

本文引文格式:吴龙俊云,赵立峰,兰翼君,等.基于CRISPR/Cas9技术构建SIRT6基因敲除的A549肺腺癌细胞系[J].右江民族医学院学报,2023,45(2):253-258.

【论著与临床报道】

## 基于CRISPR/Cas9技术构建SIRT6 基因敲除的A549肺腺癌细胞系

吴龙俊云<sup>1</sup>,赵立峰<sup>2</sup>,兰翼君<sup>1</sup>,赵雯莉<sup>1</sup>,杨波<sup>3</sup>,李也鹏<sup>2</sup>

(1. 右江民族医学院研究生学院,广西 百色 533000;

2. 右江民族医学院附属医院,广西 百色 533000;

3. 右江民族医学院,广西 百色 533000)

**摘要:**目的 应用CRISPR/Cas9技术构建SIRT6基因敲除的人肺腺癌A549稳转细胞系。方法 根据CRISPR/Cas9技术靶点设计原则,通过生物信息学设计向导RNA(single-guide RNA sgRNA),构建sgRNA-SIRT6质粒并包装成慢病毒感染A549细胞,使用嘌呤霉素筛选SIRT6基因敲除的A549细胞并行基因组测序鉴定,应用Western Blot检测SIRT6基因的敲除情况。结果 DNA测序结果显示sgRNA-SIRT6重组质粒构建成功,Western Blot结果显示,转染sgRNA-SIRT6重组质粒的细胞无SIRT6表达。结论 通过CRISPR/Cas9技术成功构建了SIRT6基因敲除的A549细胞系,为后续研究SIRT6基因在肺腺癌细胞中的作用机制和功能奠定了基础。

**关键词:**CRISPR/Cas9;SIRT6;基因敲除;肺腺癌

中图分类号:R734.2 文献标识码:A 文章编号:1001-5817(2023)02-0253-06

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2023.02.015

### Construction of A549 lung adenocarcinoma cell lines with SIRT6 knockout based on CRISPR/Cas9 technology

Wu Longjunyun<sup>1</sup>, Zhao Lifeng<sup>2</sup>, Lan Yijun<sup>1</sup>, Zhao Wenli<sup>1</sup>, Yang Bo<sup>3</sup>, Li Yepeng<sup>2</sup>

(1. Graduate School, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China;

2. The Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi,

China; 3. Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

**Abstract:** **Objective** To construct A549 lung adenocarcinoma cell lines with SIRT6 knockout by CRISPR/Cas9 technology. **Methods** Based on the CRISPR/Cas9 target design principles, the sgRNA-SIRT6 plasmid was constructed by single-guide RNA and turned into lentivirus to infect A549 cells. The A549 cells with SIRT6 gene knockout were screened out by puromycin and identified by genome sequencing, and the SIRT6 gene knockout was detected by Western Blot. **Results** DNA sequencing results showed that sgRNA-SIRT6 recombinant plasmid was successfully constructed, and Western Blot results showed that SIRT6 was

**基金项目:**广西自然科学基金面上项目(2020GXNSFAA259058);广西医疗卫生重点培育学科建设项目(桂卫科教发[2022]4号)

**第一作者简介:**吴龙俊云(1992-),女,在读硕士研究生,住院医师,研究方向:肿瘤基础与临床研究,E-mail:wljy119988@163.com

**第一作者简介:**赵立峰(1987-),男,在读博士,主治医师,研究方向:肿瘤基础与临床研究,E-mail:277305336@qq.com

**通讯作者简介:**李也鹏(1976-),女,博士,副教授,硕士研究生导师,研究方向:肿瘤基础与临床研究,E-mail:liyepeng2732@ymun.edu.cn

not expressed in cells transfected with sgRNA-SIRT6 recombinant plasmid. **Conclusion** The A549 cell lines with SIRT6 gene knockout are successfully constructed with CRISPR/Cas9 technology, which lays a foundation for further research on the mechanism and function of SIRT6 gene in lung adenocarcinoma cells.

**Key words:** CRISPR/Cas9; SIRT6; gene knockout; lung adenocarcinoma

肺癌的发病率和死亡率在恶性肿瘤中高居首位,并有继续上升的趋势<sup>[1]</sup>。其中非小细胞肺癌在肺癌中占有很大的比重,达到 80%~85%,而作为非小细胞肺癌最常见的病理类型,肺腺癌近年来发病率持续上升,早期即可出现远处转移,大部分患者在就诊时已是中晚期,预后很差<sup>[2-3]</sup>。因此,探索肺腺癌新的分子靶点,为肺腺癌患者制定新的治疗策略至关重要。作为人肺腺癌上皮细胞系的一员,A549 细胞与 II 型肺泡细胞非常相似,包括形态、结构和代谢产物组成。因此,A549 细胞被广泛应用于模拟 II 型肺泡细胞反应的研究<sup>[4-6]</sup>。Sirtuin 家族是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸依赖性酶家族。已有研究表明,Sirtuin 家族成员具有去乙酰化修饰多种蛋白的功能,因此其能够调控基因转录,参与细胞基因组稳定性、分化、衰老、凋亡、新陈代谢等多种重要的病理、生理过程,进而影响多种肿瘤的形成和发展过程<sup>[7-8]</sup>。Sirtuin 6(SIRT6)是 Sirtuin 家族成员之一,具有调控基因转录、新陈代谢、端粒的完整性和维护基因组稳定性的作用,在糖尿病、肥胖、心脏病、衰老和肿瘤的发生发展过程中扮演十分重要的角色<sup>[9]</sup>。CRISPR/Cas9 是一种精准高效的新型编辑技术,Cas9 可以对靶基因组进行剪切,形成 DNA 的双链断裂,DNA 修复过程中实现造成移码突变,使靶标基因失去功能,从而实现基因敲除<sup>[10]</sup>。本实验通过 CRISPR/Cas9 系统,借助慢病毒载体构建 SIRT6 基因敲除的人肺腺癌 A549 细胞株,将为更深入探索 SIRT6 在肺腺癌的功能机制提供基础条件。

## 1 材料与方法

1.1 生物材料 人肺腺癌细胞 A549,1640 培养基(biosharp)、DMEM 培养基(biosharp)、慢病毒(上海吉凯基因医学科技股份有限公司)、Polybrene(上海吉凯基因医学科技股份有限公司)、Primer(上海吉凯基因医学科技股份有限公司)、Oligo 引物(上海吉凯基因医学科技股份有限公司)。

1.2 主要试剂 胎牛血清(biocell)、嘌呤霉素、胰酶、SIRT6 抗体、DNA 试剂盒、PDVF 膜、lip3000。

1.3 主要仪器 低速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司)、化学发光成像系统(杭州申花科技有限公司)、37℃ 恒温培养箱(Thermo)、转膜系统(Bio-rad)、电泳仪(Bio-rad)、倒置显微镜(Leica 公司)、PCR 仪器(Biometra)、酶标仪(SpectraMax/iD5)。

## 1.4 实验方法

1.4.1 设计靶点的 sgRNA 序列 利用 CRISPR-Cas9 靶点制作原理,设计 3 种不同并符合实验要求的 sgRNA-SIRT6 序列 (sgRNA-SIRT6-27、sgRNA-SIRT6-28、sgRNA-SIRT6-29),见表 1。以设计的 sgRNA 序列为模板,在模板链的 5' 端添加碱基 CAC-Cg,互补链的 3' 端补加碱基 C,5' 端添加碱基 aaac,确保 3 种 sgRNA-SIRT6 都能与 Bbs I 酶切后的 SIRT6 质粒形成的黏性末端互补,设计的寡核苷酸链合成序列,见表 2。SIRT6 单链 DNA Oligo 由上海吉凯基因医学科技股份有限公司设计及合成。

表 1 sgRNA 序列

sgRNA 编号	sgRNA 序列
sgRNA-SIRT6-27	GTACGTCCGAGACACAGTCG
sgRNA-SIRT6-28	CCGGCTCTGCACCGTGGCTA
sgRNA-SIRT6-29	CTTCCACAAACATGTTCCCG

表 2 sgRNA oligo 序列

名称	5'	sgRNA 合成序列	3'
sgRNA-SIRT6-27-a	CACCg	GTACGTCCGAGACACAGTCG	
sgRNA-SIRT6-27-b	aaac	CGACTGTGTCTCGGACGTAC	c
sgRNA-SIRT6-28-a	CACCg	CCGGCTCTGCACCGTGGCTA	
sgRNA-SIRT6-28-b	aaac	TAGCCACCGTGCAGAGCCGG	c
sgRNA-SIRT6-29-a	CACCg	CTTCCACAAACATGTTCCCG	
sgRNA-SIRT6-29-b	aaac	CGGGAACATGTTTGTGGAAG	c

1.4.2 重组质粒的构建与鉴定 利用合成的 sgRNA-SIRT6 Oligo 经梯度降温 PCR 退火形成双链 sgRNA。95℃ 水浴 15 min,然后冷却至室温,经梯度降温 PCR 退火形成带黏性末端的双链 sgRNA,将退火产物稀释 200 倍使用。由限制性内切酶 BsmBI 酶切载体质粒,取 Vector plasmid 1 μL,10X Buffer Tango 2 μL,DTT (20 mM) 1 μL,BsmBI 1 μL,加 ddH<sub>2</sub>O 补至 20 μL,经过 37℃ 酶切 3 h 得到线性化载体 DNA,通过琼脂糖凝胶电泳回收。取线性化的载体 DNA 50 ng/μL,退火的双链 DNA 0.5 μL,10×T4 Buffer 1 μL,EG4000 1 μL,T4 DNA Ligase 1 μL,加 ddH<sub>2</sub>O 补至 10 μL,16℃ 连接 3 h 获得酶切连接产物。将酶切连接产物转至大肠杆菌 TOP10 感受态菌体内,将其均匀地涂布在含氨苄西林(Amp)的固态培养基上,24 h 后挑取单菌落进行 PCR 鉴定,得到阳性

克隆后测序,得到序列正确的表达 sgRNA 的过表达慢病毒质粒。扩增序列正确的克隆菌液,用中小量质粒提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]提取质粒,送检测序。

1.4.3 sgRNA-SIRT6 慢病毒包装 用胰蛋白酶消化对数生长期的 293T 细胞,以含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基调整细胞密度约  $5.0 \times 10^6$  细胞/15 mL,接种于 10 cm 细胞培养皿,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养 24 h,待细胞密度达 70%~80% 时,取 SIRT6-sgRNA 重组质粒 DNA 溶液 16 μg 和 25 μL Lenti-Easy Packaging Mix 与相应体积的 Opti-MEM 混合均匀,总体积为 1.5 mL,室温下温育 15 min,将混合液滴加入至 293T 细胞培养液中,于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养,孵育 6 h 后弃去含有转染混和物的培养基,缓慢加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 细胞培养基 20 mL,于 37 °C、含 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内继续培养 48~72 h。收集转染后 48 h 的 293T 细胞上清液;离心,加入病毒保存液,轻轻反复吹打重悬;离心后取上清液获得病毒溶液,行滴度测试。

1.4.4 sgRNA-SIRT6 慢病毒感染细胞及稳转株筛选 将 A549 种于 6 孔板中,细胞量为  $10^5$ 。24 h 后更换培养基并加入慢病毒进行感染,设置阴性对照,6 孔板终体积为 2 mL,继续培养 48 h。加入嘌呤霉素筛选细胞,待阴性对照细胞死完,转移细胞到 6 cm 皿继续筛选。取上述少量细胞,DNA 提取试剂盒提取 DNA 并测序,测序引物见表 3。细胞正常胰酶消化,吹打成单细胞,移入 96,24/6 孔板继续培养,并收取蛋白。

表 3 Real-time PCR 引物列表

Primer 名称	引物序列(5'-3')
SIRT6 27 for per F	CTTGGGCTCAGAGAGGTTGG
SIRT6 27 for per R	CAAGAGGGAGACACGCCC
SIRT6 28 for per F	AGCATCCAGCCCGTTATTC
SIRT6 28 for per R	CAGACCTGCTGGCCTCATC
SIRT6 29 for per F	AGCATCCAGCCCGTTATTC
SIRT6 29 for per R	CAGACCTGCTGGCCTCATC

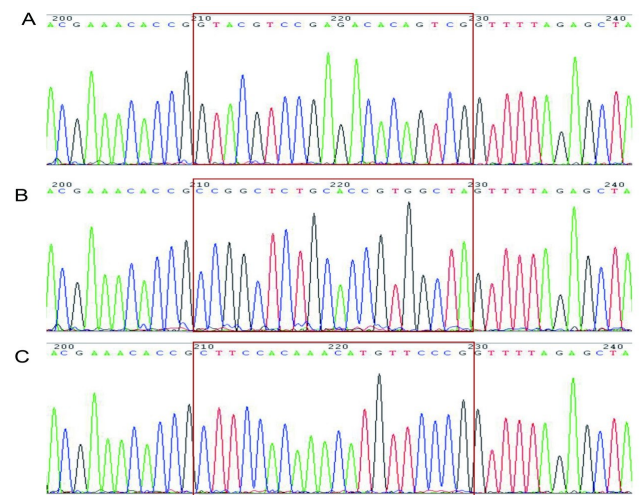
1.4.5 单克隆细胞培养 细胞正常胰酶消化,200×g 离心 5 min 后,吹打成单细胞,计数 50 个细胞,并将细胞加入到 10 mL 培养基中,吹打均匀,96 孔板每孔加入 100 μL 细胞悬液,使每孔细胞 0.5 个左右。24 h 后观察细胞贴壁情况及形态,在单克隆孔中补加 100 μL 培养基。细胞长满 96 孔板按此程序;经传代到 24 孔板,6 孔板到扩大培养,并收取蛋白样品做 WB,冻存细胞。

1.4.6 Western Blot 检测细胞 SIRT6 蛋白表达 选

取对照 A549 细胞与过表达的 A549 细胞,培养 24 h 后,PBS 清洗后用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白并用 BCA 法进行蛋白定量,每个样各取 50 μg 总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,电泳后转至 PVDF 膜,湿转 120 min,5%BSA 摇床封闭 1 h。一抗、二抗孵育,加入曝光底物进行曝光。以 GAPDH 为内参,检测 SIRT6 蛋白的表达水平。

## 2 结果

2.1 基因敲除表达载体的鉴定 重组质粒基因测序结果显示在酶切位点之间插入的片段位置、方向及序列分别与 3 个 sgRNA (sgRNA-SIRT6-27、sgRNA-SIRT6-28、sgRNA-SIRT6-29) 序列一致,靶向 SIRT6 基因的 sgRNA 序列成功插入载体,证明过表达重组质粒构建成功。见图 1。

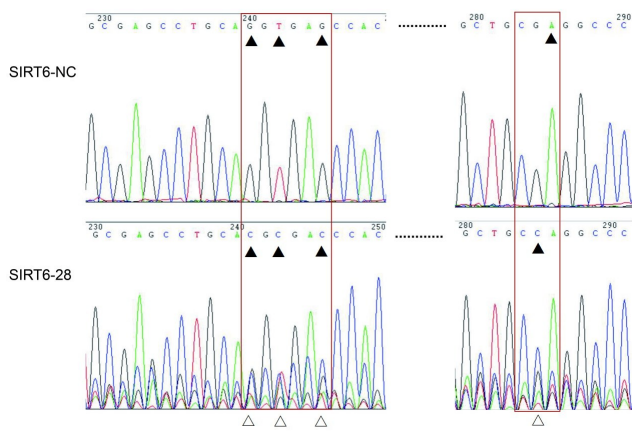


注:A. 质粒 sgRNA-SIRT6-27;B. 质粒 sgRNA-SIRT6-28;C. 质粒 sgRNA-SIRT6-29。

图 1 重组质粒测序图谱

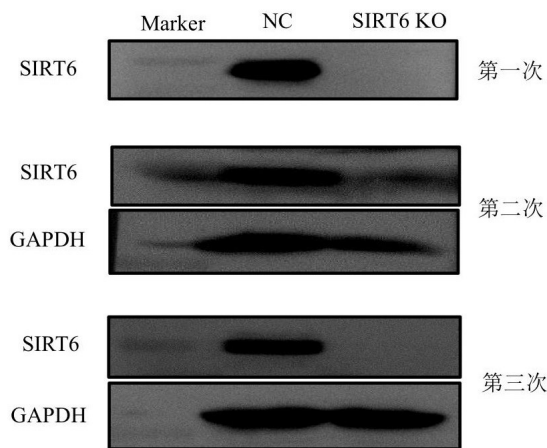
2.2 SIRT6 敲除的人肺腺癌 A549 细胞 DNA 测序鉴定 嘌呤霉素筛选慢病毒感染后细胞,进行单克隆培养,提取细胞基因组 DNA,并对 3 个单克隆(SIRT6-27、SIRT6-28、SIRT6-29)进行 PCR 和测序验证。测序结果表明 3 个单克隆扩增的 PCR 片段大小约为 400 bp 左右,SIRT6-27 和 SIRT6-29 扩增的 PCR 片段与原始序列相比,未见碱基改变,而 SIRT6-28 的 PCR 片段有明显的碱基突变,而且峰图显示突变点处出现套峰。见图 2。

2.3 SIRT6 基因敲除后 A549 细胞内 SIRT6 蛋白表达 将成功敲除 SIRT6 基因的 A549 细胞进行单克隆培养,收取蛋白进行 Western Blot 检测 SIRT6 蛋白表达,以未感染的 A549 细胞系作为对照,Western Blot 显示经 SIRT6 基因敲除后的 A549 细胞内 SIRT6 蛋白不表达,说明 SIRT6 基因敲除成功,见图 3。



注: SIRT6-28 测序结果与原基因序列比对分析,“▲”表示突变的碱基;“△”表示峰图出现套峰。

图 2 SIRT6-28 单克隆细胞测序结果



注: 蛋白在第一次和第二次背景杂带多, 第三次 WB 结果正常。

图 3 Western Blot 检测 SIRT6 蛋白表达

### 3 讨论

SIRT6 是一种同时具有单 ADP 核糖基转移酶、脱脂酰化酶和去乙酰化酶的多功能蛋白质, 这三种酶促特性构成了 SIRT6 调节各种生理和病理过程的能力的基础<sup>[11]</sup>。SIRT6 可以通过调控人体诸多病理、生理过程, 从而影响肿瘤的发生和发展<sup>[10]</sup>。一些研究认为, SIRT6 是一种抑癌基因。一项在膀胱癌的研究发现, T4 分期与 T2 相比, SIRT6 的表达明显降低, 低 SIRT6 表达增加 H3K9 的乙酰化以及 Glut1 和 PDK1 的水平, 增强糖酵解, 并增加肿瘤细胞的增殖能力<sup>[12]</sup>。在鼻咽癌中, SIRT6 过表达导致抗凋亡蛋白 Bcl-2 的水平降低, 但增加裂解的半胱天冬酶-3 和促凋亡蛋白 Bax 的水平。高水平的 SIRT6 抑制 NF- $\kappa$ B 信号传导并促进鼻咽癌细胞的凋亡<sup>[13]</sup>, 而 SIRT6 在人胶质瘤中也被认为是一种抗癌基因<sup>[14]</sup>。然而, 在某些恶性肿瘤中, SIRT6 被证实是一种促癌基因。在骨肉瘤中, SIRT6 表达上调增加了肿瘤的复发风险和死亡风险, 是骨肉瘤患者预后不良因素<sup>[15]</sup>。而在甲状腺癌的研究也显示, SIRT6 上调与甲状腺癌患者的无复发生存期差以及体外 PTC 细胞迁移和侵袭增强有关<sup>[16]</sup>。且 SIRT6 除了在不同肿瘤中发挥不同的作用以外, 还可以在同一种肿瘤中发挥双重作用。有研究表明, 在结肠癌、肝癌、乳腺癌、胰腺癌、黑色素瘤、卵巢癌、前列腺癌、肺癌和血液肿瘤中, SIRT6 在肿瘤的不同发育阶段或不同细胞系中发挥着相反的作用<sup>[11]</sup>。目前, SIRT6 在非小细胞肺癌的研究比较广泛, 但在肺腺癌的研究比较少见。WANG J 等<sup>[17]</sup>的研究表明, 放疗可促进 SIRT6 蛋白介导的 RBBP8 脱乙酰化的发生, 进而提高吉非替尼的疗效。由此可见, SIRT6 在肺腺癌中可能是一种抑癌基因, 但是, SIRT6 在肺腺癌的作用机制仍未明确。此外, SIRT6 在诸多肿瘤中的研究显示出相互矛盾的结果。因此, 构建 SIRT6 基因敲除的 A549 细胞系, 对于进一步探索 SIRT6 在肺腺癌的作用机制具有十分重要的意义。

CRISPR/Cas9 是一种稳定、高效、简单且广泛使用的新型基因编辑技术。CRISPR/Cas9 在 2013 年被成功应用于真核生物和细胞之后<sup>[18-19]</sup>, 该技术得到了突飞猛进的发展, 目前已被广泛用于农业<sup>[20]</sup>、生物材料<sup>[21]</sup>、医学<sup>[22]</sup>等诸多领域。CRISPR/Cas9 作为新兴的基因编辑工具, 具有操作简便、编辑高效、通用性广等优势, 因而被广泛应用于临床医学研究领域。有研究表明, CRISPR/Cas9 技术在恶性肿瘤<sup>[23]</sup>、心血管系统疾病<sup>[24]</sup>、免疫系统疾病<sup>[25]</sup>、遗传性疾病<sup>[26]</sup>以及神经系统疾病<sup>[27]</sup>等临床医学研究领域取得快速的发展。尤其在肿瘤诊断和治疗方面, CRISPR/Cas9 可以进行肿瘤模型构建、肿瘤演化机制研究、分子诊断、生物治疗以及分子靶向药物的研发与筛选, 为肿瘤的基础研究和临床应用提供新的技术保障<sup>[28]</sup>。毫无疑问, CRISPR/Cas9 被证明是一种革命性的工具, 在诸多领域的研究显示出显著的效果, 但其也有自身的局限性。在本实验中, 根据 CRISPR/Cas9 技术靶点设计原则, 选择了 3 个 sgRNA 进行研究, 但最终只有 SIRT6-28 符合后续的研究, 因此该技术的基因编辑效率有待提高。而其他较为突出的问题是脱靶效应、脱氧核糖核酸损伤毒性和免疫毒性<sup>[29]</sup>, 相信随着科学技术的发展和自身不断的完善, CRISPR/Cas9 技术的缺陷终将得到改进。

本研究通过 CRISPR/Cas9 技术, 设计并筛选了针对 SIRT6 敲除的 sgRNA, 然后将 sgRNA-SIRT6 序列与载体链接, 成功构建重组质粒并包装, 将重组质粒转染入 A549 细胞中, 筛选单克隆细胞进行鉴定。目前鉴定细胞系基因成功敲除的主要方法有 3 种: ① DNA 测序结果是否存在基因突变; ② Western Blot 检测蛋白是否表达; ③ 实时荧光定量聚合酶链反应 (real-

time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR) 检测细胞 mRNA 是否表达。部分学者采用单一方法进行验证基因敲除模型构建是否成功<sup>[30]</sup>, 而更多学者选择其中多种方法进行联合鉴定<sup>[31-32]</sup>。本研究使用了 DNA 测序和 Western Blot 检测蛋白两种方法联合鉴定。测序结果表明 PCR 片段有明显的基因突变, 而 Western Blot 结果显示敲除后的 A549 细胞内无 SIRT6 蛋白表达, 证明敲除 SIRT6 基因的 A549 稳定细胞系构建成功。

综上所述, 本研究成功构建了 sgRNA-SIRT6 重组质粒, 同时成功敲除了人肺腺癌 A549 细胞系中的 SIRT6 基因, 为深入研究 SIRT6 在肺腺癌的作用机制奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] 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.
- [3] 张睿娟, 雷弋. 早期肺腺癌临床病理特征及分子特征研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2021, 29(23): 4246-4250.
- [4] 董旭, 张兆域, 苟芳琳, 等. 利用 CRISPR/Cas9 系统构建稳定敲除 CBX2 基因的 A549 细胞系[J]. *天津医科大学学报*, 2018, 24(5): 395-398.
- [5] 赵平, 刘佳, 张颖. 利用 CRISPR/Cas9 技术构建 GLUT4 基因敲减的 A549 细胞系[J]. *中南民族大学学报(自然科学版)*, 2020, 39(2): 133-138.
- [6] 阎煜, 周帆, 姜瑞敏, 等. 基于 CRISPR/Cas9 技术敲除 NFE2L1 对肺癌 A549 细胞增殖的影响[J]. *四川医学*, 2018, 39(12): 1318-1322.
- [7] KHONGKOW M, OLMOS Y, GONG C, et al. SIRT6 modulates paclitaxel and epirubicin resistance and survival in breast cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(7): 1476-1486.
- [8] GRIMLEY R, POLYAKOVA O, VAMATHEVAN J, et al. Over expression of wild type or a catalytically dead mutant of Sirtuin 6 does not influence NFκB responses[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e39847.
- [9] 吕泽中, 袁丁, 张长城, 等. SIRT6 的研究进展及功能剖析[J]. *生命科学*, 2016, 28(11): 1370-1376.
- [10] SHALEM O, SANJANA N E, HARTENIAN E, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells[J]. *Science*, 2014, 343(6166): 84-87.
- [11] LI Y J, JIN J, WANG Y. SIRT6 widely regulates aging, immunity, and cancer [J]. *Front Oncol*, 2022, 12; 861334.
- [12] WU M H, DICKINSON S I, WANG X, et al. Expression and function of SIRT6 in muscle invasive urothelial carcinoma of the bladder[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(10): 6504-6513.
- [13] OUYANG L, YI L, LI J K, et al. SIRT6 overexpression induces apoptosis of nasopharyngeal carcinoma by inhibiting NF-κB signaling[J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11: 7613-7624.
- [14] CHEN X, HAO B, LIU Y, et al. The histone deacetylase SIRT6 suppresses the expression of the RNA-binding protein PCBP<sub>2</sub> in glioma [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 446(1): 364-369.
- [15] ZHANG Z K, HA S H, MOON Y J, et al. Inhibition of SIRT6 potentiates the anti-tumor effect of doxorubicin through suppression of the DNA damage repair pathway in osteosarcoma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 247.
- [16] QU N, HU J Q, LIU L, et al. SIRT6 is upregulated and associated with cancer aggressiveness in papillary thyroid cancer via BRAF/ERK/Mcl-1 pathway[J]. *Int J Oncol*, 2017, 50(5): 1683-1692.
- [17] WANG J Y, SHENG Z Y, DONG Z Y, et al. The mechanism of radiotherapy for lung adenocarcinoma in promoting protein SIRT6-mediated deacetylation of RBBP8 to enhance the sensitivity of targeted therapy[J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2022, 36: 3946320221130727.
- [18] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823.
- [19] MALI P, YANG L H, ESVELT K M, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9 [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 823-826.
- [20] CHEN K L, WANG Y P, ZHANG R, et al. CRISPR/cas genome editing and precision plant breeding in agriculture[J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2019, 70: 667-697.
- [21] EOH J, GU L. Biomaterials as vectors for the delivery of CRISPR-Cas9 [J]. *Biomater Sci*, 2019, 7(4): 1240-1261.
- [22] HSU M N, CHANG Y H, TRUONG V A, et al. CRISPR technologies for stem cell engineering and regenerative medicine[J]. *Biotechnol Adv*, 2019, 37(8): 107447.
- [23] WANG S W, GAO C, ZHENG Y M, et al. Current applications and future perspective of CRISPR/Cas9 gene editing in cancer[J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 57.
- [24] VERMERSCH E, JOUVE C, HULOT J S. CRISPR/Cas9 gene-editing strategies in cardiovascular cells[J]. *Cardiovasc Res*, 2020, 116(5): 894-907.
- [25] KAUSHIK A, YNDART A, ATLURI V, et al. Magnetically guided non-invasive CRISPR-Cas9/gRNA delivery

across blood-brain barrier to eradicate latent HIV-1 infection[J]. *Sci Rep*,2019,9(1):3928.

- [26] HUSSAIN W, MAHMOOD T, HUSSAIN J, et al. CRISPR/Cas system; a game changing genome editing technology, to treat human genetic diseases[J]. *Gene*, 2019, 685: 70-75.
- [27] LEE J S, LEE J Y, SONG D W, et al. Targeted PMP22 TATA-box editing by CRISPR/Cas9 reduces demyelinating neuropathy of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A in mice[J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(1): 130-140.
- [28] 吕宝北, 赵鹏翔, 张鑫, 等. CRISPR/Cas9 在肿瘤治疗中的研究进展[J]. *生物技术进展*, 2018, 8(3): 191-196.
- [29] UDDIN F, RUDIN C M, SEN T. CRISPR gene therapy:

applications, limitations, and implications for the future [J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 1387.

- [30] 蒙红毅, 张健民, 李黎, 等. 利用 CRISPR/Cas9 技术构建 PERV 敲除的 PK15 细胞系[J]. *生物技术*, 2018, 28(6): 513-519, 525.
- [31] 王成博, 康巧珍, 丁聪, 等. 利用 CRISPR/Cas9 系统构建稳定敲除 4.1R 基因的 RAW264.7 细胞株[J]. *南方医科大学学报*, 2017, 37(12): 1609-1614.
- [32] 龚美玲, 张琳琳, 郑翠侠. 利用 CRISPR/Cas9 系统对人 A549 肺癌细胞 NRF2 基因的稳定敲除及其功能研究[J]. *中国癌症杂志*, 2019, 29(11): 855-861.

收稿日期: 2022-12-06; 修回日期: 2022-12-21

(上接第 246 页)

- [9] 唐成, 王润生, 黄承军, 等. 壮医经筋针刺治疗腰椎术后切口疼痛疗效观察[J]. *广西中医药*, 2022, 45(6): 34-37.
- [10] 封享兰, 邹高锐, 邓洪波, 等. 自噬在神经病理性疼痛中研究进展[J]. *临床麻醉学杂志*, 2019, 35(1): 87-90.
- [11] 王娇, 张莉, 李颖, 等. 自噬受体蛋白 p62 的表达及功能研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2022, 38(6): 715-719.
- [12] WANG Q, LIN J, YANG P, et al. Effect of massage on the TLR4 signalling pathway in rats with neuropathic pain[J]. *Pain Res Manag*, 2020, 2020: 8309745.
- [13] HARGREAVES K, DUBNER R, BROWN F, et al. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia[J]. *Pain*, 1988, 32(1): 77-88.
- [14] 林辰. 中国壮医针刺学[M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2014: 223-225.
- [15] 唐汉庆, 黄岑汉, 赵玉峰, 等. 壮医“三道两路”理论的辨析及应用[J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(12): 4236-4239.
- [16] 李婕, 黄贵华, 黄瑾明, 等. 概述壮医对带状疱疹后遗神经痛的认识[J]. *广西中医药*, 2012, 35(6): 42-43.
- [17] 吴杏瑶. 壮医针刺治疗瘀血型腰肌劳损的临床研究[D]. 南宁: 广西中医药大学, 2018.
- [18] 敖胜福, 种朋贵. 基于炎症信号通路的生物碱治疗神经病理性疼痛的研究进展[J]. *现代药物与临床*, 2022, 37

(5): 1162-1168.

- [19] 苑龙, 李雪松, 孟纯阳, 等. 炎症与神经病理性疼痛关系的研究进展[J]. *中国医师杂志*, 2020, 22(2): 313-317.
- [20] 徐瑞艳, 赵青赞, 任秀花, 等. 糖皮质激素受体激动剂地塞米松对大鼠血清促炎因子 IL-6、TNF- $\alpha$  表达及神经病理性疼痛的影响[J]. *神经解剖学杂志*, 2017, 33(2): 202-208.
- [21] 张冰缘, 郑学良, 姜琳, 等. 自噬与神经性疼痛[J]. *中国现代医学杂志*, 2020, 30(13): 47-50.
- [22] 王雄将, 梁英业, 卢栋明, 等. 枢经推拿对慢性神经病理性疼痛大鼠 VGLUT2 及炎症因子表达的影响[J]. *广西中医药大学学报*, 2022, 25(4): 39-44.
- [23] 孙玉红, 李锐, 张野. 自噬在神经病理性疼痛中的角色[J]. *国际麻醉学与复苏杂志*, 2018, 39(2): 161-164.
- [24] 龙炳材, 陈晓红, 唐宏亮, 等. 推拿对神经病理性疼痛大鼠的镇痛作用及其机制[J]. *广西医学*, 2022, 44(17): 2003-2009.
- [25] 曹曼. 加味参苓白术散对腹膜纤维化大鼠自噬相关蛋白(LC3、P62、Beclin-1)和炎症因子(IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$ )的干预作用[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2022.
- [26] 杨根梦, 洪仕君, 王一航, 等. Keap1/Nrf2/p62 和 NLRP3 炎性小体与自噬调节作用的研究进展[J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(3): 103-107.

收稿日期: 2023-02-13; 修回日期: 2023-03-05