

利用 CRISPRi 下调 MDR1 基因表达增强肺腺癌 A549/DDP 细胞对顺铂敏感性*

刘凯¹, 孙新迪¹, 张伟伟^{1,2}, 杨清竹^{1,2}, 黄鑫^{1,2}, 邵淑丽^{1,2Δ}

(1. 齐齐哈尔大学生命科学与农林学院, 2. 抗性基因工程与寒地生物多样性保护黑龙江省重点实验室, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

【摘要】 目的: 探讨利用 CRISPRi 下调 MDR1 基因表达增强肺腺癌 A549/DDP 细胞对顺铂敏感性的作用。**方法:** 利用生物信息学技术预测 MDR1 基因启动子上潜在的 CRISPRi 干扰位点, 设计干扰片段并构建重组载体, 采用 qRT-PCR、Western blot 方法检测各组细胞中 MDR1 基因 mRNA 以及蛋白表达水平, 筛选干扰效率高的重组载体进行后续实验。将人肺癌 A549/DDP 细胞分为 3 组, 分别为 A549/DDP、Scrambled、sgRNA-MDR1-1, 每组设置 3 个复孔。将各载体转染细胞 48 h 后, 流式细胞术检测各组细胞外排情况, MTT 法检测各组细胞的 IC₅₀ 值, 激光共聚焦显微镜下观察各组细胞经顺铂处理后的细胞形态。**结果:** 经测序比对, 成功构建两种干扰 MDR1 基因转录的 CRISPRi 重组载体。转染 A549/DDP 细胞后, 各转染组细胞 MDR1 基因 mRNA 以及蛋白水平均显著降低 ($P < 0.01$), 其中 sgRNA-MDR1-1 的干扰效率最高, mRNA 和蛋白水平干扰效率分别达 60% 和 51%。与 Scrambled 组相比, 转染 sgRNA-MDR1-1 组细胞的细胞外排能力降低 ($P < 0.01$), 细胞对顺铂的 IC₅₀ 值显著降低 ($P < 0.01$), 细胞内染色质聚集边缘化。**结论:** 利用 CRISPRi 技术干扰 MDR1 基因表达能增强肺腺癌 A549/DDP 细胞对顺铂的敏感性。

【关键词】 CRISPRi; MDR1 基因; 药物敏感性; 肺腺癌 A549/DDP 细胞; 细胞培养

【中图分类号】 Q291

【文献标识码】 A

【文章编号】 1000-6834(2024)01-206-005

【DOI】 10.12047/j.cjap.6342.2022.109

Down-regulation of MDR1 gene expression by CRISPRi to enhance the sensitivity of lung adenocarcinoma A549/DDP cells to cisplatin

LIU Kai¹, SUN Xin-di¹, ZHANG Wei-wei^{1,2}, YANG Qing-zhu^{1,2}, HUANG Xin^{1,2}, SHAO Shu-li^{1,2Δ}

(1. College of Life Science and Agroforestry, Qiqihar University, 2. Heilongjiang Key Laboratory of Resistance Genetic Engineering and Biodiversity Protection in Cold Regions, Qiqihar 161006, China)

【ABSTRACT】 Objective: To investigate the effects of down-regulating MDR1 gene expression by CRISPRi on enhancing the sensitivity of lung adenocarcinoma A549/DDP cells to cisplatin. **Methods:** The potential CRISPRi interference sites on the MDR1 gene promoter were predicted by bioinformatics software, and the interference fragments were designed and constructed. The mRNA and protein expression levels of MDR1 gene in each group of cells were detected by qRT-PCR and Western blot methods, and the recombinant vectors with high interference efficiency were screened. Human lung cancer A549/DDP cells were divided into three groups: A549/DDP, Scrambled and sgRNA-MDR1-1, with three multiple holes in each group. After each vector was transfected into the cells for 48 h, the efflux of cells in each group was detected by flow cytometry, the IC₅₀ value of cells in each group was detected by MTT method, and the cell morphology of cells treated with cisplatin was observed under laser confocal microscope. **Results:** After sequencing and comparison, two kinds of CRISPRi recombinant vectors interfering with MDR1 gene transcription were constructed successfully. After transfection of A549/DDP cells, the mRNA and protein levels of MDR1 gene in all transfection groups were decreased significantly ($P < 0.01$). Among them, the interference efficiency of sgRNA-MDR1-1 was the highest, and the interference efficiency of mRNA and protein was 60% and 51%, respectively. After transfection of sgRNA-MDR1-1 vector, compared with the control group, the efflux ability of cells was decreased ($P < 0.01$), the IC₅₀ value of cells to cisplatin was decreased significantly ($P < 0.01$), and the intracellular chromatin gathered and marginalized, and apoptotic bodies appeared. **Conclusion:** CRISPRi interference with MDR1 gene in drug-resistant A549/DDP cells can significantly enhance the sensitivity to cisplatin.

【KEY WORDS】 CRISPRi; MDR1 gene; drug sensitivity; lung adenocarcinoma A549/DDP cell; cell culture

肺腺癌作为肺癌常见亚型之一,具有预后差,发

病率高等特点^[1]。化疗作为中晚期癌症患者的主要治疗手段之一,治疗效果仍不理想^[2]。肺癌细胞在长期的化疗作用下会产生多药耐药(multi-drug resistance, MDR),即肿瘤细胞对不同的化疗药物产生交叉抗药性。因而 MDR 是肿瘤化疗成功的重要障碍^[3]。多药耐药基因(MDR 1),又称 ABCB 1,其过表达是获得性耐药的主要原因之一^[4]。研究表明,MDR1 在许多肿瘤耐药细胞中表达过高^[5],因此

*【基金项目】国家自然科学基金项目(31670843);黑龙江省教育厅基本业务专项重点项目(135109104);黑龙江省教育厅基本业务专项(粮头食尾)(LTSW201737);黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目(植物性食品加工技术特色学科专项,YSTSXK201809);齐齐哈尔大学 2021 年研究生创新科研项目(YJSCX2021029)

【收稿日期】2022-07-22【修回日期】2022-09-28

Δ【通讯作者】Tel: 0452-2738219; E-mail: shshl32@163.com

降低 MDR1 的表达,对于逆转肿瘤细胞对抗癌药物的耐药性具有重要的作用。

CRISPRi 技术具有较强的靶向性以及针对性,能够在不编辑 DNA 的情况下抑制靶基因的转录活性,为肿瘤疾病的治疗提供新的靶点^[6]。如通过 CRISPRi 技术下调 Δ NP63 基因的表达可抑制肺鳞癌细胞的生长^[7];下调 lncGRS-1 基因表达能提高胶质瘤细胞对放射性治疗的敏感性^[8]。但利用 CRISPRi 技术在非小细胞肺癌中抑制 MDR1 表达进而逆转耐药性的研究尚未见报道。

本实验采用 CRISPRi 技术,下调 MDR1 基因,检测人肺腺癌 A549/DDP 细胞中的细胞对顺铂的敏感性,为逆转肺癌细胞多药耐药提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与材料

人肺癌顺铂耐药株 A549/DDP 细胞购自北京肿瘤生物中心;质粒 pSPgRNA 购自 Genscript 公司;RPMI-1640 培养基干粉购自美国 Gibco 公司;胎牛血清购自以色列 BI 公司;E. coli DH5 α 、质粒小量快速提取试剂盒、qRT-PCR 试剂盒、OPTI、PEI、全蛋白提取试剂盒均购自上海生工有限公司;顺铂购自南通飞宇生物科技有限公司;Rho-123 购自于北京索莱宝科技有限公司;MDR1 (bs-0563R)、GAPDH (bs-41373R) 一抗购自北京博奥森生物技术有限公司;二抗购自美国 LI-COR 有限公司;TCSSP8 激光共聚焦显微镜(德国 Leica);荧光定量 PCR 仪(德国 eppendorf 公司);odyssey 双色红外激光扫描成像系统(美国 LI-COR 有限公司)。

1.2 MDR1 干扰表达载体的构建与鉴定

根据靶位点预测软件 (<http://zifit.partners.org>) 对 MDR1 基因启动子区 (-1010—33) 进行预测,在 NCBI 的 BLAST 界面上通过 Align 将靶位点与启动子序列进行比对获得这些靶位点在启动子上对应的位置,从中选出所含转录因子较多的靶位点,最终 MDR1 基因选取 2 个靶位点。根据 MDR1 基因启动子序列设计干扰序列,靶位点的 5' 加上 Bbs I 酶切位点,序列送上海生工生物工程有限公司合成。干扰靶序列如下:MDR1-sgRNA1-F: CACCGTTG-GCACCGTGGGACCAGA, MDR1-sgRNA1-R: AAAC-TGGCACCGTGGGACCAGAC; MDR1-sgRNA2-F: CACCGTAGCTCCTCCTCTGCTACT, MDR1-sgRNA2-R: AAACAGTACCAGAGGAGGAGCTAC。将合成的 sgRNA 寡核苷酸单链退火,与酶切后的 pSgRNA 载体连接,并转化至 DH5 α 感受态细胞中,挑单克隆菌

落送至公司进行测序验证,空载体组命名为 Scrambed。

1.3 细胞培养与转染

将人肺癌耐药细胞 A549/DDP 用 RPMI-1640 培养基培养(含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、0.1 mg/ml 链霉素),在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 以及饱和湿度的环境中培养,待细胞密度长至 80% ~ 90%,传代培养。

转染前 1 d 将 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$ 个细胞均匀接种到 6 孔板中,使细胞密度在转染时达到 70% ~ 80%。分别准备 EP 管 1: 100 μ l OPTI+8 μ l PEI; EP 管 2: 100 μ l OPTI+4 μ g 质粒各自孵育 5 min 后,将 EP 管 1 与 EP 管 2 混合共同孵育 15 min,多位置均匀加入到无血清细胞培养基中,转染 6 h 后换为完全培养基进行培养,用于后续实验。

1.4 实时荧光定量 PCR 法检测细胞中 MDR1 mRNA 表达

利用 Trizol 法提取细胞中的总 RNA,并反转录为 cDNA,以 cDNA 为模板, β -actin 为内参,使用 SYBR Green I Master Mix 进行 qRT-PCR 检测各转染组细胞中 MDR1 基因 mRNA 的表达情况。反应条件为:扩增体系:10 μ l SYBR Green I Master Mix, 1.0 μ l cDNA 模板,0.4 μ l 上游/下游引物,0.4 μ l Rox, 7.8 μ l ddH₂O。扩增条件为:95 $^{\circ}$ C 2 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 40 s, 共 40 个循环。MDR1-F: ATATCAG-CAGCCCACATCAT, MDR1-R: GAAGCACTGGGAT-GTCCGGT。 β -actin-F: TGACGTGGACATCCG-CAAAG, β -actin-R: CTGGAAGGTGGACAGCGAGG。每孔设置 3 次重复,并利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算 MDR1 基因的相对表达。

1.5 Western blot 检测细胞中 MDR1 蛋白表达

利用蛋白裂解液提取各组细胞中的总蛋白,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,并利用湿转法将蛋白电转印到 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,将稀释好的 MDR1、GAPDH (1: 500) 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBST 洗 3 次(每次 15 min),室温避光孵育二抗 1 h, PBST 洗 3 次(每次 15 min),利用 Odyssey IR 扫描蛋白条带,并使用 Image J 软件检测各条带的灰度值,目的蛋白条带灰度值与内参蛋白条带灰度值之比为蛋白表达水平。

1.6 流式细胞术 Rho-123 药物外排检测

将孔板中培养基移除,并用 PBS 清洗细胞。用胰酶将细胞消化收至 1.5 EP 管中,1 200 r/min 离心 5 min,并将 Rho-123 用 PBS 按 1: 500 比例稀释。每管加 500 μ l 的 Rho-123 工作液,避光孵育 30 min;

离心后, PBS 洗涤两次, 流式细胞仪上机检测。

1.7 MTT 法检测药物敏感性

将对数生长期的 A549/DDP 细胞按照 5×10^5 cells/well 的密度接种至 96 孔板中, 分别转染 Scrambed 和 sgRNA-MDR1-1 重组载体作用 48 h, 经不同浓度的 0、20、40、60、80 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂处理各组细胞 24 h、48 h、72 h, 每组设置 3 个复孔, 每孔加入 20 μl 5 mg/ml MTT, 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续孵育 4 h, 吸去培养基, 每孔加入 180 μl DMSO, 490 nm 处测定光吸收值, 计算细胞存活率。

细胞的存活率 = (实验组的平均活细胞数 / 对照组的平均活细胞数) $\times 100\%$ 。

以顺铂不同质量浓度的负对数作为横坐标, 抑制率为纵坐标, 作线性回归方程, 计算半数抑制质量浓度, 即 IC_{50} 值。

1.8 激光共聚焦显微镜下观察细胞形态

将细胞接种至含有盖玻片的 6 孔板中, 并设置 A549/DDP、Scrambed、sgRNA-MDR1-1 3 个实验组, 药物处理 48 h 后, 用提前预冷的 PBS 洗涤细胞, 用甲醇固定后, 每孔加入 200 μl 吖啶橙, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min 后, 激光共聚焦显微镜下观察细胞形态并拍照。

1.9 统计学处理

实验数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 来表示, 利用 SPSS 22.0 进行分析, 组间比较采用 Student's *t* test 检验, 利用 Graphpad Prism5.0 软件进行作图。

2 结果

2.1 靶向 MDR1 基因 CRISPRi 干扰载体的构建

针对 MDR1 启动子序列, 构建两个 CRISPRi 干扰载体, 经测序验证未出现碱基突变现象 (图 1), 表明载体构建成功, 分别命名为 sgRNA-MDR1-1、sgRNA-MDR1-2。

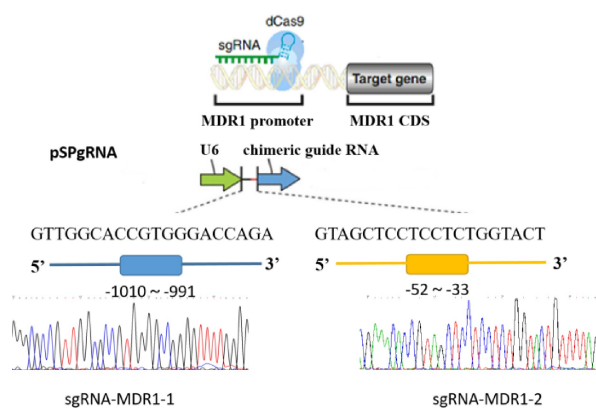


Fig. 1 DNA sequencing map in sgRNA# plasmid transfection group

2.2 sgRNA-MDR1 对 MDR1 基因 mRNA 表达的影响

重组载体转染细胞后, qRT-PCR 法检测 MDR1 基因表达, 结果表明, 与 Scrambed 组相比, 转染 MDR1 干扰载体后, MDR1 基因的 mRNA 表达水平均显著降低, 并且 sgRNA-MDR1-1 重组质粒的沉默效果最显著 ($P < 0.01$, 表 1), 干扰效率达 60% ($P < 0.01$)。

2.3 sgRNA-MDR1 对 MDR1 基因蛋白表达的影响

重组载体转染细胞后, Western blot 法检测 MDR1 基因表达, 结果表明, 与 Scrambed 组相比, 转染 MDR1 干扰载体后, MDR1 基因的蛋白表达水平均显著降低, 并且 sgRNA-MDR1-1 重组质粒的沉默效果最显著 ($P < 0.01$, 图 2), 干扰效率达 51% ($P < 0.01$)。因此后续实验选用 sgRNA-MDR1-1。

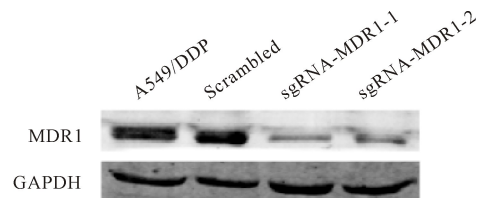


Fig. 2 The protein expressions of MDR1 gene in cells after transfected with sgRNA-MDR1

Tab. 1 The expressions of MDR1 gene in cells after transfected with sgRNA-MDR1 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Cell lines	MDR1 mRNA levels	MDR1 protein levels
A549/DDP	1.02 \pm 0.01	1.03 \pm 0.05
Scrambed	0.98 \pm 0.02	0.97 \pm 0.02
sgRNA-MDR1-1	0.40 \pm 0.03 **	0.49 \pm 0.04 **
sgRNA-MDR1-2	0.55 \pm 0.02 *	0.65 \pm 0.03 **

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs scrambled cell

2.4 sgRNA-MDR1-1 载体对 A549/DDP 细胞药物外排能力的影响

利用流式细胞术检测转染 sgRNA-MDR1-1 载体后细胞内 Rho-123 滞留量, 结果如图 3 所示, 转染 Scrambed 后, 细胞内滞留量及荧光强度无明显变化。转染 sgRNA-MDR1-1 后, A549/DDP 细胞内滞留量显著升高, 相对荧光强度升高 1.30 倍 ($P < 0.01$), 即外排能力降低。

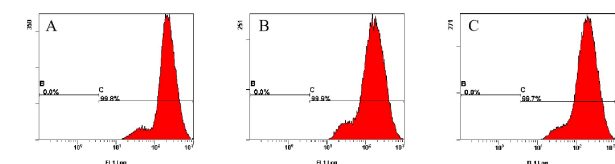


Fig. 3 The effects of sgRNA-MDR1-1 on fluorescent intensity of Rho-123 in A549/DDP cells

A: A549/DDP; B: Scrambed; C: sgRNA-MDR1-1

2.5 sgRNA-MDR1-1 载体对各组细胞对顺铂敏感性的变化

利用 MTT 法检测各组细胞对于顺铂的敏感性。分别使用不同浓度顺铂(0 μmol/L、20 μmol/L、40 μmol/L、60 μmol/L、80 μmol/L、100 μmol/L)处理各实验组细胞 24 h、48 h、72 h,并绘制增殖抑制曲线。由图 4 可知,顺铂可显著抑制人肺癌细胞的生长,且呈剂量依赖性。由表 4 可知,在相同转染时间下,与 Scrambled 组相比转染 sgRNA-MDR1-1 后的细胞 IC₅₀ 值显著降低($P < 0.01$),Scrambled 组与 A549/DDP 组无显著差异。因此选择 40 μmol/L 顺铂作用细胞 48 h 进行后续实验。

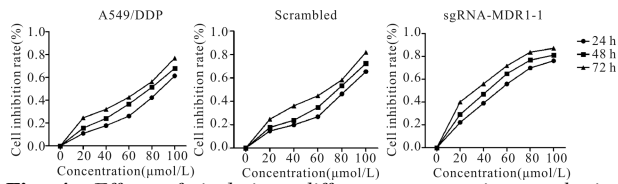


Fig. 4 Effects of cisplatin at different concentrations on the inhibition of each group cells ($n=3$)

Tab. 2 IC₅₀ values of cells treated with cisplatin in different experimental groups (μmol/L, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Cell lines	24 h	48 h	72 h
A549/DDP	91.69±1.56	75.29±1.72	59.47±3.54
Scrambled	85.31±2.31	70.99±2.34	54.45±2.15
sgRNA-MDR1-1	49.07±1.98 **	38.95±2.24 **	29.11±1.23 **

** $P < 0.01$ vs scrambled cell

2.6 sgRNA-MDR1-1 载体对 A549/DDP 细胞形态的影响

在激光共聚焦显微镜下观察转染干扰载体后的细胞形态,结果如图 5 所示,Scrambled 组细胞经 40 μmol/L 顺铂处理,细胞结构清晰,包膜完整;而转染 sgRNA-MDR1-1 组经 40 μmol/L 顺铂处理 48 h,细胞出现明显的凋亡特征:部分细胞核裂解,染色质聚集边缘化。

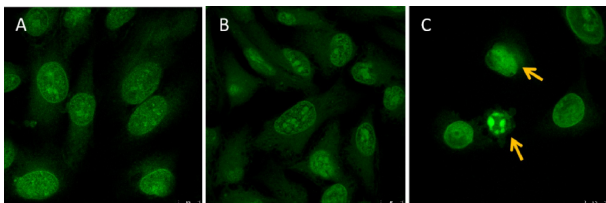


Fig. 5 Cell morphology of each group cells under a laser confocal microscope (acridine orange $\times 200$, Bar=10 μm)

A: A549/DDP; B: Scrambled; C: sgRNA-MDR1-1

3 讨论

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一^[9]。化疗是治疗晚期肺癌患者的重要手段之一,但长期使用化疗会对部分患者产生继发性多药耐药(multidrug re-

sistance, MDR),使治疗效果逐渐降低。美国癌症协会统计,每年死于癌症的患者中,其中有 33% 与多药耐药的发生有关^[10]。多药耐药形成机制复杂,其中 MDR1 基因过表达是多药耐药形成的主要原因之一。因此,沉默 MDR1 基因表达已成为降低肿瘤细胞多药耐药的重要靶点之一。如抑制 MDR1 基因的表达后,会增强抗癌药物紫杉醇对非小细胞肺癌细胞的治疗效果^[11],Bmi-1 通过下调 MDR1 的表达,从而使 A549/DDP 细胞凋亡^[12],通过调节 AKT/NF-κB/MDR 1 通路,从而逆转肠癌细胞耐药,为治疗大肠癌多药耐药提供潜在治疗靶点^[13],因此本实验通过下调 MDR1 基因,分析细胞对顺铂的敏感性,为逆转肺癌细胞多药耐药提供理论依据。

CRISPR 相关蛋白 Cas9 是一种 RNA 引导的 DNA 内切酶,它利用 RNA-DNA 互补性来识别序列特异性双链 DNA(dsDNA)切割的靶位点^[14]。CRISPRi 系统由 CRISPR/Cas9 技术改进而来,相较于 RNAi 技术,CRISPRi 技术能抑制指定基因的转录起始,其拥有比 RNAi 更高的干扰效率和更低的脱靶风险,通过 RNA-seq 实验表明 CRISPRi 在真核细胞中介导的转录抑制具有高度特异性,通过抑制基因的转录实现基因表达调控^[15]。如通过 CRISPRi 技术沉默 MTA1 基因的表达,会影响结肠癌细胞 HCT116 的侵袭以及迁移力^[16],因此本实验针对 MDR1 基因启动子区,设计 2 个 CRISPRi 干扰片段,构建重组载体后,将 sgRNA-MDR1-1、sgRNA-MDR1-2 重组质粒转染至 A549/DDP 耐药株细胞中,利用 qRT-PCR 以及 Western blot 技术检测 MDR1 基因表达,筛选最佳干扰载体,结果表明转染后,MDR1 基因的 mRNA 以及蛋白的表达水平均显著下降,并且 sgRNA-MDR1-1 载体干扰水平最高。

众所周知,MDR1 基因编码的 P-gp 蛋白分布于细胞表面,能主动泵出细胞内的细胞毒药物。本研究用细胞毒药物的结构类似物 Rho-123 作为底物与肺癌细胞作用,流式细胞术检测细胞内 Rho-123 荧光强度。结果表明转染 sgRNA-MDR1-1 载体后,A549/DDP 细胞 Rho-123 滞留量明显增加($P < 0.01$),外排能力减弱。

铂类、生物碱类抗癌药物是治疗癌症的常用药物,人癌细胞对药物敏感性的体外检测是临床肿瘤治疗的基础,具有十分重要的意义。如化疗药物多柔比星作用于人骨肉瘤 U2OS 细胞后,可显著升高细胞增殖抑制率^[17]。利用迷迭香酸激活 MAPK 通路会逆转非小细胞肺癌对顺铂的耐药性,从而诱导细胞凋亡^[18]。苦参素与长春新碱联合处理后,可显

著降低人结肠癌 HCT-8/VCR 细胞的耐药性^[19]。利用 MTT 法检测细胞 IC₅₀ 值、在激光共聚焦显微镜下观察细胞形态是反应肿瘤细胞是否对药物敏感的重要手段。本实验在干扰 MDR1 基因表达的基础上,加入不同浓度的顺铂作用 24 h、48 h、72 h 后采用 MTT 法测定各组细胞的 IC₅₀ 值,激光共聚焦显微镜下观察细胞形态,结果显示转染 sgRNA-MDR1-1 后的细胞 IC₅₀ 值显著降低 ($P < 0.01$),细胞产生凋亡小体。由此可见干扰 MDR1 基因表达后,A549/DDP 细胞对顺铂药物敏感性增强。

综上所述,本实验通过 CRISPRi 技术沉默 MDR1 基因的表达,提高 A549/DDP 耐药株细胞对顺铂的敏感性。

【参考文献】

- [1] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, *et al.* Cancer statistics, 2021[J]. *CA-Cancer J Clin*, 2021, 71(1): 7-33.
- [2] 胡俊,蓝冰. 肺癌患者化疗期症状群管理的难点及对策[J]. 当代护士(中旬刊), 2021, 28(10): 71-74.
- [3] Kong FB, Deng QM, Deng HQ, *et al.* Siva-1 regulates multidrug resistance of gastric cancer by targeting MDR1 and MRP1 via the NF-KB pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(2): 1558-1566.
- [4] Fung KL, Gottesman MM. A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1794(5): 860-871.
- [5] 刘芳,宋玉芳,张学辉,等. 多药耐药基因表达与上皮性卵巢癌化疗耐药的相关性[J]. 中国医刊, 2021, 56(5): 561-564.
- [6] 任爱华,刘婉,王大伟. 基于 CRISPR/Cas9 技术敲除 PD-L1 对非小细胞肺癌 PC-9/T790M 细胞吉非替尼耐药敏感性的影响[J]. 吉林大学学报(医学版), 2021, 47(2): 292-298.
- [7] Yoshida M, Yokota E, Sakuma T, *et al.* Development of an integrated CRISPRi targeting Δ Np63 for treatment of squamous cell carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(49): 29220-29232.
- [8] Liu SJ, Malatesta M, Lien BV, *et al.* CRISPRi-based radiation modifier screen identifies long non-coding RNA therapeutic targets in glioma[J]. *Genome Biol*, 2020, 21(1): 83.
- [9] 刘宗超,李哲轩,张阳,等. 2020 全球癌症统计报告解读[J]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2021, 7(2): 1-14.
- [10] 彭钧,鲍方,李小明,等. MDR1、PEDF、LRP 在宫颈癌中的表达及意义[J]. 中国现代医学杂志, 2021, 31(13): 11-16.
- [11] Liu WT, Lo YL, Hsu C, *et al.* CS-PEI/Beclin-siRNA downregulate multidrug resistance proteins and increase paclitaxel therapeutic efficacy against NSCLC[J]. *Mol Ther-Nucl Acids*, 2019, 17: 477-490.
- [12] 陈明军,陈奇,周月鹏. Bmi-1 调控非小细胞肺癌细胞对顺铂的敏感性研究[J]. 医学研究生学报, 2019, 32(7): 710-714.
- [13] Yuan Z, Liang X, Zhan Y, *et al.* Targeting CD133 reverses drug-resistance via the AKT/NF- κ B/MDR1 pathway in colorectal cancer[J]. *Brit J Cancer*, 2020, 122(9): 1-12.
- [14] O'Connell MR, Oakes BL, Sternberg SH, *et al.* Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9[J]. *Nature*, 2014, 516(7530): 263-266.
- [15] 田开仁,薛二淑,宋倩倩,等. CRISPR-dCas9 调控基因转录的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2018, 38(7): 94-101.
- [16] 窦娜,李春晓,王婷,等. MTA1 通过上调 CK19 促进结肠癌细胞 HCT116 的侵袭[J]. 癌症进展, 2019, 17(10): 1147-1151.
- [17] 于鹏,尹天翔,罗彩云. 盐酸罗哌卡因对骨肉瘤细胞增殖、侵袭、凋亡的影响及其机制[J]. 中国应用生理学杂志, 2021, 37(6): 654-659.
- [18] Liao X, Gao Y, Sun L, *et al.* Rosmarinic acid reverses non-small cell lung cancer cisplatin resistance by activating the MAPK signaling pathway[J]. *Phytother Res*, 2020, 34(5): 1142-1153.
- [19] 苏建伟,周喜汉,叶颖霞. 苦参素复合长春新碱对 HCT-8/VCR 细胞耐药性的影响及其机制[J]. 中国应用生理学杂志, 2020, 36(4): 350-353.

(上接第 174 页)

- [19] 丁茂鹏,韦凌霄,王志旺,等. 鳖甲育肝颗粒对复合因素所致肝纤维化大鼠 TGF- β 1/Smads 通路的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2021, 37(5): 463-467.
- [20] 李倩,闫曙光,惠毅,等. 柔木丹改善小鼠肝纤维化的 TGF- β 1/Smad4 信号通路机制[J]. 中国应用生理学杂志, 2020, 36(6): 576-581.