

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.21.001

## • 基础研究 •

利用 CRISPR/Cas9 技术靶向 KRAS 或 TP53 突变  
抑制 SW620 细胞的增殖 \*刘瑞琦 王 洁 雷 超 刘一睿 王雅婷 张竞方<sup>△</sup>

(北京中医药大学生命科学学院 北京 100029)

**摘要 目的:**运用 CRISPR/Cas9 基因编辑工具研究靶向 SW620 细胞系中 KRAS 或 TP53 突变对细胞增殖活性的影响。**方法:**针对 SW620 细胞中 KRAS 和 TP53 的突变位点设计 sgRNA, 并利用 TIDE 法检测 sgRNA 的切割效率。通过细胞增殖实验检测靶向 KRAS 或 TP53 突变后 SW620 细胞增殖活性的改变, 并应用 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡水平的变化。**结果:**分别构建了靶向 SW620 细胞系中 KRAS 和 TP53 突变的 sgRNA 质粒, 并通过 TIDE 分析验证了 sgRNA 的内源切割效率; 细胞增殖实验及细胞凋亡检测显示, 靶向突变的 KRAS 或 TP53 基因后, SW620 细胞增殖活性明显减弱, 凋亡水平明显升高 ( $P < 0.05$ )。**结论:**本研究基于 CRISPR/Cas9 技术实现了对 SW620 细胞系中突变的 KRAS 和 TP53 的基因编辑, 发现靶向 KRAS 或 TP53 突变能够明显抑制 SW620 细胞的增殖活性并促进细胞凋亡, 为结直肠癌相关靶点治疗提供了体外实验依据。

**关键词:** CRISPR/Cas9; 结直肠癌; KRAS; TP53

**中图分类号:** R-33; R735.3; Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2023)21-4001-06

Targeting KRAS or TP53 Mutation by CRISPR/Cas9 Inhibited  
the Proliferation of SW620 Cells\*LIU Rui-qi, WANG Jie, LEI Chao, LIU Yi-rui, WANG Ya-ting, ZHANG Jing-fang<sup>△</sup>

(College of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100029, China)

**ABSTRACT Objective:** To study the effect of targeting KRAS or TP53 mutation in SW620 cell line on cell proliferation activity by CRISPR/Cas9. **Methods:** First, we designed sgRNAs for mutated KRAS and TP53 in SW620 cells, and applied TIDE assay to detect their cleavage efficiency. Then, we performed cell proliferation assay to examine the change of proliferative activity after targeting KRAS or TP53 mutation in SW620 cells. Also, Annexin V-FITC/PI double staining was performed to detect apoptosis. **Results:** We constructed sgRNA plasmids targeting mutated KRAS and TP53 in SW620 cell line, respectively, and verified the endogenous cleavage efficiency of sgRNAs by TIDE assay. The proliferative capacity of SW620 cells was significantly diminished and the level of apoptosis was increased after targeting the mutated KRAS or TP53. **Conclusions:** In this study, mutated KRAS or TP53 gene in SW620 cells were edited by CRISPR/Cas9 technique. And we found that targeting either of these two mutations significantly inhibits the proliferative activity and promotes apoptosis in SW620 cells. This study provides further experimental evidence for targeted therapy of colorectal cancer.

**Key words:** CRISPR/Cas9; Colorectal cancer; KRAS; TP53

**Chinese Library Classification (CLC):** R-33; R735.3; Q78 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2023)21-4001-06

## 前言

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是世界上第三大常见的癌症。根据世界卫生组织全球癌症观察机构的报告, 2020 年全球有超过 190 万名患者被诊断为 CRC<sup>[1]</sup>。CRC 的发生常从良性腺瘤性息肉开始, 逐步进展为高度不典型增生, 最终发展为具有浸润性和转移性的恶性肿瘤, 其整个过程伴随着多个原癌基因的异常激活突变和抑癌基因的功能缺失突变<sup>[2,3]</sup>。全基因组

测序确定了 KRAS、TP53、APC 和 BRAF 等关键驱动基因的突变与疾病的恶性发展和晚期转移密切相关<sup>[4-6]</sup>。其中, 有约 45% 的 CRC 患者发生 KRAS 突变, 约 60% 的患者发生 TP53 突变<sup>[7,8]</sup>。

KRAS 是癌症中最常见的突变基因之一<sup>[9]</sup>, 它编码的三磷酸鸟苷 (guanosine triphosphate, GTP)/二磷酸鸟苷 (guanosine diphosphate, GDP) 结合蛋白属于小 GTP 酶超家族, 在活性 GTP 结合形式和非活性 GDP 结合形式之间循环, 参与调节细胞增殖、分化和凋亡的 RAS-Raf-MAPK 和 PI3K-AKT-mTOR

\* 基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(31701280)

作者简介: 刘瑞琦(1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: CRISPR/Cas9 技术在恶性肿瘤中的应用, E-mail: lanfeixi1029@163.com

<sup>△</sup> 通讯作者: 张竞方, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 利用 CRISPR/Cas9 技术研究癌症致病机制和药物靶点发现,

E-mail: zhangjingfang@bucm.edu.cn

(收稿日期: 2023-04-06 接受日期: 2023-04-28)

等信号转导通路<sup>[10]</sup>。KRAS 突变会影响 GTP 酶的活性,使 GTP 无法向 GDP 转化,导致 KRAS 持续锁定在活性构象,进而导致下游通路的异常持续激活,从而引起肿瘤细胞恶性增殖及转移<sup>[11]</sup>。KRAS 突变是形成 CRC 的关键驱动因素,与其不良预后密切相关<sup>[12,13]</sup>。

TP53 位于染色体 17p13.1,其编码的 TP53 蛋白是一个关键的转录因子。TP53 蛋白的中心区域含有序列特异性 DNA 结合域,通过与靶基因相结合调控其表达<sup>[14]</sup>。近年来,TP53 已被证明能够促进 DNA 损伤修复、反式激活 BAX、PUMA 和 Noxa 等凋亡相关基因以及抑制 PDK2 等抗凋亡基因<sup>[15,16]</sup>。对携带 TP53 突变的 CRC 患者样本测序分析发现,大部分 TP53 突变是错义突变<sup>[17]</sup>。TP53 突变多数发生在结肠性腺瘤向 CRC 进展的后期阶段,进行 TP53 基因检测有助于明确疾病发展进程和恶性程度<sup>[18]</sup>。

基因编辑技术是研究基因功能的重要工具。与其他基因编辑方法相比,规律间隔成簇短回文重复序列及其相关蛋白 9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats and associated protein 9, CRISPR/Cas9) 系统更为高效和精准,因此目前被广泛应用。CRISPR/Cas9 系统组成简单,通过 gRNA 与目的 DNA 之间的碱基互补配对实现对靶位点的定向识别并进行切割,断裂的 DNA 通过非同源末端连接(non-homologous end-joining, NHEJ)和同源重组(homology directed repair, HDR)修复机制实现基因编辑<sup>[19,20]</sup>。2015 年,科学家们首次将 CRISPR/Cas9 基因编辑系统引入人类肠道类器官,通过敲除抑癌基因 APC、TP53、SMAD4 以及敲入原癌基因 KRAS 和 PIC3CA 突变所构建的 AKSTP 类器官,是研究肠道恶性肿瘤的有力模型<sup>[21]</sup>。此外,利用 CRISPR/Cas9 技术还可在体内诱导肠上皮细胞或类器官产生突变,以研究多种突变的累积对肿瘤生长的影响<sup>[22]</sup>。随着对 CRISPR/Cas9 基因编辑系统的应用发展,已有多项研究证明该技术是实现基因治疗的潜力工具。2020 年,我国科学家利用 CRISPR/Cas9 技术修正人结直肠癌细胞系 HCT116 中 WNT 通路基因  $\beta$ -catenin 的突变后, HCT116 细胞的体外生长及异种移植小鼠模型中均出现  $\beta$ -catenin 蛋白 Ser45 磷酸化水平升高和 CRC 细胞的增殖减少<sup>[23]</sup>,有力展现了 CRISPR/Cas9 基因编辑系统在 CRC 治疗中的作用。

SW620 细胞系携带 APC、KRAS 及 TP53 基因突变,是体外研究 CRC 的适宜工具细胞。本研究以 SW620 细胞系为研究对象,利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术靶向 CRC 患者中高频突变的 KRAS 和 TP53 基因,并观察其对 SW620 细胞增殖及凋亡等生物学功能的影响。我们的研究在精准医疗蓬勃发展的时代背景下,为 CRC 的靶向治疗提供理论支持和策略。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞系和质粒 人结肠癌细胞系 SW620、人胚胎肾细胞系 HEK 293T 由本实验室保存;sg-KRAS、sg-TP53 由本实验室设计构建;PGK-Cas9-P2A-puroR 由本实验室保存;pMD2.G (Addgene, plasmid ID 12259);psPAX2 (Addgene, plasmid ID 12260)。

1.1.2 实验试剂 PEI (proteintech, B600070);Puromycin (In-

vivoGen, ant-pr-1);Polybrene (Sigma, H9268);BsmBI (NEB, R0739);rSAP (NEB, M0371S);BM2000+ Marker (BioMed, MD102-01);KOD-Plus-Neo (TOYOBO, KOD-401);cell lysis buffer (10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 2.5 % Tween-20, 2.5 % Triton-X 100, 100  $\mu$ g/mL Proteinase K, pH=8);Tris (amresco, 77-86-1);EDTA (Macklin, E809068);Tween-20 (Sigma, P1379);Triton-X 100 (Solarbio, T8200);Proteinase K (Sigma, V900887);PBS (Solarbio, P1010);2 $\times$  Accurate Taq 预混液(湖南艾科瑞生物工程有限公司, AG11010);琼脂糖(Agarose, AG-111860);快速质粒小提试剂盒(离心柱型)(TIANGEN, DP105-03);DMEM 高糖培养基 (Gibco, C11995500BT);胎牛血清 (ExCell Bio, FSS500);青链霉素 (Solarbio, P1400);cck8 试剂 (bimake, B34304);Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(北京兰博利德商贸有限公司, AF2020-50T);引物合成及一代测序由北京六合华大基因科技有限公司完成

1.1.3 实验仪器 正倒置一体荧光显微镜(Echo, Revolve);凝胶电泳仪(北京六一生物有限公司, DYCP-31F);xMark™ 微孔板吸光度分光光度计 (BIO-RAD, 1681150);ChemiDoc MP 凝胶成像仪及图像分析系统 (BIO-RAD, 17001402);ProFlex™ 3 $\times$  32 孔 PCR 系统 (ThermoFisher, 4484073);流式细胞仪 (Beckman Coulter, CytoFLEX)。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HEK 293T 和 SW620 细胞使用含 10 %胎牛血清和 1 %青链霉素的 DMEM 培养基培养。培养条件 37  $^{\circ}$ C, 5 % CO<sub>2</sub>。取状态良好、对数生长期的细胞进行实验。

1.2.2 sgRNA 的设计 针对 SW620 细胞系中突变的 KRAS 和 TP53 基因,使用 Broad Institute 和张锋实验室发布的在线设计工具 (<https://portals.broadinstitute.org/gppx/crispick/public>)设计包含突变位点的 sgRNA 序列。构建 sgRNA 的寡核苷酸序列如下表所示:

表 1 构建 sgRNA 的寡核苷酸序列  
Table 1 Oligonucleotide sequences of sgRNA

| Name    | Sequence                  |
|---------|---------------------------|
| sg-KRAS | 5'-TAGTTGGAGCTGTTGGCGT-3' |
| sg-TP53 | 5'-TGGTGTGTTGGACAGTGCT-3' |

1.2.3 Cas9 质粒及 sgRNA 质粒的慢病毒包装 采用 PEI 转染试剂进行细胞转染,需转染的质粒和 PEI 转染试剂的体积比为 1:3,目的质粒 (PGK-Cas9-P2A-puroR、sg-KRAS、sg-TP53) 和包装质粒 psPAX2、pMD2.G 的摩尔比为 8:6:3,将目的质粒、包装质粒和 PEI 转染试剂共同转染至对数生长期的、状态良好的 HEK 293T 细胞中,包装成慢病毒。转染 4-6 h 后更换为新鲜完全培养基,换液 48 h 后收集培养皿中的病毒上清,在 4  $^{\circ}$ C, 1000 $\times$  g 条件下离心 5 min 去除细胞碎片,随后用 0.45  $\mu$ M 的滤器过滤并分装至 1.5 mL 离心管中,存放于 -80  $^{\circ}$ C 冰箱备用。

1.2.4 细胞的慢病毒感染 将生长状态良好的 SW620 细胞按照 1 $\times$  10<sup>6</sup> 个细胞 / 孔接种到 6 孔板中,每孔加入 1 mL 慢病毒 (Cas9:sgRNA=1:1) 和 8  $\mu$ g/mL 的 Polybrene, 37  $^{\circ}$ C, 5 % CO<sub>2</sub> 条件下培养 24 h 后更换新鲜完全培养基。

1.2.5 sgRNA 切割效率检测 慢病毒感染 72 h 后裂解细胞并

获取细胞基因组进行后续实验。裂解条件:每 100  $\mu\text{L}$  细胞裂解液能充分裂解  $1 \times 10^5$  个细胞,反复吹打后 37  $^{\circ}\text{C}$  静置 20 min,随后 50  $^{\circ}\text{C}$  水浴 60 min,95  $^{\circ}\text{C}$  水浴 15 min。使用 NCBI 在线工具 Primer-BLAST 在 KRAS 和 TP53 基因突变位点的上下游各 250-350 bp 处设计引物,引物序列如表 2 所示。使用 KOD-Plus-Neo 对目的片段进行扩增,扩增体系如表 3 所示,扩增程序如表 4 所示。取 3-5  $\mu\text{L}$  的 PCR 扩增产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳实验,检测是否存在目的片段。选取条带位置正确

表 2 扩增 KRAS、TP53 基因片段的引物

Table 2 Primers for amplification of KRAS and TP53 fragment

| Name   | Sequence                     |
|--------|------------------------------|
| KRAS-F | 5'-GGTGTAGAGCACTGTGAAGTC-3'  |
| KRAS-R | 5'-GCACAGAGAGTGAACATCATGG-3' |
| TP53-F | 5'-GGCCCACCTCTTACCGATTTC-3'  |
| TP53-R | 5'-CAGGAGCCATTGTCTTTGAGGC-3' |

表 4 KRAS、TP53 基因片段 PCR 扩增程序

Table 4 PCR amplification program of KRAS and TP53 fragment

| Denaturation                  | Melting                      | Renaturation                 | Extension                      | Circle number |
|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------------|---------------|
| 95 $^{\circ}\text{C}$ , 5 min |                              |                              |                                | 1             |
|                               | 95 $^{\circ}\text{C}$ , 30 s | 58 $^{\circ}\text{C}$ , 30 s | 72 $^{\circ}\text{C}$ , 9 s    | 35            |
|                               |                              |                              | 72 $^{\circ}\text{C}$ , 10 min | 1             |

**1.2.6 细胞增殖活性检测** 将慢病毒感染 72 h 后的待测细胞充分消化,并进行细胞计数。将细胞  $2.5 \times 10^4$  个细胞/孔的密度,分别接种到两块 48 孔板中,每组设置 4 个复孔,分别培养 24、48 h 后,更换含 10% cck8 试剂的培养基,250  $\mu\text{L}$ /孔,37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱孵育 2-3 h 后测定 OD450 nm 值。

**1.2.7 细胞凋亡检测** 慢病毒感染 72 h 后消化、收集各组待测细胞并进行计数,使用结合缓冲液重悬并调整细胞悬液浓度为  $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。取 100  $\mu\text{L}$  的细胞悬液于 5 mL 流式管中,加入 5  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC 染液,轻柔混匀后室温避光孵育 10 min,随后加入 10  $\mu\text{L}$  碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)染液,轻柔混匀,室温避光孵育 5 min。在流式管中补加 400  $\mu\text{L}$  PBS 重悬细胞,随即使用流式仪进行细胞凋亡检测,Annexin V-FITC 为绿色荧光,PI 为红色荧光。

### 1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0 对所获得的实验数据进行统计学分析,统计结果均采用平均值 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)的方式表示。采用独立样本 t 检验进行不同组间的差异性分析,当  $P < 0.05$  时表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 sgRNA 的设计及切割效率检测

根据已有文献报道<sup>[24]</sup>,SW620 细胞系中 KRAS 的突变位点为 35G>T,TP53 的突变位点为 925C>T,均为错义突变。我们首先提取了 SW620 细胞的基因组 DNA,在突变位点上下游设计引物,对突变位点进行了测序验证。接着,我们针对突变位点设计了合适的 sgRNA。为了确保 sgRNA 的特异性及切割活性,

且明亮的 PCR 产物送公司进行 Sanger 测序,使用在线工具 TIDE(<https://tide.nki.nl/>)对测序结果进一步分析,检测 sgRNA 切割效率。

表 3 KRAS、TP53 基因片段 PCR 扩增体系

Table 3 PCR amplification system of KRAS and TP53 fragment

| Component                                         | Quantity( $\mu\text{L}$ ) |
|---------------------------------------------------|---------------------------|
| Template                                          | 2.0                       |
| Primer F(10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) | 1.5                       |
| Primer R(10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) | 1.5                       |
| dNTP                                              | 5.0                       |
| MgSO <sub>4</sub>                                 | 3.0                       |
| KOD Buffer(10 $\times$ )                          | 5                         |
| High-fidelity KOD enzyme                          | 1.0                       |
| ddH <sub>2</sub> O                                | 31                        |
| Total                                             | 50                        |

使突变位点位于 PAM 区或种子区(seed region)内,如图 1a 所示。随后,我们将 sgRNA 构建进 hU6-gRNA-EF1a-puroR-eGFP 的骨架载体中,并进行慢病毒包装。

接下来,我们利用 TIDE 实验检测 sg-KRAS 和 sg-TP53 的内源切割效率。将 Cas9 慢病毒分别与 sg-KRAS、sg-TP53 及无关 sgRNA 慢病毒 1:1 混匀感染 SW620 细胞系,感染 72 h 后裂解细胞并提取基因组 DNA 进行相关片段测序,结果如图 1b 所示。使用在线工具 TIDE(<https://tide.nki.nl/>)对测序结果进行分析,如图 1c 所示 sg-KRAS 和 sg-TP53 的内源切割效率分别为 13.5%和 9%,具有切割活性,满足后续实验要求。

### 2.2 靶向突变的 KRAS 基因或 TP53 基因抑制 SW620 细胞增殖

为了检测敲除 KRAS 突变或 TP53 突变是否影响 SW620 细胞的增殖活性,我们将 Cas9 慢病毒分别与相关 sgRNA 慢病毒 1:1 混匀感染 SW620 细胞,以无关 sgRNA 作为阴性对照,并设置空白对照组。慢病毒感染 72 h 后,取相同数量的各组待测细胞分别培养 24、48 h,采用 cck8 实验检测细胞增殖活性。结果如图 2a 所示,sg-KRAS 组和 sg-TP53 组的细胞数量明显低于阴性对照组和空白对照组,说明靶向突变的 KRAS 或 TP53 基因能够抑制 SW620 细胞的增殖活性。为进一步研究同时打靶 KRAS 和 TP53 突变是否存在协同作用,我们进行了双打靶实验。将 Cas9 慢病毒与 sg-KRAS、sg-TP53 慢病毒按 2:1:1 混匀后感染 SW620 细胞,并检测细胞增殖活性。其结果如图 2b 所示,双打靶组明显低于阴性对照组和空白对照组,但与单打靶组相比未发现存在明显的协同效应,本实验未做进一步探究。

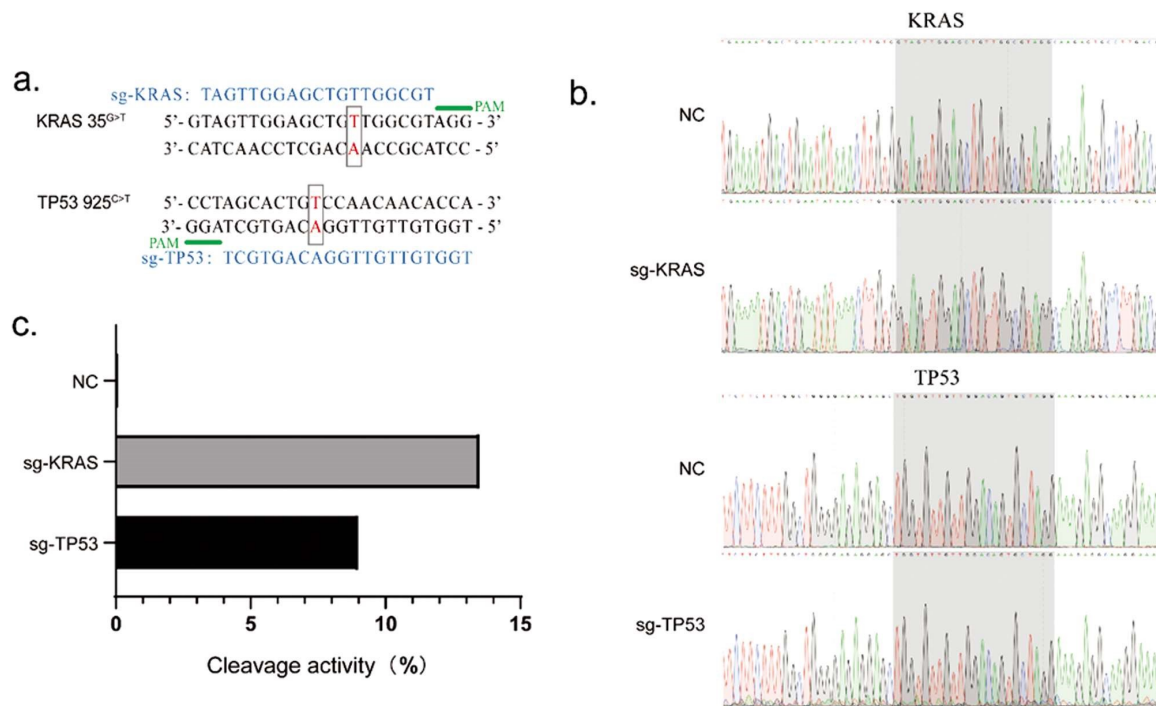


图1 sgRNA 的设计及切割效率检测

Fig.1 Design and cleavage activity assay of sgRNA

a. 针对突变位点设计 sgRNA b. KRAS、TP53 突变相关片段测序结果 c. sgRNA 切割效率检测

a. Designing sgRNAs for mutation sites b. Sequencing results of KRAS or TP53 mutation-associated fragments c. the cleavage activity of sgRNA

Note: NC: Negative control( Unrelated sgRNA ).

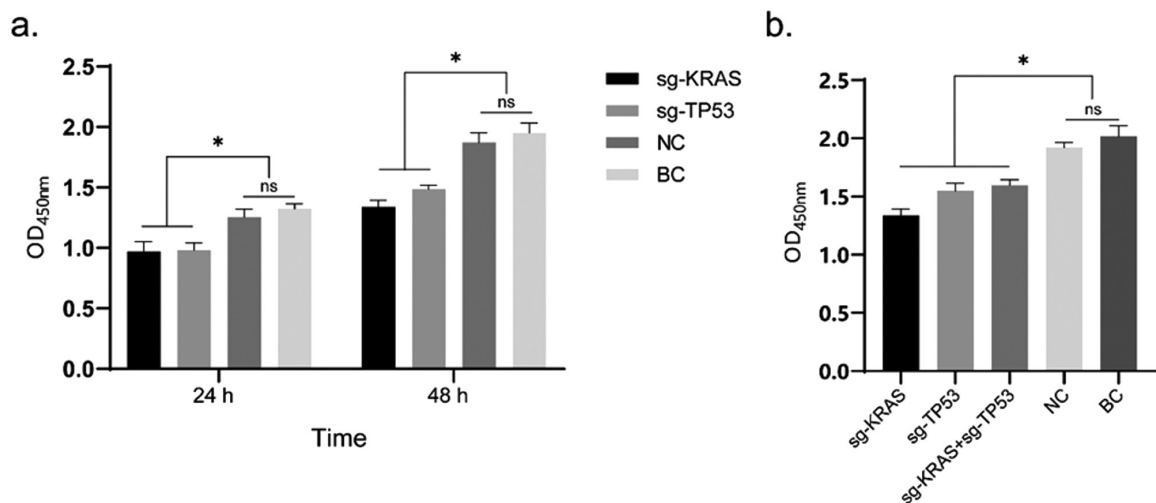


图2 靶向突变的 KRAS 基因或 TP53 基因抑制 SW620 细胞增殖

Fig.2 Targeting mutated KRAS gene or TP53 gene inhibits proliferation of SW620 cells

Note: NC: Negative control BC: Blank control, n=4.

### 2.3 靶向突变的 KRAS 基因或 TP53 基因促进 SW620 细胞凋亡

为了探究靶向突变的 KRAS 基因或 TP53 基因抑制 SW620 细胞增殖是否是由于细胞凋亡引起的, 我们对各组待测细胞进行 Annexin V/PI 双染色并通过流式细胞仪检测细胞凋亡水平。具有代表性的流式结果如图 3 所示, 与阴性对照组和空白对照组相比, sg-KRAS 组整体凋亡率增加约 3 倍, sg-TP53 组整体凋亡率增加约 2 倍。这表明, 敲除突变的 KRAS 基因或 TP53 基因能够明显促进 SW620 细胞凋亡, 从而抑制 SW620 细胞的增殖。

### 3 讨论

随着现代社会发展, 受生活环境、工作压力和饮食习惯等因素影响, CRC 已成为发病率和死亡率最高的消化道恶性肿瘤, 严重威胁人类健康。根据肿瘤位置等因素的不同, 针对结直肠癌患者的治疗手段主要有手术、放/化疗<sup>[25]</sup>。随着生物医学技术的不断革新, 科学家们对人类 CRC 的恶性进展和转移有了进一步的认识。有数据表明, 在过去十几年来中, 针对 RAS、BRAF 等基因突变进行靶向治疗后, 转移性 CRC 患者生存率有所增加<sup>[26]</sup>。

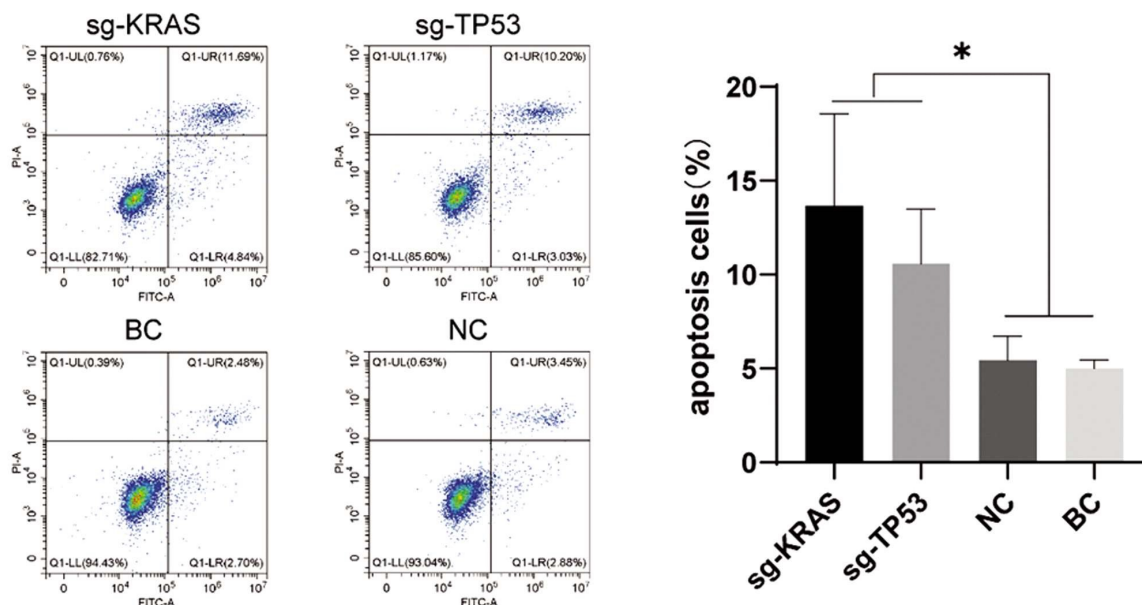


图3 靶向突变的 KRAS 基因或 TP53 基因促进 SW620 细胞凋亡

Fig.3 Targeting mutated KRAS gene or TP53 gene promotes apoptosis of SW620 cells

Note: NC: Negative control BC: Blank control, n=3.

2011 年首次提出的 "精准医学" 概念,是以个体化医疗为基础、随着生物蛋白质和基因组学等现代技术快速进步以及生物信息与大数据科学而交叉应用而发展起来的新型医学概念与医疗模式,从而明确病因和寻求治疗靶点,实现精准化治疗的主要目的<sup>[27]</sup>。作为重要的技术工具,基因编辑技术目前已广泛应用于恶性肿瘤的发病、耐药性等精准化治疗研究<sup>[28]</sup>。基因校正、免疫基因治疗和前药活化等治疗方案,近年来已成为治疗 CRC 以及克服其化疗耐药性的新策略<sup>[29,30]</sup>。

KRAS 和 TP53 分别是具有代表性的原癌基因和抑癌基因,突变常见于多种恶性肿瘤且在 CRC 患者中高发<sup>[7,8]</sup>。随着对 KRAS 选择性抑制剂等靶点药物的开发和运用,相关突变体的治疗已经取得了一定的进步<sup>[31]</sup>。但要让基因靶向治疗成为 CRC 患者的有效和可行的选择,在作用机制和治疗技术方面还需要进一步明确和开发。

依托于 CRISPR/Cas9 技术,本研究分别构建了针对结肠癌 SW620 细胞系中 KRAS 和 TP53 突变的 sgRNA,实现了对 SW620 细胞系中突变的 KRAS 和 TP53 的基因编辑。结果表明,靶向突变的 KRAS 基因和 TP53 基因明显抑制了 SW620 肿瘤细胞的增殖能力,且促进了 SW620 肿瘤细胞的凋亡,提示突变的 KRAS 和 TP53 基因在 CRC 的发生和进展中起着重要作用,靶向突变的 KRAS 和 TP53 基因有可能抑制 CRC 的发展恶化。这一研究还需要进一步的体内实验验证,以期对 CRC 的基因靶向治疗提供更坚实的实验依据。

同时,无论是体外编辑还是体内编辑,准确有效的运载与递送技术是决定基因靶向治疗成功与否的关键环节。目前临床上主要采用病毒载体、纳米微粒及蛋白-RNA 复合物电穿孔三种方式实现特定组织的递送,可根据体内不同途径进行选择,但也具有各自的局限性<sup>[32]</sup>。国内外的科学家针对这一关键问题不断研发新的技术策略,在最近的报道中,张锋团队对细菌胞外可收缩注射系统 (eCISs) 中的发光杆菌毒力基因盒 (PVC) 进行了系统性的研究和改造,在人源细胞及动物体内实

现 Cas9/碱基编辑器等蛋白高效特异性递送,为精准医学及基因靶向治疗提供了新的技术方案<sup>[33]</sup>。

#### 参考文献 (References)

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249
- [2] Kim J C, Bodmer W F. Genomic landscape of colorectal carcinogenesis[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2022, 148(3): 533-545
- [3] Markowitz S D, Bertagnoli M M. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer[J]. N Engl J Med, 2009, 361(25): 2449-2460
- [4] Nam S K, Yun S, Koh J, et al. BRAF, PIK3CA, and HER2 Oncogenic Alterations According to KRAS Mutation Status in Advanced Colorectal Cancers with Distant Metastasis [J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0151865
- [5] Huang D, Sun W, Zhou Y, et al. Mutations of key driver genes in colorectal cancer progression and metastasis [J]. Cancer Metastasis Rev, 2018, 37(1): 173-187
- [6] Giannakis M, Mu X J, Shukla S A, et al. Genomic Correlates of Immune-Cell Infiltrates in Colorectal Carcinoma [J]. Cell Rep, 2016, 15(4): 857-865
- [7] Yaeger R, Chatila W K, Lipsyc M D, et al. Clinical Sequencing Defines the Genomic Landscape of Metastatic Colorectal Cancer[J]. Cancer Cell, 2018, 33(1): 125-136 e3
- [8] Nakayama M, Oshima M. Mutant p53 in colon cancer [J]. J Mol Cell Biol, 2019, 11(4): 267-276
- [9] Nusrat M, Yaeger R. KRAS inhibition in metastatic colorectal cancer: An update[J]. Curr Opin Pharmacol, 2023, 68: 102343
- [10] Bahrami A, Hassanian S M, ShahidSales S, et al. Targeting RAS signaling pathway as a potential therapeutic target in the treatment of colorectal cancer[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(3): 2058-2066
- [11] Cicens J, Tamosaitis L, Kvederaviciute K, et al. KRAS, NRAS and BRAF mutations in colorectal cancer and melanoma[J]. Med Oncol,

- 2017, 34(2): 26
- [12] Jones R P, Sutton P A, Evans J P, et al. Specific mutations in KRAS codon 12 are associated with worse overall survival in patients with advanced and recurrent colorectal cancer [J]. Br J Cancer, 2017, 116 (7): 923-929
- [13] Serebriiskii I G, Connelly C, Frampton G, et al. Comprehensive characterization of RAS mutations in colon and rectal cancers in old and young patients[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 3722
- [14] Lane D P. Cancer. p53, guardian of the genome[J]. Nature, 1992, 358 (6381): 15-16
- [15] Toledo F, Wahl G M. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas[J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(12): 909-923
- [16] Contractor T, Harris C R. p53 negatively regulates transcription of the pyruvate dehydrogenase kinase Pdk2[J]. Cancer Res, 2012, 72(2): 560-567
- [17] R M, P H A, Mahadevan V. HDAC inhibitors show differential epigenetic regulation and cell survival strategies on p53 mutant colon cancer cells[J]. J Biomol Struct Dyn, 2018, 36(4): 938-955
- [18] Pino M S, Chung D C. The chromosomal instability pathway in colon cancer[J]. Gastroenterology, 2010, 138(6): 2059-2072
- [19] Cong L, Ran F A, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. Science, 2013, 339(6121): 819-823
- [20] Hosseini S A, Salehifard Jouneghani A, Ghatrehsamani M, et al. CRISPR/Cas9 as precision and high-throughput genetic engineering tools in gastrointestinal cancer research and therapy [J]. Int J Biol Macromol, 2022, 223(Pt A): 732-754
- [21] Matano M, Date S, Shimokawa M, et al. Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids[J]. Nat Med, 2015, 21(3): 256-262
- [22] Roper J, Tammela T, Cetinbas N M, et al. In vivo genome editing and organoid transplantation models of colorectal cancer and metastasis [J]. Nat Biotechnol, 2017, 35(6): 569-576
- [23] Li Y, Li X, Qu J, et al. Cas9 Mediated Correction of beta-catenin Mutation and Restoring the Expression of Protein Phosphorylation in Colon Cancer HCT-116 Cells Decrease Cell Proliferation in vitro and Hamper Tumor Growth in Mice in vivo[J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 17-29
- [24] Ikediobi O N, Davies H, Bignell G, et al. Mutation analysis of 24 known cancer genes in the NCI-60 cell line set [J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5(11): 2606-2612
- [25] Meyer B, Are C. Current Status and Future Directions in Colorectal Cancer[J]. Indian J Surg Oncol, 2018, 9(4): 440-441
- [26] Schirripa M, Cohen S A, Battaglin F, et al. Biomarker-driven and molecular targeted therapies for colorectal cancers [J]. Semin Oncol, 2018, 45(3): 124-132
- [27] 谢俊祥, 张琳. 精准医疗发展现状及趋势 [J]. 中国医疗器械信息. 2016, 22(11): 5-10
- [28] Jiang C, Meng L, Yang B, et al. Application of CRISPR/Cas9 gene editing technique in the study of cancer treatment [J]. Clin Genet, 2020, 97(1): 73-88
- [29] Chen M J, Chung-Faye G A, Searle P F, et al. Gene therapy for colorectal cancer: therapeutic potential [J]. BioDrugs, 2001, 15 (6): 357-367
- [30] Ma S C, Zhang J Q, Yan T H, et al. Novel strategies to reverse chemoresistance in colorectal cancer [J]. Cancer Med, 2023 [Epub ahead of print]
- [31] Tria S M, Burge M E, Whitehall V L J. The Therapeutic Landscape for KRAS-Mutated Colorectal Cancers[J]. Cancers (Basel), 2023, 15 (8): 2375
- [32] Doudna J A. The promise and challenge of therapeutic genome editing[J]. Nature, 2020, 578(7794): 229-236
- [33] Kreitz J, Friedrich M J, Guru A, et al. Programmable protein delivery with a bacterial contractile injection system [J]. Nature, 2023, 616 (7956): 357-364

(上接第 4019 页)

- [23] Yuehua Jiao, Lanwei Zhang, Fei Liu, et al. Complete genome sequence of Enterococcus faecalis LD33, a bacteriocin-producing strain[J]. J Biotechnol, 2016, 227: 79-80
- [24] Fang Jingyuan, Yang Yunsheng, Xie Weifen. Chinese expert consensus on the application of live combined Bifidobacterium, Lactobacillus, and Enterococcus powder/capsule in digestive system diseases (2021)[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2023: 1-10
- [25] Yakovenko E P, Strokova T V, Iakovenko A V, et al. A prospective randomized comparative study of the efficacy and safety of a two-week bismuth-based quadrotherapy of Helicobacter pylori infection with the inclusion of the probiotic containing Bifidobacterium longum BB-46 and Enterococcus faecium ENCfa-68 [J]. Ter Arkh, 2021, 93: 916-922
- [26] 田婷婷, 陈郇锦, 梁美婷, 等. 低尿酸人群肠道尿酸降解功能菌的筛选、驯化及鉴定[J]. 生物医学工程学杂志, 2022, 39(04): 792-797