 异种移植瘤生长

通过动物模型发现乳香酸可以抑制卵巢癌肿瘤生长, WB 及 PCR 发现乳香酸可下调肿瘤组织中 P-gp, LRP, BCRP 和 MRP 等耐药相关蛋白及基因的表达, 并且呈剂量依赖性。

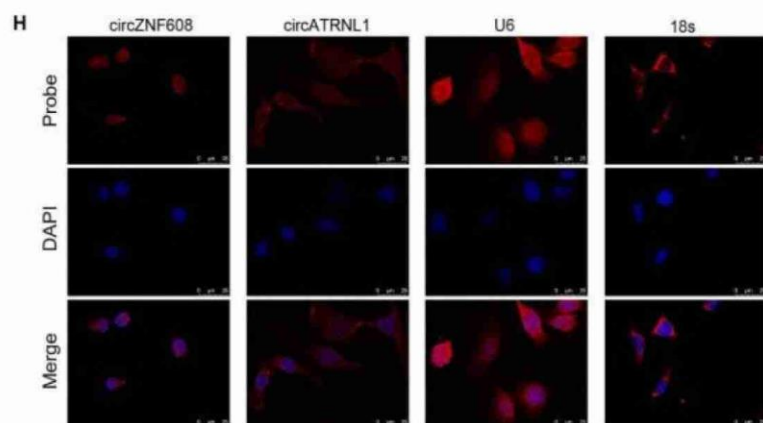


4. CircZNF608 的特征



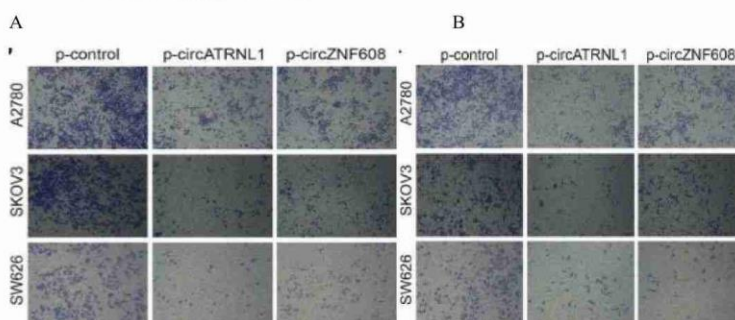
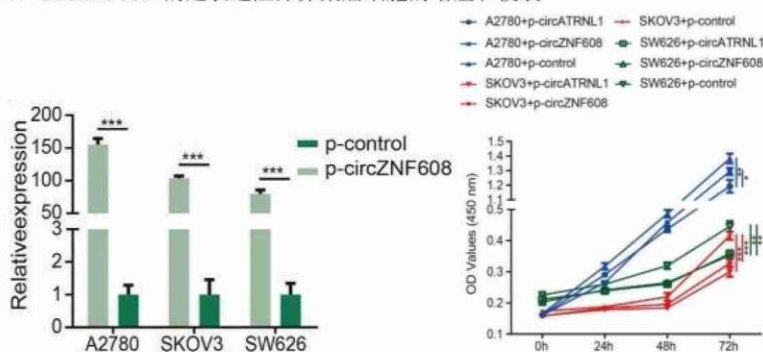
A 正常组织和卵巢癌组织循环 RNA 表达差异的热图 B RNA 测序的循环 RNA 差异的火山图 C RNA 测序的循环 RNA 差异的 Circos 图 E 和正常组织比, CircZNF608 表达下调 F 通过对来自 RNaseR 处理的 RNA 的 PCR 产物进行测序, 证实了 CircZNF608 的反向剪接连接。





HCircZNF608 的 RNA 荧光原位杂交

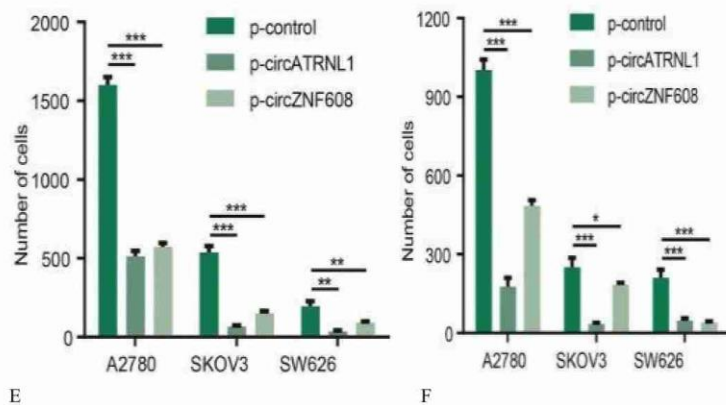
5. CircZNF608 的过表达阻滞卵巢癌细胞的增殖和侵袭



C

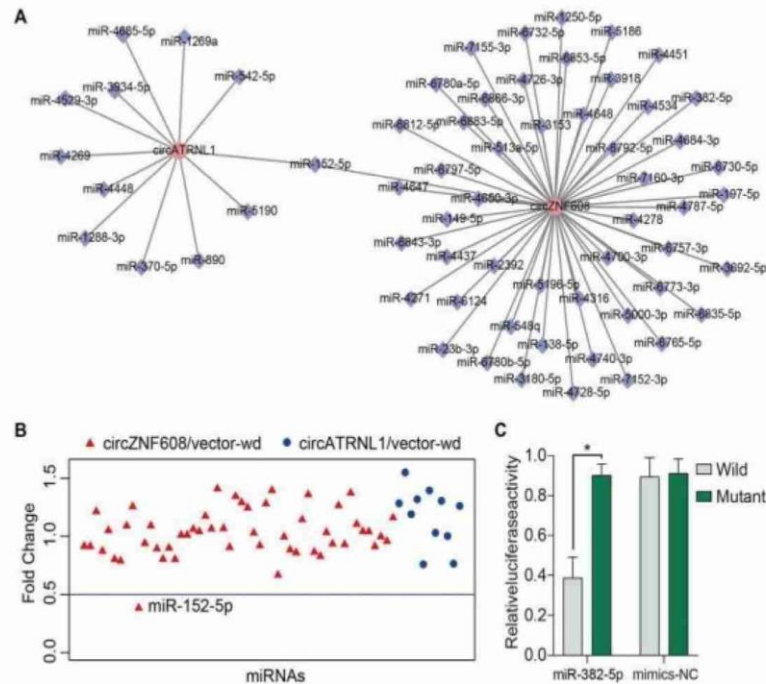
D





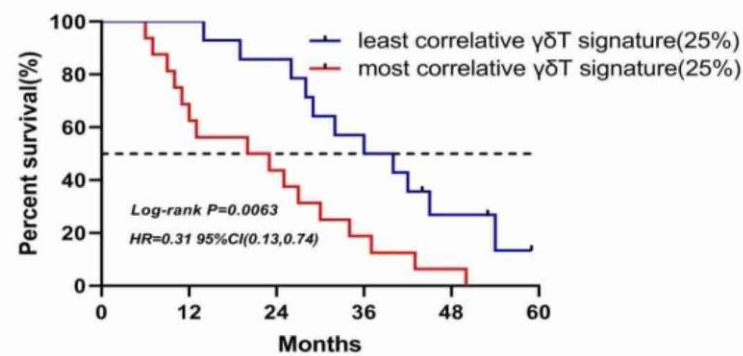
A 转染 p-CircZNF608 后 CircZNF608 过表达 B CircZNF608 抑制卵巢癌的增殖 C D: CircZNF608 抑制卵巢癌的迁移 E F circZNF608 抑制卵巢癌的侵袭

6. 卵巢癌细胞中 CircZNF608 可作为 miR-152-5p 的海绵

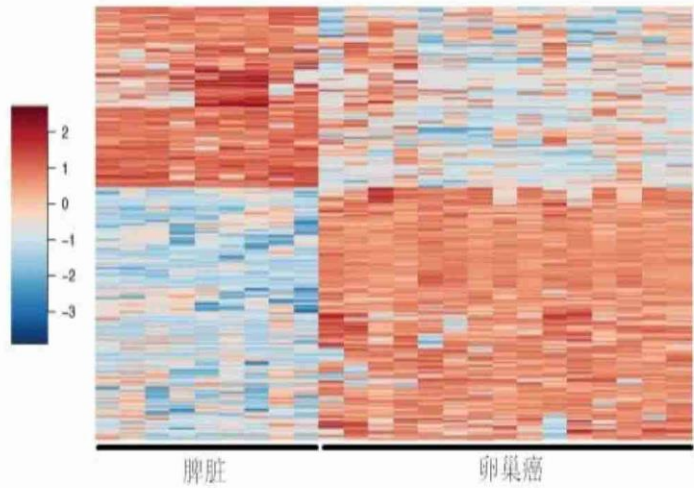


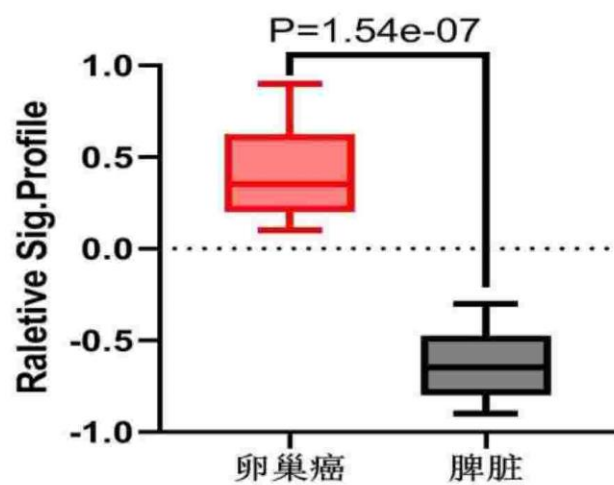
A 52 个预测的 CircZNF608 的 miRNA - circRNA 交互 B 对 52 种 miRNA-circRNA 相互作用进行荧光素酶报告基因分析, 以确定能够与 CircZNF608 序列结合的 miRNA, 只 miR-152-5p 抑制荧光素酶活性超过 50%。C 荧光素酶报告基因检测用 miR-152-5p 模拟物或模拟物-NC (模拟物的阴性对照) 共转染的野生型和突变型 CircZNF608 载体的荧光素酶活性。

7. 分析 TCGA 数据库发现, 卵巢癌 $\gamma\delta T$ 全蛋白表达谱与 5 年生存率显著相关

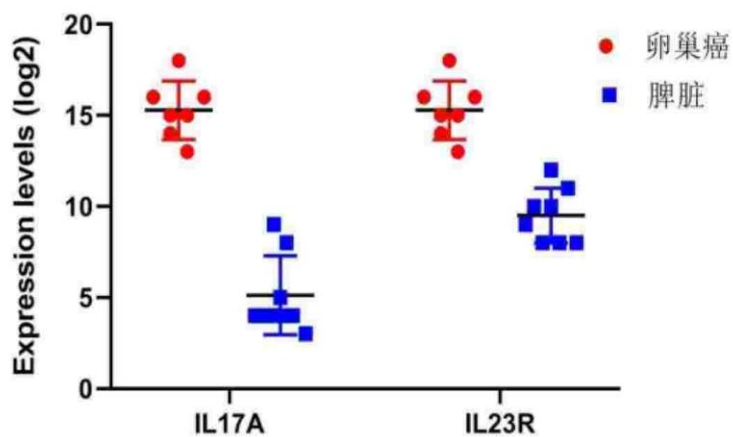


8. 分析 TCGA 数据库发现, 卵巢癌的 $\gamma\delta T$ 全蛋白表达谱和脾脏的 $\gamma\delta T$ 全蛋白表达谱显著不同



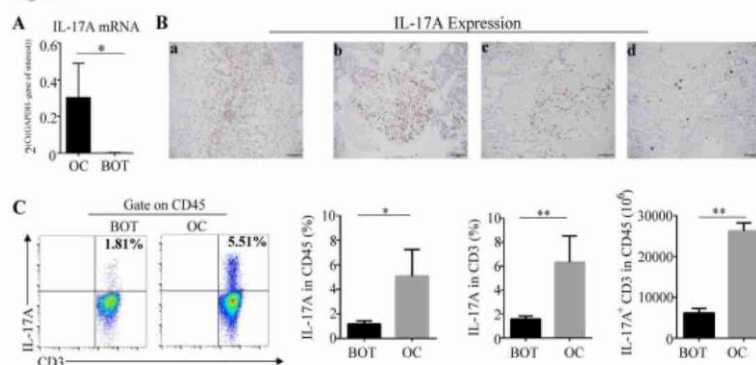


9. 分析 TCGA 数据库发现，表达 IL-17 水平在卵巢癌中和脾脏中显著不同。



10. IL-17 在卵巢癌、卵巢交界性肿瘤及卵巢良性肿瘤中的表达
免疫组化提示 相比卵巢交界性肿瘤组织和卵巢良性肿瘤组织，卵巢癌组织中显著高表达 IL-17，差异具有统计学意义 ($P=0.001$, $P<0.001$)。

Figure 1



分组	例数	IL-17				阳性预测值 (%)	P 值
		-	+	++	+++		
卵巢癌	34	8	4	17	5	64.7%	
卵巢交界性肿瘤	23	14	4	5	0	21.7%	0.001 ^Δ
卵巢良性肿瘤	24	21	1	0	2	8.3%	<0.001*

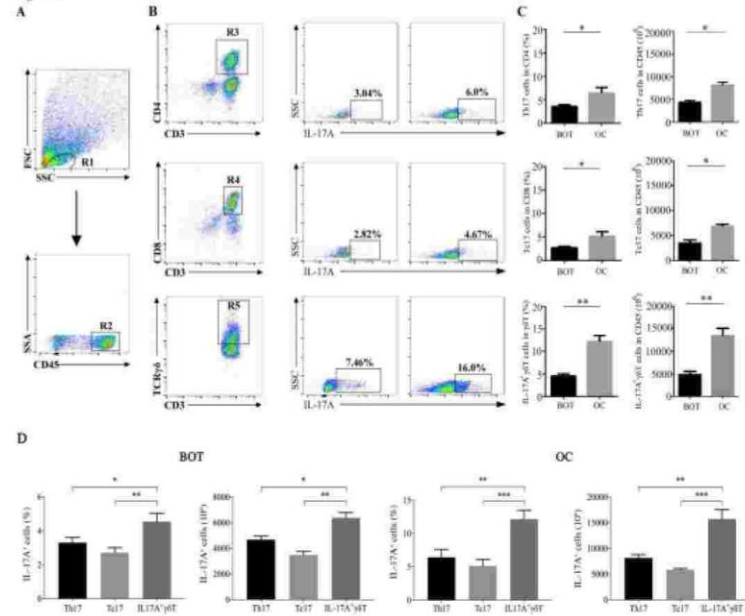
11. IL-17 与卵巢癌患者临床病理特征的关系。
IL-17 表达与卵巢癌患者病理分化水平、淋巴结转移相关 ($P<0.05$)，与年龄、肿瘤大小、病理类型、临床分期无关。

特征	例数	IL-17 (n=34)		P 值
		阳性例数	阳性预测值 (%)	
年龄 (岁)				
< 50	21	14	66.7%	0.87
≥50	13	9	69.2%	
肿瘤大小(cm)				
< 5	12	8	66.7%	0.86
≥5	22	14	63.6%	
病理类型				
粘液性	14	9	64.3%	0.96
浆液性	20	13	65.0%	
FIGO 分期				
I-II	16	10	62.5%	0.54
III-IV	18	13	72.2%	
肿瘤细胞分化				
高分化	8	5	62.5%	0.037*
中低分化	26	24	92.3%	
淋巴结转移				
有	15	13	86.7%	0.036*
无	19	9	47.4%	



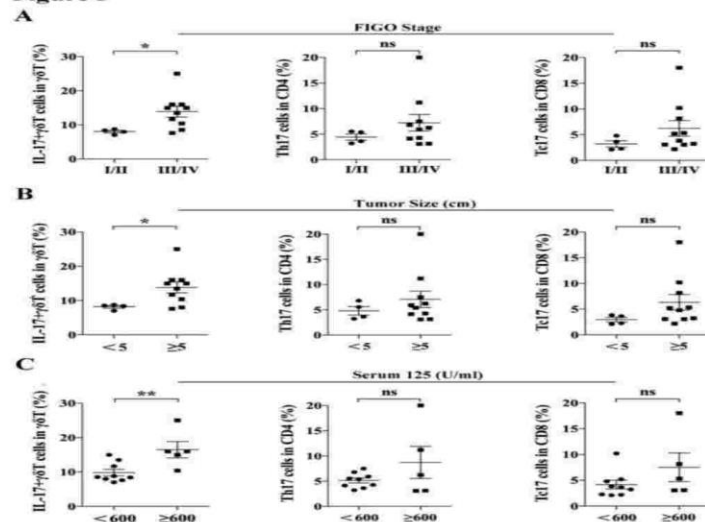
12、卵巢癌 IL-17 主要源于 $\gamma\delta$ T 细胞，而非 Th17 和 Tc17。

Figure 2



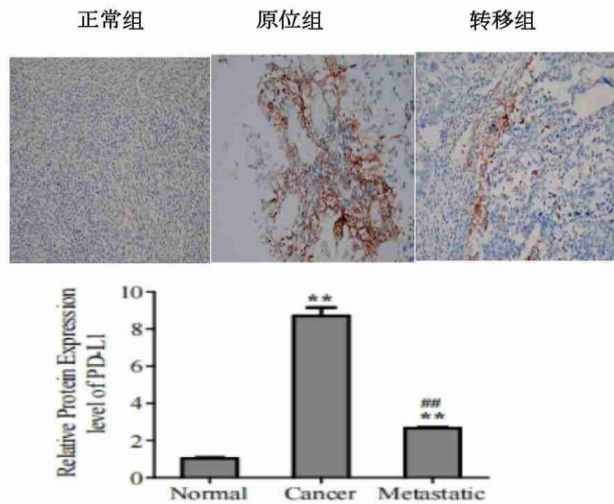
13. $\gamma\delta$ T17 与更高的 FIGO 分期，更大肿瘤体积和更高的 CA125 相关

Figure 3



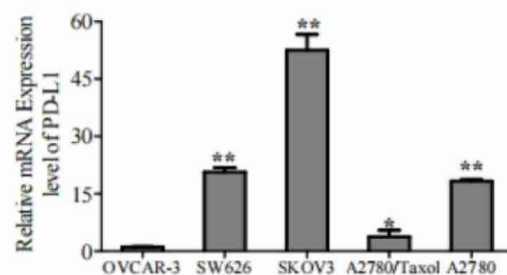
14. 原位卵巢癌组织中 PD-L1 蛋白表达水平显著增高

免疫组织化学（IHC）法检测人正常卵巢组织、原位卵巢癌组织、卵巢癌转移灶组织中 PD-L1 蛋白表达水平，结果显示在原位卵巢癌组织中 PD-L1 蛋白表达水平明显高于正常卵巢组织及卵巢癌转移灶组织。



15. 五种人卵巢癌细胞中 SKOV3 的 PD-L1 表达水平显著高于其他细胞

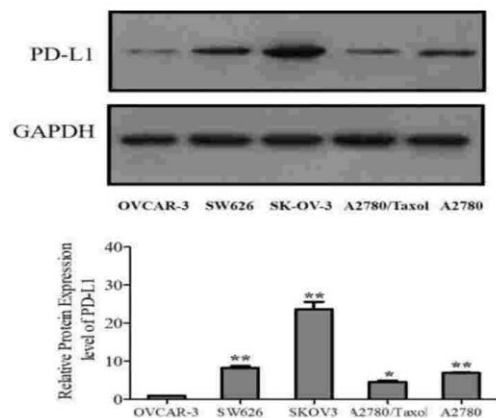
采用实时荧光定量 PCR（real time-PCR）法检测五种人卵巢癌细胞 OVCAR-3、SW626、SKOV3、A2780/Taxol、A2780 中 PD-L1 基因表达水平。结果显示 SKOV3 的 PD-L1 基因表达水平显著高于其他细胞。



16. 五种人卵巢癌细胞中 SKOV3 的 PD-L1 蛋白表达水平显著高于其他细胞

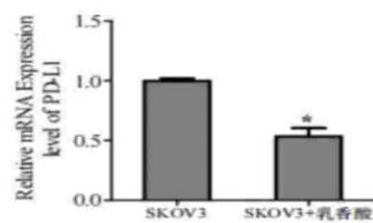
采用 Western blot 法检测五种人卵巢癌细胞 OVCAR-3、SW626、SKOV3、A2780/Taxol、A2780 中 PD-L1 蛋白表达水平。结果显示 SKOV3 的 PD-L1 蛋白表达水平显著高于其他细胞。





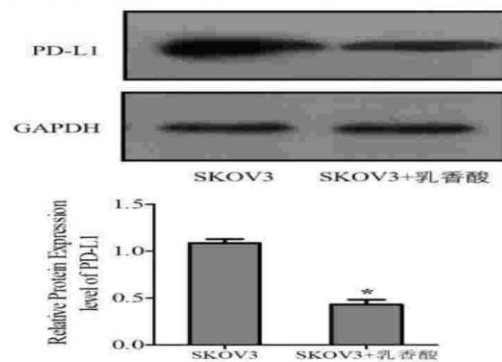
17. 乳香酸下调 SKOV3 的 PD-L1 mRNA 表达

通过 real time-PCR 法检测乳香酸对 SKOV3 细胞株 PD-L1 mRNA 表达的影响。结果显示是乳香酸能够下调 SKOV3 的 PD-L1 mRNA 表达。



18. 乳香酸下调 SKOV3 的 PD-L1 蛋白表达

通过 Western blot 法检测乳香酸对 SKOV3 细胞株 PD-L1 蛋白表达的影响。结果显示乳香酸能够下调 SKOV3 的 PD-L1 蛋白表达。



3、项目负责人简介及以往承担市级及以上等各类科技计划项目完成情况

<p>项目负责人刘晓健 副主任医师，硕士研究生，南京医科大学妇科肿瘤学博士研究生在读，中国人体健康促进会妇产科医疗专业委员会委员、中国妇幼保健协会妇科智能（AI）医学专业委员会青年委员、中华医学会江苏省分会妇科肿瘤学组委员、围产复苏和母胎学组委员，江苏大学临床医学院妇产科教研室副主任、讲师，意大利萨萨里大学附属医院妇产科进修、学习、交流，主持多项妇产科课题研究，撰写论文 10 余篇。</p> <p>已结题或验收的项目</p>						
序号	项目名称	起止时间	项目来源	项目级别	经费（万元）	排名
1	UU 感染性早产 hBD-2 基因表达、诱导及影响因素	2010-2012	镇江市科技局立项	市级	3	1
2	模糊数学与判别分析相结的分娩辅助诊断模型与计算机网络型决策系统的研究。	2011-2012	镇江市卫生局	市级	2	1
3	含促凋亡基因溶瘤腺病毒与致敏 CIK 细胞联合应用治疗卵巢癌研究	2014-2017	镇江市科技局立项	市级	5	1
4	基于临床电子病历的智能化的 PBL 教学系统	2019-2022	南京医科大学	市厅级	1	1
<p>目前承担的主要项目</p>						
序号	项目名称	来源	项目级别	时间	经费（万元）	排名
1	基于计算机神经网络型分娩专家决策系统的研究	江苏省妇幼健康科研项目	省部级一般	2022-2024	6	1

4、项目实施具备的人才队伍、经费配套投入能力及科技服务管理能力；

<p>项目第一申请人既往承担多项市级及校级课题研究，管理科研项目实施的经验丰富，具有扎实的肿瘤临床实践基础，现为南京医科大学妇科肿瘤学在读博士，指导教师为南京医科大学附属肿瘤医院王金华教授，其为项目第二申请人，负责项目全面指导工作，分别主持国家自然科学基金面上项目《基于 WAVE3 调控和代谢组学的黄芪-乳香配伍对卵巢癌耐药及侵袭能力作用的机制研究》（2015-2018）（已结题）（81473636）和青年项目基金《外泌体传递的 circ-CLASP2 调控乳腺癌侵袭转移的功能及机制研究》（2018-2020）（81702895）（已结题），并获得多项省级科研项目，不仅对卵巢癌的生物行为学和临床治疗有深入研究，而且对中医药临床运用和基础研究有较深入了解，为课题的实施奠定了良好的临床与科研基础。科研成果先后获得江苏省科学技术进步奖和中医药科技进步奖等奖项，发表各类相关研究论文 60 余篇。本课题组主要成员具有博士及硕士学位，长期从事妇科恶性肿瘤的临床与基础研究，具有丰富的临床和科研经验。课题组整合临床中医学、中药药理学、病理学、生物分子学、肿瘤学等多学科的优势。并具有丰富的妇科肿瘤临床及科研经验。人员结构合理，课题组前期已获得国家自然科学基金面上和青年项目资助，并顺利结题，多项成果获得省级以上科研奖励，具有较丰富的科研实践能力，项目研究组人员结构合理，科研实力强，实验室条件完备，计划所列项目的操作技术成熟，能保证课题的顺利开展和实施。</p> <p>本项目是本课题组研究方向之一，项目申请人所在单位将会陆续投入大量的人力物力，1:1 配额市拨经费额度，以确保本项目的顺利完成。</p>



5、本项目实施可能对环境的影响及预防治理方案。

本项目对环境无不良影响。



五、项目研究预期成果及效益

1、确定 CircZNF608- γ δ T17- α β T 机制通路;2、阐明黄芪-乳香配伍对 CircZNF608- γ δ T17- α β T 通路影响;3、发表 3 篇论文，国内核心期刊论文 1 篇；SCI 论文 2 篇；在学术会议进行报告交流。



六、计划进度安排与考核指标

工作进度	主要工作内容
2023 年 6 月至 2023 年 11 月	研究黄芪-乳香对卵巢癌侵袭转移和肿瘤免疫抑制微环境的作用收集数据。
2023 年 12 月至 2024 年 5 月	黄芪-乳香对 CircZNF608-miR-152-5p-IL1 β 通路的相关 CircRNA, miRNA,细胞因子的影响及 作用机制研究 , 收集数据, 统计数据, 如数据充分则撰写论文。
2024 年 6 月至 2024 年 11 月	幼稚 $\gamma \delta$ T 极化为 $\gamma \delta$ T17 后对 $\alpha \beta$ T 免疫功能的影响, 收集数据, 统计数据, 如数据充分则撰写论文。
2024 年 12 月至 2025 年 5 月	黄芪-乳香通过 CircZNF608-miR-152-5p-IL1 β 通路对 $\gamma \delta$ T17 极化和 $\alpha \beta$ T 功能状态的影响总结资 料, 撰写论文, 申请结题、鉴定。
年 月至 年 月	
年 月至 年 月	
年 月至 年 月	
年 月至 年 月	
项目完成后主要考核指标: (除医疗卫生类项目外, 不将论文作为主要评价依据和考核指标) (包括: (1)主要技术指标: 如形成的专利、新技术、新产品、新装置、论文专著等数量、指标及其水平等; (2)主要经济指标: 技术及产品应用所形成的市场规模、效益等; (3)项目实施中形成的示范基地、中试线、生产线及其规模等; (4)其他应考核的指标)	
1、确定 CircZNF608- $\gamma \delta$ T17- $\alpha \beta$ T 机制通路;2、阐明黄芪-乳香配伍对 CircZNF608- $\gamma \delta$ T17- $\alpha \beta$ T 通路影响 ;3、发表 3 篇论文, 国内核心期刊论文 1 篇; SCI 论文 2 篇; 在学术会议进行报告交流。	



七、审查推荐

承担单位	<div>法人代表（签章）</div> <div></div> <div>（公章）</div> <div>年 月 日</div>
合作单位	<div>法人代表（签章）：</div> <div></div> <div>（公章）</div> <div>年 月 日</div>
主管部门	<div>负责人（签字）：</div> <div></div> <div>（公章）</div> <div>年 月 日</div>



八、项目附件清单

- 1、实验动物使用许可或委托书复印件
- 2、产学研合作项目合作协议
- 3、相关知识产权证明材料（需逐项列明，其中知识产权类型填写发明、实用新型、外观设计、软件著作权等）
- 4、技术权益证明、特殊产品生产许可证、科技获奖证书等
- 5、近三年获得与本项目相关的国家或地方科技计划支持情况证明材料（逐项列明）
- 6、法人营业执照复印件
- 7、高新技术企业证书
- 8、企业上年度财务报表
- 9、项目负责人身份证明、学历（学位）证书及现任职务（职称）证明
- 10、项目负责人参加抗击新冠肺炎疫情一线工作突出而获得本单位及以上相关表彰的证明材料
- 11、有关产品检测检验报告等
- 12、其它相关材料

说明：

1、各申报单位根据实际情况提供以上附件材料，填写《项目附件审查表》，并报主管部门审查；

2、近三年获得与本项目技术相关的国家或地方科技计划支持情况以及知识产权证明材料须在附表对应栏目中逐项列明；

3、反映项目主要创新内容及水平的检测检验报告、知识产权证明等材料，以及产学研项目合作协议须在网作为附件上传。如页数较多，可只上传封面、测试结论和盖章审核页即可。



附表：

近三年科技计划支持情况证明材料						
序号	与本项目相关的省级及以上科技计划项目名称	计划名称	项目编号	实施期限	项目负责人	资助经费（万元）
1	国家自然科学基金面上项目	基于 WAVE3 调控和代谢组学的黄芪-乳香配伍对卵巢癌耐药及侵袭能力作用的机制研究	81473636	2015.01-2018.12, 2018 年 12 月 31 日	王金华	72
2	江苏省中医药管理局, 江苏省中医药科技发展专项,	芪术抗癌方联合化疗抗大肠癌转移疗效评价及补气活血法抗黏附作用机制研究	ZX2020C1	2020-01 至 2022-12,	王金华	43
3	江苏省卫健委, 江苏省医学重点人才	卵巢临床获得性耐药分子的发现与应用研究	RC2011091	2016-03 至 2020-03	王金华	100

相关知识产权证明材料							
序号	知识产权名称	知识产权类型	发明人/设计人	专利号（登记号）	专利权人（著作权人）	专利申请日（首次发表日期）	授权公告日（登记日期）



说明：如行数不够可自行插入



202300171-SSH20230140026