

网络出版时间: 2022 - 09 - 14 20: 54 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220913.1744.003.html>

基于 CRISPR/dCas9-SAM 系统筛选胃癌细胞增殖相关基因

彭玉^{1,2}, 巩琦凡², 台福敏², 王田田², 葛常辉², 郑晓飞², 秦宜德¹, 付汉江^{1,2}

摘要 目的 利用 CRISPR/dCas9-SAM 系统探究影响胃癌细胞 AGS 增殖相关基因, 分析其在胃癌发生发展中的作用。方法 针对胃癌与正常胃组织差异表达的基因设计 sgRNA, 构建包装后获得慢病毒文库。以该文库感染 AGS 细胞后不同时间点作为筛选压力, 收取第 0、7、14 天 3 个时间点的 AGS 细胞。高通量测序分析感染后不同时间点 AGS 细胞中 sgRNA 富集情况, 获得与 AGS 细胞增殖相关差异基因。结果 生物信息学显示与 0 d 组相比, 7 d 组、14 d 组分别获得阴性筛选差异基因 42、45 个, 阳性筛选差异基因 59、40 个。其中 7 d 组和 14 d 组中阴性筛选和阳性筛选共有的基因各 11 个。结论 筛选获得 11 个抑制 AGS 细胞增殖的基因, 其中 5 个为蛋白编码基因, 6 个为长链非编码 RNA (lncRNA)

基因; 筛选获得 11 个促进 AGS 细胞增殖的候选基因, 其中 3 个为蛋白编码基因, 8 个为 lncRNA 基因。为进一步功能验证、全面解析胃癌发生发展过程奠定基础。

关键词 CRISPR/dCas9-SAM 系统; 细胞增殖; 胃癌; 长链非编码 RNA

中图分类号 R 342.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)11-1693-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.11.003

2022-08-25 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81773038, 32071290)

作者单位: ¹安徽医科大学基础医学院, 合肥 230032

²军事科学院军事医学研究院辐射医学研究所放射生物学北京重点实验室, 北京 100850

作者简介: 彭玉, 女, 硕士研究生;

秦宜德, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: yideqin@ahmu.edu.cn;

付汉江, 男, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: fuhjlab@163.com

在世界范围内, 胃癌是发病率、病死率位居前列的恶性肿瘤^[1]。由于胃癌早期诊断率较低, 且缺乏有效的治疗手段, 绝大多数胃癌患者整体预后差, 生存率较低。而肿瘤的形成与过度活化的细胞增殖相关, 因此, 探究胃癌细胞增殖相关差异表达基因有助于更好地了解胃癌发生发展机制、寻找治疗的关键靶点。目前已经发现大量 mRNA 和长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 在胃癌组织中异常表达, 但其中影响胃癌细胞增殖过程的具体分子有待研究^[2]。

近年来, 规律间隔成簇短回文重复序列及关联蛋白 9 (clustered regularly interspaced short palin-

while db/m mice were used as control group. The mice were randomly divided into six groups: db/m group, db/m + PF group, db/db group, db/db + PF 25 mg/kg group, db/db + PF 50 mg/kg group, db/db + PF 100 mg/kg group. After 12 weeks of PF gavage, mouse serum samples were collected to detect the levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total cholesterol (TC), triglyceride (TG) and free fat acid (FFA). HE staining, oil red O staining and Sirius red staining were used to observe the degree of pathological injury of liver. The expression of F4/80, α -SMA and Col III protein was detected by immunohistochemistry. The expression of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-18 (IL-18), tumor necrosis factor- α (TNF- α), NOD-like receptor 3 (NLRP3), apoptosis associated speck-like protein (ASC) and cysteinyl aspartate specific proteinase-1 (Caspase-1) was detected by Western blot. **Results** Compared with db/m group, the levels of serum ALT, AST, TC, TG and FFA increased in db/db group, and these indexes decreased after PF gavage. Compared with db/m group, histopathological examination of the liver revealed increased hepatic tissue lipid accumulation, inflammatory cell infiltration, and collagen deposition in db/db mice, and PF treatment reduced hepatic lipid accumulation, inflammatory cell infiltration, and collagen deposition. Meanwhile, compared with db/m group, the expression of proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-18 and TNF- α), F4/80, α -SMA, Col III, NLRP3, ASC and Caspase-1 protein in the liver of db/db mice increased, and the expression of these proteins decreased after gavage with PF. **Conclusion** PF inhibited the NLRP3 inflammatory pathway and attenuated liver inflammation and fibrosis in db/db mice.

Key words paeoniflorin; diabetic liver injury; inflammation; fibrosis; NLRP3 signaling pathway

dromic repeats/associated protein 9 (CRISPR/Cas9) 系统已经发展成为一种功能强大的基因编辑技术,其中 CRISPR/dCas9-SAM 系统是一种高效激活细胞内源基因的新技术^[3]。该系统将无核酸内切酶活性的突变型 Cas9 蛋白(nuclease-dead mutants of Cas9, dCas9) 与转录激活因子 VP64 融合,在存在小向导 RNA(small guide RNA, sgRNA) 的情况下, dCas9-VP64 融合蛋白与基因组特定启动子区结合,募集转录激活复合物 MS2-p65-HSF1,从而激活内源基因的转录。该研究根据胃癌组织中差异表达的蛋白编码基因和 lncRNA 基因构建激活基因 sgRNA 慢病毒文库,利用 CRISPR/dCas9-SAM 系统对人胃癌细胞 AGS 增殖相关基因进行筛选,获得影响 AGS 细胞增殖的蛋白编码基因及 lncRNA 基因,为深入探究其在胃癌发生发展过程中的功能及作用机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要材料 人胃癌细胞 AGS 由军事医学研究院辐射医学研究所保存;慢病毒表达载体 Lenti-sgRNA(MS2) 购自美国 Addgene 公司;血红蛋白(hemoglobin, HBG) sgRNA 表达载体 Lenti-sgHBG 和肌联蛋白(titin, TTN) sgRNA 表达载体 Lenti-sgTTN 由军事医学研究院辐射医学研究所构建并保存;SAM 慢病毒激活载体 dCas9-VP64 和 MS2-P65-HSF1 购自上海吉凯基因医学科技股份有限公司;sgRNA 慢病毒文库由苏州泓讯生物技术公司构建并包装;引物序列由上海生工生物公司合成。

1.1.2 主要试剂 F12 细胞培养基、杀稻瘟菌素、潮霉素 B、嘌呤霉素、TRIzol、PowerUp™ SYBRT-MGreen Master Mix 均购自美国 Thermo 公司;胎牛血清购自德国 PAN-Biotech GmbH 公司;青霉素钠和链霉素钠购自上海泛康生物有限公司;胰蛋白酶购自北京博奥拓达科技有限公司;ImProm-II™ 反转录试剂盒购自美国 Promega 公司;jetPRIME 转染试剂购自法国 Polyplus Transfection 公司;基因组快速提取试剂盒购自北京天漠生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与感染 AGS 细胞培养于含有 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和链霉素的 F12 培养基中,置于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中静止培养,当密度达到 90% 时用胰蛋白酶消化传代。选择处于对数生长期的细胞进行实验。将细胞以 2 ×

10⁵ 个/孔接种于 6 孔板中,16 h 后按照复感染指数(multiplicity of infection, MOI) = 10 分别加入 dCas9-VP64 和 MS2-P65-HSF1 慢病毒,感染 72 h 后,加入杀稻瘟菌素和潮霉素 B 筛选 5 d 至细胞状态稳定,此时具有稳定激活效应的 AGS 细胞标记为 AGS (SAM) 细胞。

1.2.2 质粒转染 将 AGS(SAM) 细胞以 3 × 10⁵ 个/孔接种于 6 孔板中,16 h 后利用 jetPRIME 转染试剂分别转染 2 μg lenti-sgHBG 及 2 μg lenti-sgTTN 载体,设为 HBG 组与 TTN 组。转染 lenti-sgRNA (MS2) 的 AGS 细胞设为对照组,48 h 后收取细胞。

1.2.3 RT-qPCR 检测 利用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA。利用 ImProm-II™ 反转录试剂盒将总 RNA 反转录为 cDNA。按照 PowerUp™ SYBRT-MGreen Master Mix 说明书检测 HBG 及 TTN 的相对表达量。以 GAPDH 作为内参,采用 2^{-ΔΔCT} 方法分析 HBG 及 TTN mRNA 相对表达。引物序列如表 1 所示。

表 1 qRT-PCR 引物序列

| 引物名称 | 序列(5'-3') |
|---------|----------------------------|
| TTN-F | TGT TGC CAC TGG TGC TAA AG |
| TTN-R | ACA GCA GTC TTC TCC GCT TC |
| HBG-F | AGA TGC CAC AAA GCA CCT G |
| HBG-R | CTG CAG TCA CCA TCT TCT GC |
| GAPDH-F | TTG CCC TCA ACG ACC ACT TT |
| GAPDH-R | TCC TCT TGT GCT CTT GCT GG |

1.2.4 sgRNA 文库构建 通过 TCGA 数据库分析,获得胃癌与正常胃组织差异表达的基因共 1 040 个。按照 CRISPR/dCas9 设计规则,在每个基因的启动子区各设计 6 个 sgRNA,构建激活基因 sgRNA 文库,包装慢病毒文库。

1.2.5 sgRNA 文库大规模感染胃癌细胞 将 sgRNA 慢病毒文库以 MOI = 0.3 感染 AGS(SAM) 细胞。48 h 后加入嘌呤霉素筛选 5 d 去除未感染细胞。撤除嘌呤霉素的当天记为 0 d,在第 0、7、14 天 3 个时间点分别收取 3.5 × 10⁶ 个细胞,分别记为 0 d、7 d、14 d 组。

1.2.6 基因组 DNA 提取 将收取的细胞置于 50 ml 的离心管中,加入 3 ml PBS 进行重悬。按照基因组快速提取试剂盒说明书提取基因组 DNA。

1.2.7 生物信息学分析 将获得的基因组 DNA 送至苏州金唯智生物科技有限公司进行 sgRNA 序列扩增及深度测序分析。测序数据质控检测合格后使

用 MAGeCK 软件分析,对 sgRNA 及其对应的基因计数,筛选分为阳性筛选和阴性筛选。阳性筛选为统计存活细胞中富集的 sgRNA,其对应的基因即为促进细胞增殖的基因。阴性筛选则统计随着细胞增殖逐渐减少甚至丢失的 sgRNA,其对应的基因即为抑制细胞增殖的基因。对计数结果进行标准化处理,比较得出样本间 sgRNA 对应基因数目的差异。差异基因结果在 Metascape 数据库 (<https://metascape.org/gp>) 平台进行功能富集分析;交集基因(在 7 d 组和 14 d 组均出现相同差异的基因)在 VENNY2.1 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es>) 平台进行可视化处理。

1.3 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 GraphPad Prism 8 软件通过 two-tailed Student's *t*-test 进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CRISPR/dCas9-SAM 系统激活效率验证 与对照组相比,转染靶向血红蛋白 HBG 和肌联蛋白 TTN 的 sgRNA 表达载体后,HBG mRNA 的表达水平上升 10 000 多倍;TTN mRNA 的表达水平上升 70 倍,差异具有统计学意义 ($P < 0.001$) (图 1)。表明 CRISPR/dCas9-SAM 系统可高效激活靶基因表达,该系统能够用于后续大规模激活基因表达并进行功能筛选。

2.2 增殖相关基因筛选及数据分析 根据测序结果,统计每个样本中每条 sgRNA reads 数目,并注释对应的靶基因。通过评估 7 d 组、14 d 组与 0 d 组每条 sgRNA 的丰度差异,分析对应基因表达激活对细胞增殖的影响。结果显示,与 0 d 组相比,7 d 组筛选获得阳性筛选基因 154 个,其中显著差异基因 59 个;获得阴性筛选基因 92 个,其中显著差异基因 42 个。与 0 d 组相比,14 d 组筛选获得阳性筛选基因

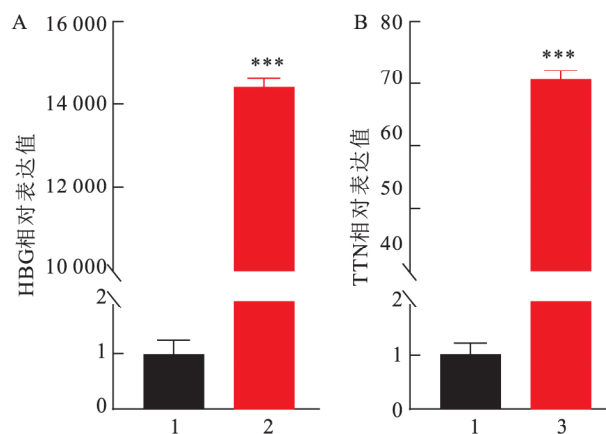


图 1 HBG 和 TTN 的相对表达值

A: HBG 的相对表达值; B: TTN 的相对表达值; 1: 对照组; 2: HBG 组; 3: TTN 组; 与对照组比较: *** $P < 0.001$

122 个,其中显著差异基因 40 个;获得阴性筛选基因 69 个,其中显著差异基因 45 个。

对 RRA 算法获得的差异分析结果进行可视化处理。按照 $P < 0.05$ 且 $|\text{LFC}| > 0.5$ 为标准定义差异显著基因,如图 2 所示,阴性筛选差异基因用蓝色标记,阳性筛选差异基因用红色标记,灰色标记差异不显著或差异无统计学意义的基因。

2.3 阳性筛选基因富集分析 将 7 d 组和 14 d 组中阴性筛选差异基因通过 Metascape 网站进行富集分析(图 3)。富集到的条目显示大部分蛋白编码基因富集到有丝分裂周期调控、核染色体分离、受体酪氨酸激酶的信号转导等与细胞增殖密切相关的通路。

2.4 阳性筛选基因富集分析 阳性筛选差异基因富集分析结果显示其在生物进程中较为分散,多数基因参与炎症反应调节、NK 细胞趋化性、中性粒细胞脱颗粒血液循环等生物学过程。见图 4。

2.5 胃癌细胞增殖调控相关基因分析 为获得可

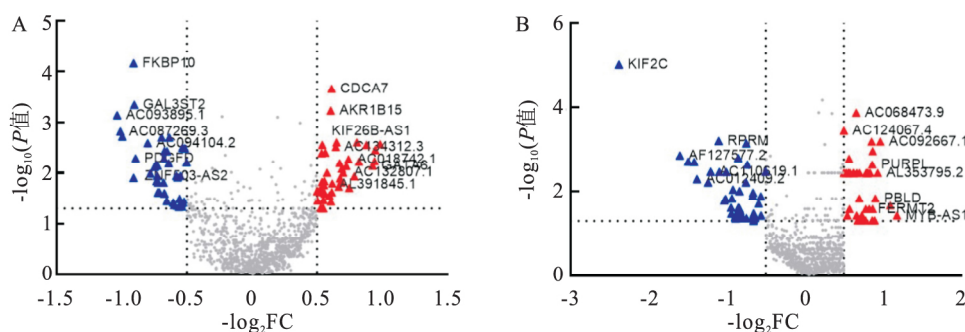


图 2 差异基因火山图展示

A: 7 d 组; B: 14 d 组; 蓝色: 阴性筛选基因; 红色: 阳性筛选基因

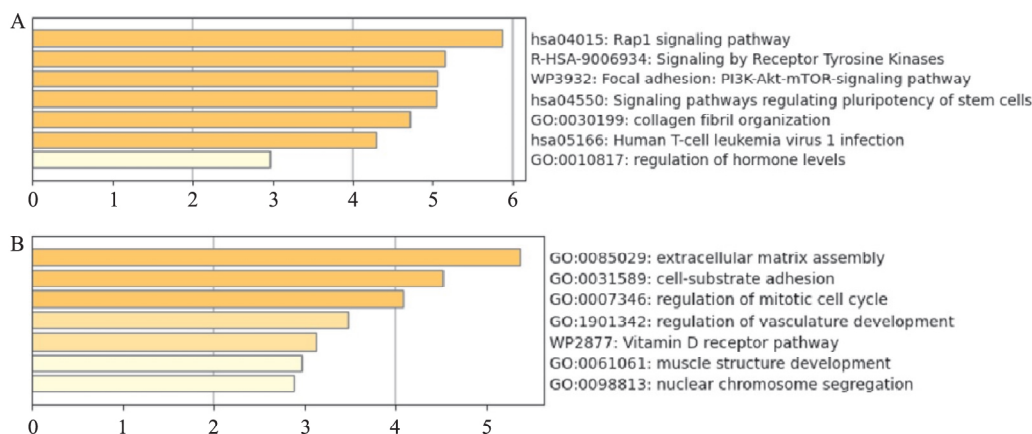


图3 阴性筛选差异基因富集分析
A: 7 d 组阴性筛选基因富集分析; B: 14 d 组阴性筛选基因富集分析

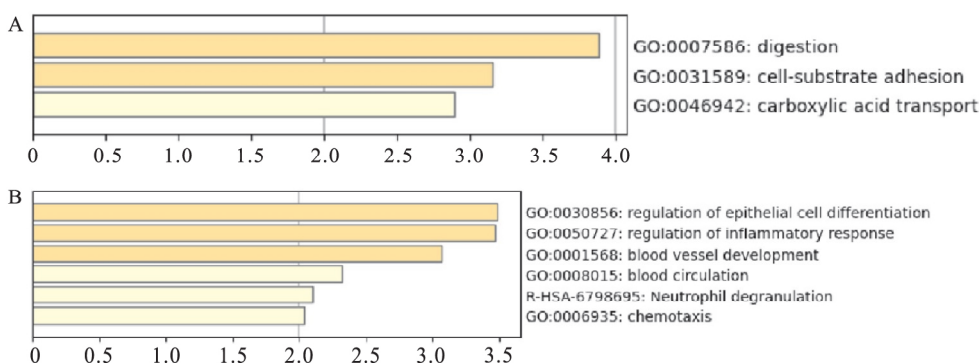


图4 阳性筛选差异基因富集分析
A: 7 d 组阳性筛选基因的富集; B: 14 d 组阳性筛选基因的富集

靠的胃癌细胞增殖调控基因,将7 d组和14 d组的阳性筛选基因及阴性筛选基因使用 VENNY2.1 网站进行 overlap 分析(图5),阳性及阴性筛选组各有11个基因在7 d组和14 d组均有显著差异,这些基因可能参与胃癌细胞增殖的调控。在阴性筛选中,得到6个 lncRNA 基因及5个蛋白编码基因,阳性筛选中,得到8个 lncRNA 基因及3个蛋白编码基因。见表2。

3 讨论

本研究基于具有高效激活作用的 CRISPR/dCas9-SAM 系统,通过靶向胃癌组织中差异表达基因构建 sgRNA 慢病毒文库,对胃癌细胞增殖相关基因进行了大规模筛选。分析0 d、7 d、14 d组细胞中富集的 sgRNA 的读数,对其进行了阴性筛选和阳性筛选。

富集分析结果显示阴性筛选获得的大部分蛋白编码基因均可富集到已有的生物学过程,包括有丝

表2 候选胃癌细胞增殖调控相关基因

| | 增殖负调控基因 | 增殖正调控基因 |
|-----------|-------------------|-------------------|
| 蛋白编码基因 | <i>FKBP10</i> | |
| | <i>SLC25A4</i> | <i>NCAPG2</i> |
| | <i>KLF4</i> | <i>GATA6</i> |
| | <i>TNXB</i> | <i>PBLD</i> |
| | <i>RPRM</i> | |
| lncRNA 基因 | | <i>KIF26B-AS1</i> |
| | <i>AL591368.1</i> | <i>MYB-AS1</i> |
| | <i>AP000424.2</i> | <i>AC132807.1</i> |
| | <i>AC068473.1</i> | <i>AL353795.2</i> |
| | <i>LHX5-AS1</i> | <i>DLX6-AS1</i> |
| | <i>OLMALINC</i> | <i>AC068473.9</i> |
| | <i>LINC0171</i> | <i>KCNMA1-AS1</i> |
| | <i>PURPL</i> | |

分裂周期调控、核染色体分离、受体酪氨酸激酶信号转导等与细胞增殖密切相关的通路。细胞周期的调控异常会导致细胞易受有害突变的影响^[4]。大多数生长因子通过酪氨酸蛋白激酶信号转导途径作用于细胞,进而促进细胞生长、发育和分化,因此酪氨

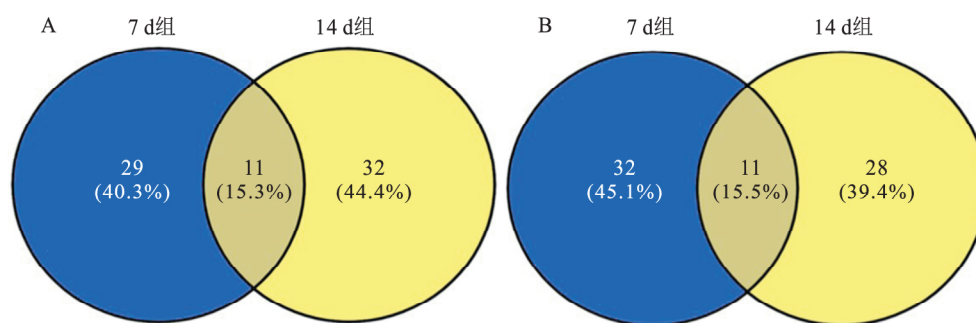


图5 7 d组和14 d组的一致性差异基因

A: 两组阴性筛选基因的一致性分析; B: 两组阳性筛选基因的一致性分析

酸蛋白激酶通路的异常活跃也是许多肿瘤和增殖性疾病的诱发原因^[5]。Reprimo(*RPRM*)是一个受*p53*调控激活继而参与调控细胞周期的抑癌基因,在阴性筛选中*RPRM*基因得到显著富集,佐证了筛选结果的可靠性^[6]。

阳性筛选基因中的蛋白编码基因在生物进程中较为分散,多数富集定位于炎症反应的调节、NK细胞的趋化性、中性粒细胞脱颗粒及血液循环等生物学过程,这些过程虽不直接影响细胞增殖,但在肿瘤发生发展中至关重要^[7]。据报道,近20%的癌症与感染、接触刺激物或自身免疫疾病引起的慢性炎症有关。肿瘤的免疫细胞浸润具有双重作用:抑制肿瘤细胞增殖,或者通过抑制保护性免疫反应促进肿瘤细胞增殖。因此,肿瘤炎症微环境的组成在影响肿瘤发生发展方面至关重要。肿瘤是一个动态的生态系统,由肿瘤细胞、宿主间质细胞之间各种相互作用控制,这些细胞群依赖于肿瘤内部和周围血液循环提供的营养和生长因子,进而促进肿瘤细胞增殖^[8]。

本研究所用的文库既包含蛋白编码基因也包含lncRNA基因,筛选获得的基因中除了对其机制有过文献报道的编码基因,还有一部分是未经注释的非编码基因。通过统一分析7 d组和14 d组数据,共获得11个阴性筛选基因和11个阳性筛选基因。

在11个阴性筛选基因中,lncRNA-OLMALINC与少突胶质细胞成熟相关^[9],在肿瘤中的作用未见报道。另外5个lncRNA基因目前未见文献报道,它们与胃癌细胞增殖的关系及作用机制需进一步研究。有研究^[10-13]报道,另外5个编码基因,免疫抑制剂FK506结合蛋白编码基因(*FKBP10*)、ADP/ATP转运载体编码基因(*SLC25A4*)、Kruppel样因子4(*KLF4*)、Tenascin-X蛋白编码基因(*TNXB*)及

*RPRM*与肿瘤的发生发展有一定关系,它们在胃癌发生发展过程中的具体作用机制还需深入研究。

阳性筛选的差异基因中有3个蛋白编码基因和8个lncRNA基因,lncRNA基因*KCNMA1-AS1*过表达,可上调抗凋亡基因*Bcl-2L*表达,从而抑制细胞凋亡^[14]。胃癌细胞中*DLX6-AS1*通过结合miR-204-5p上调八聚体结合转录因子1(*OCT1*)的表达,发挥致癌作用^[15]。而*PURPL*则通过靶向miR-137,促进原癌基因*ZBTB7A*的表达,进而促进胃癌的发生发展^[16]。蛋白编码基因*NCAPG2*作为黏蛋白II复合物的一个组成成分,有助于细胞的有丝分裂,其对于肝癌、肺腺癌等均具有致癌效应^[17],但在胃癌中的机制没有明确研究报道。筛选获得的这些基因功能与以上文献报道一致,进一步证实了筛选结果的可靠性。其它未有文献报道的阳性筛选基因在胃癌细胞中的功能则还需后续分析研究。

综上所述,该研究利用CRISPR/dCas9-SAM系统与高通量测序技术相结合,对胃癌差异表达的蛋白编码基因及lncRNA基因与胃癌细胞增殖的关系进行了全面筛选,获得了一批可能参与胃癌细胞增殖调控的蛋白编码基因及lncRNA基因,深入研究这些基因与胃癌细胞增殖及胃癌发生发展的关系,为深入揭示胃癌的发病机制提供新的线索。

参考文献

- [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: 209-49.
- [2] Schmitt A M, Chang H Y. Long noncoding RNAs in cancer pathways [J]. Cancer Cell, 2016, 29: 452-63.
- [3] Nidhi S, Anand U, Oleksak P, et al. Novel CRISPR-Cas systems: an updated review of the current achievements, applications, and future research perspectives [J]. Int J Mol Sci, 2021,

- 22:3327.
- [4] Barnaba N, LaRocque J R. Targeting cell cycle regulation *via* the G₂-M checkpoint for synthetic lethality in melanoma[J]. *Cell Cycle*, 2021, 20: 1041–51.
- [5] Derynck R, Turley S J, Akhurst R J. TGFbeta biology in cancer progression and immunotherapy[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18: 9–34.
- [6] Xu M, Knox A. J, Michaelis K A, et al. *Reprimo* (*RPRM*) is a novel tumor suppressor in pituitary tumors and regulates survival, proliferation, and tumorigenicity[J]. *Endocrinology*, 2012, 153: 2963–73.
- [7] Crusz S M, Balkwill F R. Inflammation and cancer: advances and new agents[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2015, 12: 584–96.
- [8] Gillies R J, Brown J S, Anderson A R A, et al. Eco-evolutionary causes and consequences of temporal changes in intratumoural blood flow[J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18: 576–85.
- [9] Mills J D, Kavanagh T, Kim W S, et al. High expression of long intervening non-coding RNA OLMALINC in the human cortical white matter is associated with regulation of oligodendrocyte maturation[J]. *Mol Brain*, 2015, 8: 2.
- [10] Liang L, Zhao K, Zhu J H, et al. Comprehensive evaluation of FKBP10 expression and its prognostic potential in gastric cancer[J]. *Oncol Rep*, 2019, 42: 615–28.
- [11] Zhang D, Li Y, Wang R, et al. Inhibition of REST suppresses proliferation and migration in glioblastoma cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17: 664.
- [12] Ganguly K, Krishn S R, Rachagani S, et al. Secretory mucin 5AC promotes neoplastic progression by augmenting KLF4-Mediated pancreatic cancer cell stemness[J]. *Cancer Res*, 2021, 81: 91–102.
- [13] Yang N, Tian J, Wang X, et al. A functional variant in TNXB promoter associates with the risk of esophageal squamous-cell carcinoma[J]. *Mol Carcinog*, 2020, 59: 439–46.
- [14] Ma S Y, Wei P, Qu F. KCNMA1-AS1 attenuates apoptosis of epithelial ovarian cancer cells and serves as a risk factor for poor prognosis of epithelial ovarian cancer[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23: 4629–41.
- [15] Liang Y, Zhang C D, Zhang C, et al. DLX6-AS1/miR-204-5p/OCT1 positive feedback loop promotes tumor progression and epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer[J]. *Gastric Cancer*, 2020, 23: 212–27.
- [16] Cheng Z, Hong J, Tang N, et al. Long non-coding RNA p53 up-regulated regulator of p53 levels (*PURPL*) promotes the development of gastric cancer[J]. *Bioengineered*, 2022, 13: 1359–76.
- [17] Meng F, Zhang S, Song R, et al. NCAPG2 overexpression promotes hepatocellular carcinoma proliferation and metastasis through activating the STAT3 and NF-kappaB/miR-188-3p pathways[J]. *EBioMedicine*, 2019, 44: 237–49.

Screening of genes related to proliferation of gastric cancer cells based on CRISPR/dCas9-SAM system

Peng Yu^{1,2}, Gong Qifan², Tai Fumin², Wang Tiantian², Ge Changhui², Zheng Xiaofei², Qin Yide¹, Fu Hanjiang^{1,2}
 (¹*School of Basic Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032*; ²*Beijing Key Laboratory for Radiobiology, Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850*)

Abstract Objective The CRISPR/dCas9-SAM system was used to explore genes related to the proliferation of gastric cancer cells AGS, and their role in the occurrence and development of gastric cancer was analyzed. **Methods** sgRNA was designed for genes with differential expression between gastric cancer and normal gastric tissue, and a lentiviral library was obtained after packaging was constructed. The AGS cells at different time points after the library was infected with AGS cells were used as the screening pressure, and the AGS cells at three time points on days 0, 7 and 14 were collected. High-throughput sequencing analyzed sgRNA enrichment in AGS cells at different time points after infection to obtain differential genes related to AGS cell proliferation. **Results** Bioinformatics showed that compared with the 0 d group, 42 and 45 negative screening differential genes and 59 and 40 positive screening differential genes were obtained in the 7 d group and 14 d group, respectively. Among them, the 7 d group and the 14 d group had 11 genes in the negative screening and the positive screening. **Conclusion** In this study, 11 genes inhibiting the proliferation of AGS cells were screened, of which 5 were protein-coding genes and 6 were long non-coding RNA (lncRNA) genes. 11 candidate genes that promoted AGS cell proliferation were screened, of which 3 were protein-coding genes and 8 were lncRNA genes. It laid a foundation for further functional verification and comprehensive analysis of the occurrence and development process of gastric cancer.

Key words CRISPR/dCas9-SAM system; cell proliferation; gastric carcinoma; long non-coding RNA