

网络出版时间:2024-12-05 13:50:02 网络出版地址:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.12.006

基于 AAV6-CRISPR-Cas9 系统抑制 *NBR1* 表达 对肺癌小鼠肿瘤免疫调控的影响

王博康¹, 朱名扬¹, 张秀森², 孙江涛^{2,3,4}¹河南科技大学临床医学院, 洛阳 471000; ²河南省肿瘤表现遗传重点实验室, 洛阳 471000;³河南科技大学肿瘤研究所, 洛阳 471000;⁴河南科技大学第一附属医院肿瘤医院胸部肿瘤外科, 洛阳 471000)

摘要 目的 以腺相关病毒(AAV)为载体,利用 CRISPR-Cas9 系统靶向抑制 *BRCA1* 邻近基因 1(*NBR1*)表达,建立 *NBR1* 基因敲除的肺癌小鼠模型,并探究其对肿瘤生长和免疫细胞浸润及功能活性的影响。方法 利用在线网站 CRISPOR(<http://crispor.tefor.net/crispor.py>)进行靶向鼠源 *NBR1* 基因(Gene ID: 17966)的 sgRNAs 设计。使用 AAV6 作为 sgRNAs 的载体,使用 PCR 和 DNA 测序的方法确认重组病毒载体是否构建成功及确定基因敲除效率。为了确定小鼠体内最佳的 AAV 侵染方式,将 6 只 C57BL/6J 小鼠随机分为滴鼻组和气管内注射组,侵染 28 天后,通过观察小鼠肺部组织冰冻切片的增强型绿色荧光蛋白表达情况,选择更有效的侵染方式进行后续实验。通过 HE 染色、免疫组化、组织免疫荧光和流式细胞术等方法检测小鼠肺部肿瘤生长情况以及肿瘤组织免疫细胞浸润和激活状态。结果 DNA 测序及荧光显微镜观察显示,AAV6-U6-sg*NBR1*-CAG-Cre-GFP 病毒载体构建成功,且敲除效率稳定。荧光显微镜观察显示气管内给药法小鼠肺部感染病毒的效率较高($P < 0.05$)。HE 染色结果显示靶向敲除 *NBR1* 后小鼠肺部肿瘤面积较对照组减少($P < 0.01$)。组织免疫荧光及流式细胞术结果显示,靶向敲除 *NBR1* 的肺癌小鼠肿瘤组织中 $CD8^+$ T 淋巴细胞功能活性较对照组增强,表现为效应型 T 淋巴细胞增多,耗竭型 T 淋巴细胞减少($P < 0.01$)。结论 通过 CRISPR/Cas9 技术成功构建了靶向 *NBR1* 基因敲除的肺癌小鼠模型,验证了靶向抑制 *NBR1* 表达可明显增强肺组织 $CD8^+$ T 淋巴细胞功能活性,使肿瘤生长受到抑制,减轻肿瘤负荷,延长肺癌小鼠生存期。为后续研究 *NBR1* 及其他基因在肺腺癌细胞中的作用机制和功能奠定了实验基础。

关键词 肺腺癌; AAV6; CRISPR/Cas9; *NBR1*; 基因编辑; 免疫治疗

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)12-2103-09

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.12.006

肺癌是全世界范围内发病率和死亡率均最高的恶性肿瘤^[1],肺腺癌作为非小细胞肺癌中最常见的病理类型,近年来的发病率持续上升,大部分患者在就诊时已是中晚期^[2]。CRISPR/Cas9 系统是一种高效的基因编辑工具,其发挥作用主要依赖于 Cas9 蛋白和向导 RNA (sgRNA) 的复合物^[3]。sgRNA 能够特异性地靶向识别 DNA 序列,利用 Cas9 蛋白对目标 DNA 进行切割,从而实现基因敲除、基因插入等基因编辑操作^[4]。腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)作为一种非免疫原性的病毒载体,可以减轻载体存在免疫原性、基因组整合等风险,同时具

有高效、持久的基因转染能力^[5]。不同血清型 AAV 对组织和细胞的感染效果具有差异性,这为组织器官的靶向治疗提供基础^[6]。其中,AAV6 嵌合载体已被证明可以有效感染肺腺泡上皮细胞^[7]引发肺腺癌。

作为一种自噬受体,*BRCA1* 邻近基因 1 (Neighbor of *BRCA1* gene 1, *NBR1*) 所编码的蛋白质分子能够识别和结合特定的货物分子,并介导它们进入自噬体进行降解^[8]。已有研究^[9]表明,*NBR1* 分子可通过自噬途径促进主要组织相容性复合体 1 (major histocompatibility complex class I, MHC I) 运输至溶酶体降解,使抗原呈递功能受阻,导致 $CD8^+$ T 细胞识别和杀伤肿瘤细胞功能障碍,从而促进免疫逃逸的发生,验证了 *NBR1* 在肿瘤免疫调控中的潜在作用。然而如何有效地调节这一途径来预防肿瘤免疫逃逸的发生尚不清楚,由此,该研究拟通过建立 *NBR1* 特异性敲除肺癌小鼠模型,通过一系列实验,探讨 *NBR1* 在肺癌发生发展以及肿瘤免疫微环境中

2024-11-18 接收

基金项目:河南省重点研发与推广专项(科技攻关)项目(编号:242102310155)

作者简介:王博康,男,硕士研究生;

孙江涛,男,博士,主任医师,硕士生导师,通信作者, E-mail: sunjtdoctor@126.com

的作用,以期肺癌免疫治疗药物的开发提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 腺相关病毒载体 AAV6-CAG-EGFP、AAV6-U6-Cre-CAG-EGFP、AAV6-U6-Cre-CAG-sgRNA(NBR1)-EGFP、目的质粒 Lenti RV2-mRNA-sgRNA、包装质粒 SL3-pMD2.G、psPAX2、GFP 荧光蛋白质粒、人胚肾 HEK293T 细胞、小鼠肝实质细胞系 AML12 细胞(均购自苏州赛业生物科技有限公司);DMEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶均购自美国 Gibco 公司(货号:11965092、SA210407、25200056);免疫组织化学试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司(货号:PV-9000);柠檬酸钠抗原修复液、DAB 显色试剂盒及 PBS 购自北京 Solarbio 公司(货号:C1032、DA1010、P1010);Anti-NBR1 抗体(货号 ab55474)、重组 Anti-CD8 alpha 抗体(货号:ab237709)购自英国 Abcam 公司;PerCP-CY5.5 CD3 抗体(货号:560835)、PE-Granzyme B 抗体(货号:396405)、RB670 Rat Anti-Mouse CD8a(货号:571948)购自美国 BD Biosciences 公司;FITC-Ki67 Monoclonal Antibody(货号:2191034)、PE-Perforin Monoclonal Antibody(货号:2359210)、PE-IFN gamma Monoclonal Antibody(货号:12-7319-42)购自美国 Invitrogen 公司。

1.1.2 实验动物 4 周龄 C57BL/6J 背景品系的 *Rosa-Cas9* 基因敲入小鼠、*Rosa26^{LSL-tdTomato}* 小鼠以及 *EGFR^{LS58-LSL-tdTomato}-Cas9* 小鼠各 8 只,体质量 15 g 左右,均购自赛业百沐生物科技有限公司,以上小鼠均在无特定病原体环境下饲养并进行实验研究(实验动物伦理审批号:GACU23-SY331)。

1.1.3 主要仪器 37 °C、5% 恒温 CO₂ 培养箱(日本 SANYO 公司,型号:MCO-15AC),超净工作台(苏州净化设备公司,型号:SW-CJ-2D),流式细胞仪(美国 Cytek 公司,型号:NL-CLC V16 B14 R8),荧光显微镜(美国 Lumencor 公司,型号:Sola 80-10393),组织切片扫描仪(匈牙利 3DHIESTECH 公司,型号:Pannoramic MIDI),凝胶成像分析仪(Bio-Rad 公司,型号:ChemiDoc XRS+),倒置显微镜(日本 Nikon 公司,型号:ECLIPSE Ni-E)。

1.2 方法

1.2.1 设计靶向 NBR1 基因的 sgRNA 引物 利用在线网站 CRISPOR(<http://crispor.tefor.net/crisp->

[or.py](http://crispor.tefor.net/crisp-or.py))进行针对鼠源 NBR1 基因(Gene ID:17966)的 sgRNA 设计。本研究一共设计了 3 条 NBR1-sgRNA 序列,命名为 NBR1-sgRNA1、NBR1-sgRNA2 和 NBR1-sgRNA3。进一步将这 3 条 sgRNA 序列分别构建至 RV2 慢病毒表达载体,分别命名为 Lenti RV2-m-NBR1-sgRNA1、Lenti RV2-m-NBR1-sgRNA2 和 Lenti RV2-m-NBR1-sgRNA3。

1.2.2 慢病毒的包装及纯化 将 HEK293T 细胞按照 120 万/孔种至 2 个 6 孔板,共计 12 孔,保证转染前 6 孔板中细胞生长密度约为 90%。对于每孔细胞,使用 100 μl Opti-MEM 稀释 10 μg (1 μg/cm²) 目的 DNA (psPAX2 3.5 μg, SL3-pMD2.G 1.5 μg, 表达质粒 5 μg),并加入 30 μl PEI 转染试剂,轻轻混匀,在室温下孵育 15 min,使其形成 DNA-PEI 阳离子核酸转染试剂复合物以备转染。转染时,先移除培养皿中的细胞生长培养基,每孔加入 2 ml 新鲜预热的完全培养基。随后直接将 160 μl DNA-PEI 复合物滴加至细胞培养皿中并轻轻晃动,将培养皿放置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中继续培养。

1.2.3 慢病毒感染 AML12 并验证 sgRNA 的敲除效率 转染后 48 h 收获含病毒的上清液,3 000 r/min 离心 5 min,去除细胞沉淀,并用含病毒的液体 600 μl/60 μl(2 个稀释度)感染提前 1 d 种板至 12 孔培养板的 AML12 细胞(20 万细胞/孔),6~8 h 后去除含病毒的液体,加入完全培养基,72 h 后在荧光显微镜下观察荧光表达情况。提取细胞基因组 DNA,使用 PCR 扩增技术验证 sgRNA 的敲除效率,并选择切割效率最高的 1 条 sgRNA 进行后续实验。

1.2.4 病毒侵染方式摸索试验 根据给药方式的不同,采用随机数字表法将 6 只 C57BL/6J 小鼠随机分为滴鼻组($n=3$)和气管内注射($n=3$),使用 AAV 侵染 28 d,取小鼠肺组织制作冰冻切片,观察增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)表达情况,以确定 AAV 侵染的最佳方式。给药信息:AAV6-CMV-EGFP,50 μl/鼠。滴鼻组:麻醉小鼠后将其绑定在硬纸板上,使纸板倾斜 45°,用枪头单次 5 μl 单侧鼻孔滴入 AAV6-CMV-EGFP 悬液,让小鼠自行缓慢吸入,如此左右侧鼻孔循环给药,每次中间间隔 5~10 min,重复此操作至 50 μl AAV 悬液全部滴完。结束后使小鼠保持上述姿势约 5 min,以便 AAV 悬液充分进入下呼吸道。气管插管组:麻醉小鼠后将其绑定在硬纸板上以进行气管插管,插管后拔出硬针,留下软管,并确认插管成功。将小鼠倾斜 45°,胰岛素注射器先抽取 0.1

ml 空气,再抽取 50 μ l 病毒,正常速度沿软管推注进气管,左右晃动小鼠,保持直立 10 min,保证病毒充分浸润肺部,将头部和胸部用折叠的纸巾小幅度垫高,以保证小鼠呼吸顺畅。

1.2.5 NBR1 特异性敲除小鼠模型构建 首先将 ROSA26-Cas9 小鼠与 EGFR^{L858R-LSL-tdTomato} 小鼠进行杂交,产生 EGFR^{L858R-LSL-tdTomato}-Cas9 小鼠。这些小鼠是可育的,产仔数正常,没有形态异常,且后代是有活性的,并且在全身可观察到 Cas9 的表达。该小鼠在注射 AAV-U6->sgRNA (NBR1)-CAG-Cre-GFP 病毒后,病毒所携带的 Cre 与小鼠 EGFR^{L858} 位点的 flox 结合,可自发形成 EGFR 突变的肺腺癌并同时启动 tdTomato 基因表达,在荧光显微镜下可观察到 tdTomato 蛋白红色荧光信号及 GFP 蛋白绿色荧光信号,同时 sgRNA 与 Cas9 蛋白相互作用靶向敲除肺组织中 NBR1 基因,阻止 NBR1 基因的表达。将 EGFR^{L858R-LSL-tdTomato}-Cas9 转基因小鼠的乳鼠随机分为对照组(注射 AAV-CAG-Cre-GFP, $n = 8$)和实验组[注射 AAV-U6->sgRNA (NBR1)-CAG-Cre-GFP, $n = 8$]。将纯化后的腺相关病毒以 5×10^{11} μ g/鼠的剂量给予小鼠气管内注射,分别在 3 个月和 6 个月后将两组小鼠的肺组织进行肉眼观察,并进行 HE 染色计算肿瘤面积。

1.2.6 免疫组化检测 以 1:200 的比例稀释 Anti-NBR1 antibody,在 63 倍放大条件下观察染色结果。多重免疫荧光化学染色法观察 CD8 与颗粒酶 B(Granzyme B)、穿孔素(Perforin)、干扰素- γ (Interferon- γ , IFN- γ)及增殖标记蛋白(Ki-67)共定位情况。常规步骤包括组织切片、石蜡溶解、二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化、抗原高温高压修复、内源性过氧化物酶阻断、滴加 5% BSA 封闭后滴加一抗 CD8 与 Granzyme B、Perforin、IFN- γ 及 Ki-67 (1:200) 50 μ l,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜、PBS 充分冲洗后滴加荧光二抗山羊抗鼠荧光二抗 488 (5 μ g/ml, 1:200) 50 μ l、室温孵育 1 h、滴加 DAPI、室温避光孵育 20 min 后抗荧光淬灭封片剂封片 4 $^{\circ}$ C 避光保存、最后用芯片扫描仪扫描后观察。

1.2.7 流式细胞学检测 消化并提取小鼠肺部肿瘤组织细胞,PBS 洗涤 2 遍,1 000 r/min 离心 5 min 去上清液,最后使用 200 μ l PBS 重悬细胞转移至流式管,一抗 CD3-PerCP-CY5.5、CD8-BV605、Perforin-PE、Gzmb-PE、IFN- γ -PE、Ki67-FITC 染色,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,加 300 μ l PBS 洗涤未结合染料,1 000 r/min 离心 5 min 去上清液后加入 300 μ l PBS 重悬

细胞上机检测。

1.3 统计学处理 本研究中的所有统计学分析均使用 GraphPad Prism9.0 软件进行。所有实验均至少进行了 3 次。实验数据采用平均值 \pm 标准差表示。两组组间的比较使用 t 检验,多组间的比较则采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 sgRNA 序列 构建至病毒载体的靶向 NBR1 基因的 sgRNA 序列见表 1;sgRNA 基因组 DNA 扩增引物序列见表 2。

表 1 sgRNA 序列

Tab. 1 sgRNA primer sequence

sgRNA	Sequence (5'→3')
sgRNA1	ATCAGACATGAAGACCACAG
sgRNA2	ACTGCAGCAAGCTCTCAGGT
sgRNA3	ACTGAGTGTGGCATAACTG

表 2 sgRNA 基因组 DNA 扩增引物

Tab. 2 sgRNA genomic DNA amplification primers

Primer	Sequence (5'→3')
NBR1-sgRNA1-F	AAATCAGCTACAGATGCAAGTCC
NBR1-sgRNA1-R	GTGCAACAGAGCCCTTTTCT
NBR1-sgRNA2-F	TTGACATGATTGCAGTGCCAAA
NBR1-sgRNA2-R	TCCTGAACCAGCTTGGGAAGAC
NBR1-sgRNA3-F	TCACCCTTTAGGCAGCGTAT
NBR1-sgRNA3-R	AGTGGGAAGTGTATGTCCCC

F: Forward primer; R: Reverse primer.

2.2 重组质粒构建及基因编辑效率分析

2.2.1 免疫荧光检测结果 质粒转染 HEK293T 细胞 48 h 后采用荧光显微镜观察 GFP 表达情况,发现 GFP 荧光阳性信号,提示质粒转染成功(图 1A)。将含有病毒的上清液分别以 60 μ l 或 600 μ l 加入感染鼠源细胞系 AML12,同时加入 1 μ g/ml 的嘌呤霉素筛选稳定感染了病毒的目的细胞。荧光显微镜观察显示,在 72 h 后,目的细胞已成功感染了病毒(图 1B)。

2.2.2 NBR1 基因编辑效果确认 为了确认在所设计的 3 条 sgRNA 中,哪条 sgRNA 能对 NBR1 基因编辑效果更好,在利用不同病毒感染细胞后,对这些细胞的基因组 DNA 进行了提取以及 PCR 扩增,并对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳(图 2),所在片段对引物片段大小与目的基因接近,如预期,提示扩增成功。

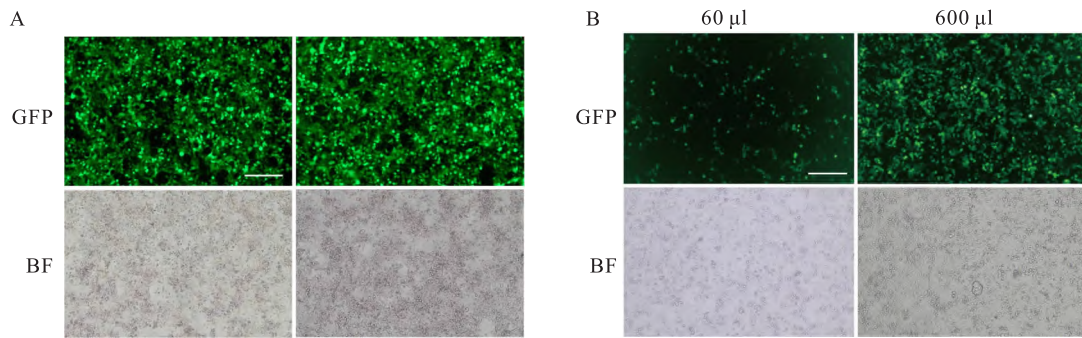


图1 免疫荧光检测结果

Fig. 1 Immunofluorescence detection results

A: GFP fluorescent protein expression and bright field in 293T cells 48 hours after plasmid transfection $\times 40$; B: The results of infecting AML12 cells with virus at different concentrations after 72 hours $\times 40$. At this time, the cells were passaged (1:4), and 1 mg/L puromycin was added to screen the cells.

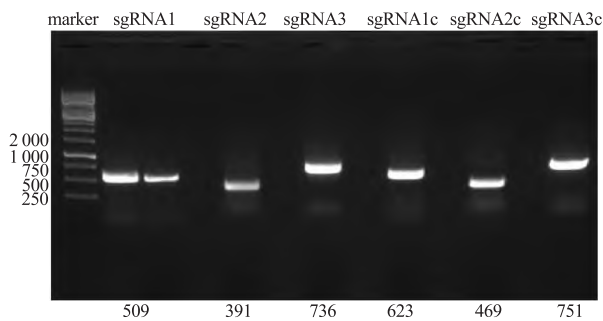


图2 PCR产物的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis results of PCR products

重组质粒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条sgRNA(sgRNA1、sgRNA2、sgRNA3)序列一致,靶向NBR1基因的sgRNA序列成功插入载体,证明重组质粒构建成功。此外,还对PCR产物进行了DNA测序分析,以检测不同sgRNA的敲除效率,结果显示sgRNA2效果最好,敲除效率最高,达61.7%(图3)。

2.3 小鼠体内验证 AAV 病毒转导效率 为了探索更高效的病毒侵染方式,将AAV6-CMV-EGFP分别以气管内注射给药和滴鼻给药侵染28 d后,采用荧光显微镜观察EGFP表达情况。结果显示气管内注射组小鼠肺组织表达EGFP程度明显高于滴鼻组($t = 6.182, P < 0.01$),见图4,提示气管内注射给药是

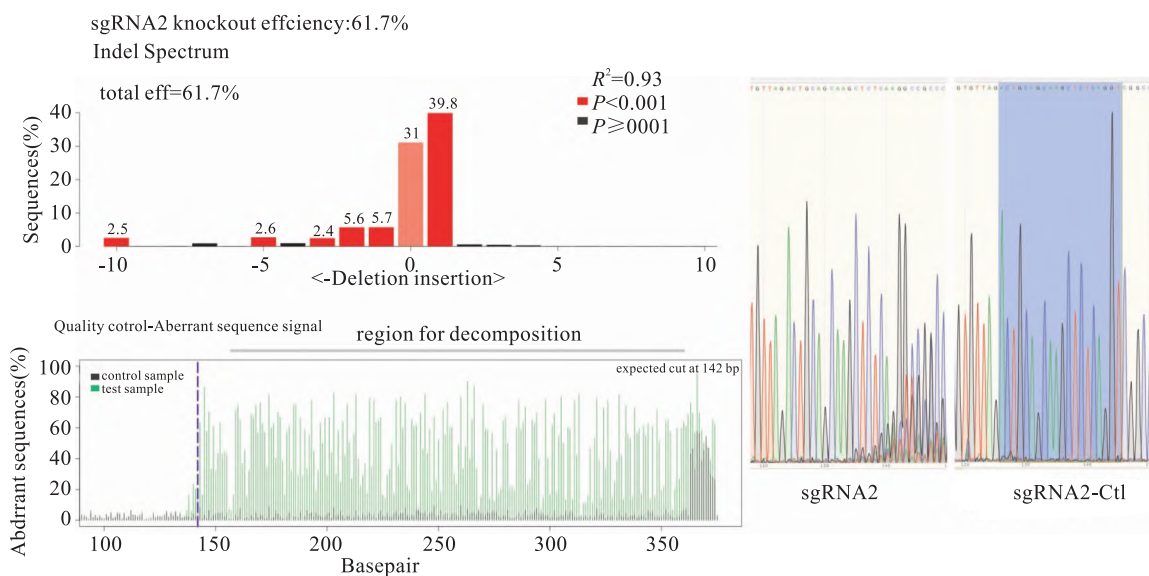


图3 基因敲除表达载体的鉴定及sgRNA测序结果与原基因序列比对分析

Fig. 3 Identification of gene knockout expression vector and comparative analysis of sgRNA sequencing results with the original gene sequence

更高效的病毒侵染方式,因此后续采用气管内注射给药的方式进行实验。

2.4 *NBR1* 基因特异性敲除肺癌小鼠模型成功构建

在病毒感染 28 d 后取 AAV-sg*NBR1* 组和 AAV-Ctl 组小鼠肺组织进行组织免疫荧光检测,发现在两组小鼠的肺组织中均可观察到红色以及绿色荧光信号(图 5),提示 AAV 病毒成功感染小鼠肺组织。

2.5 *NBR1* 基因敲除小鼠的肺癌生长受到抑制

小鼠在 AAV 病毒感染后均在无其他干扰环境下饲养,3 个月后采取随机的方法每组分别取 4 只小鼠进行解剖,分离肺组织。肉眼可见,与对照组相比,*NBR1* 敲除组小鼠的肺组织表面的肿瘤结节面积相对较小。其余小鼠继续饲养至第 6 个月,结果显示 *NBR1* 敲除组小鼠肿瘤生长明显减慢(图 6)。这些结果提示 *NBR1* 敲除可抑制小鼠肺部肿瘤组织生长。对肺组织进行 HE 染色的结果也显示,在感染 AAV 病毒 3 个月和 6 个月时,*NBR1* 敲除组小鼠肿瘤面积占比低于对照组(图 6)。

2.6 免疫组化检测结果 为了确定 *NBR1* 分子的表达是否被抑制,对小鼠的肺癌组织及癌旁组织进行了 *NBR1* 免疫组化检测。结果显示,与对照组相比,*NBR1* 敲除组的 *NBR1* 表达量下降(图 7A),且两组小鼠肿瘤组织中 *NBR1* 表达量明显高于癌旁组织($t = 15.13, 12.61$, 均 $P < 0.01$),见图 7B、7C,这提示 *NBR1* 与肺癌进展存在相关性。

2.7 靶向敲除 *NBR1* 可促进 $CD8^+$ T 淋巴细胞功能活性 为了探究靶向敲除 *NBR1* 对 $CD8^+$ T 淋巴细胞功能活性的影响,利用组织免疫荧光的方法对小鼠肺肿瘤组织进行了 CD8、Granzyme B、Perforin、IFN- γ 及 Ki-67 表达检测。结果显示(图 8),与对照组小鼠的肿瘤组织相比,*NBR1* 敲除组肿瘤组织中 $CD8^+$ T 细胞表面 Granzyme B、Perforin、IFN- γ 及 Ki-67 表达量增加($t = 4.66, 8.37, 8.22, 11.73$, 均 $P < 0.01$),提示 *NBR1* 敲除可增强肿瘤组织中 $CD8^+$ T 细胞功能活性。

2.8 靶向敲除 *NBR1* 可促进 T 淋巴细胞由干性向

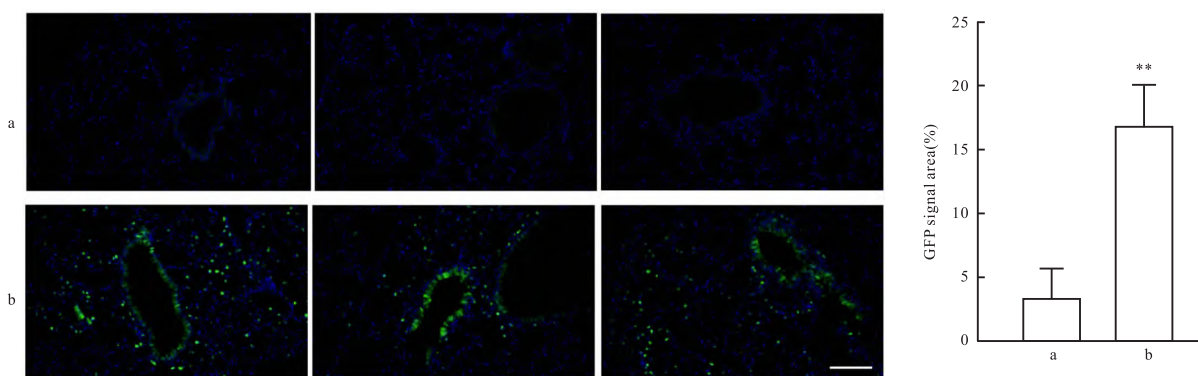


图 4 组织免疫荧光检测 AAV6-EGFP 侵染 28 d 后在小鼠肺组织中的表达情况 $\times 40$

Fig. 4 Immunofluorescence detection of AAV6-CMV-EGFP expression in mouse lung tissue 28 days after infection $\times 40$
a; intranasal administration group; b; intratracheal intubation administration group; ** $P < 0.01$ vs intranasal administration group.

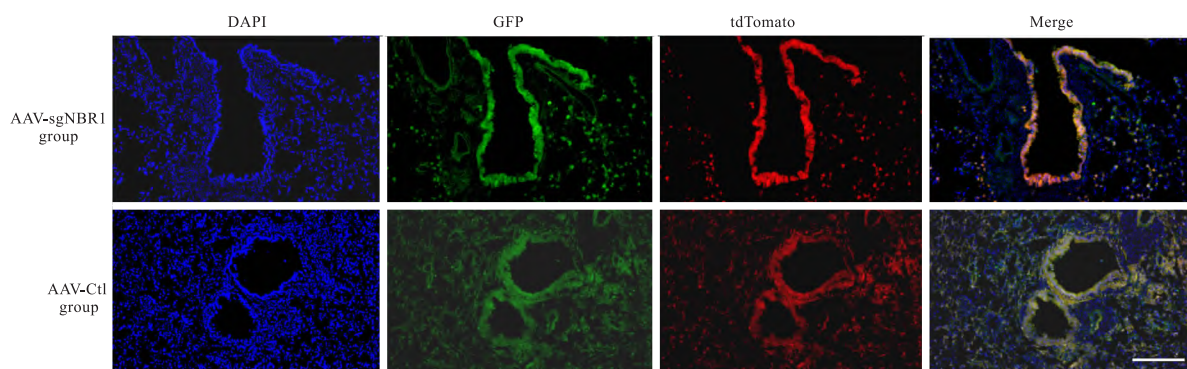


图 5 免疫荧光显示两组小鼠肺组织均存在 GFP 及 tdTomato 蛋白的表达 ($\times 40$, scale bar = 20 μm)

Fig. 5 Immunofluorescence showed the expression of GFP and tdTomato proteins in both the experimental and control groups ($\times 40$, scale bar = 20 μm)

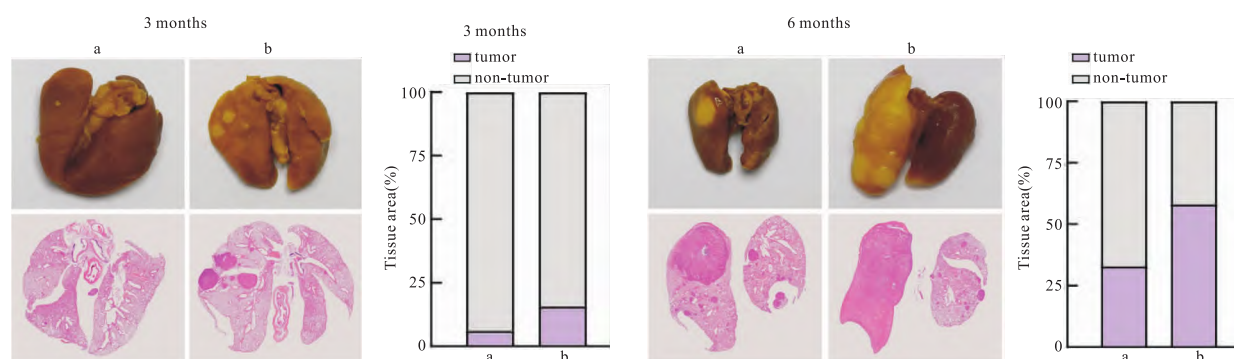


图6 NBR1 敲除组与对照组分别在3个月与6个月时肺部肿瘤生长情况及 HE 染色结果

Fig. 6 Lung tumor growth and HE staining in the *NBR1* knockout group and control group at 3 months and 6 months

a: *NBR1* knockout group; b: control group.

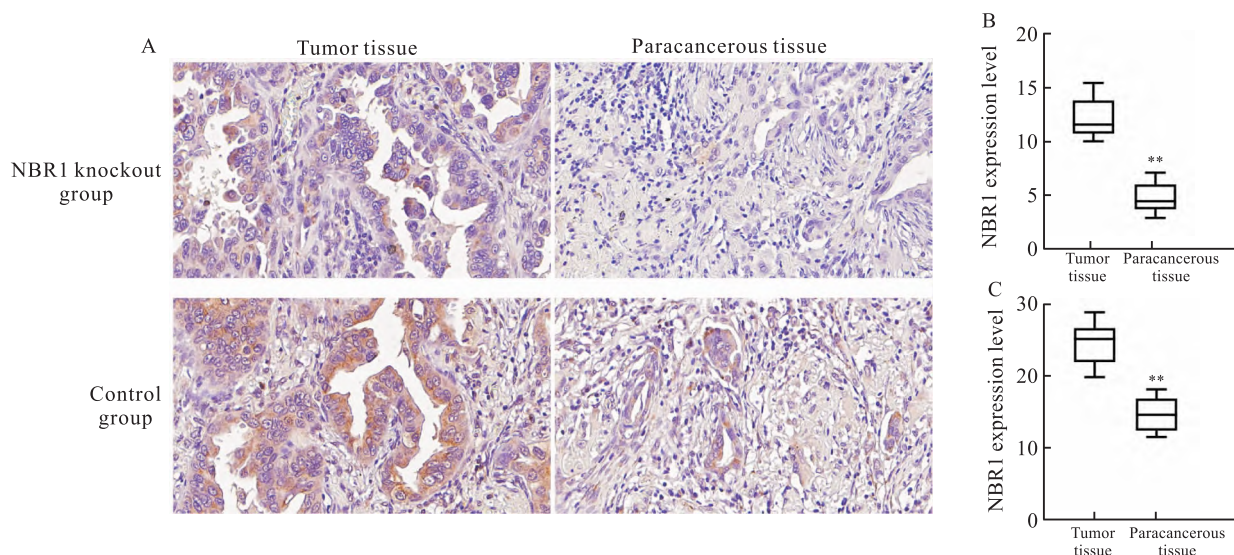


图7 免疫组化检测 NBR1 表达水平情况 ×63

Fig. 7 Immunohistochemical detection of *NBR1* expression levels ×63

A: Immunohistochemical detection of *NBR1* expression levels in two groups of mice; B: The analysis of *NBR1* expression levels in *NBR1* knockout group; C: The analysis of *NBR1* expression levels in control group; ** $P < 0.01$ vs tumor tissue.

效应型转化增多,向耗竭型减少 为了进一步分析两组小鼠肿瘤组织中 $CD8^+T$ 细胞表型的变化,采用流式细胞术检测了 $CD8^+T$ 细胞表面表达初始型 (Tcf1、Slnaf6)、效应型 (Cxc6、Cxc13) 以及耗竭型 (Pcd1、Tim-3) 表型分子的变化 (见图9)。结果显示,与对照组相比,*NBR1* 敲除组肿瘤组织中 $CD8^+T$ 细胞的 Tcf1 [(23.31 ± 2.16)% vs (41.95 ± 1.90)%]、Slnaf6 [(22.03 ± 2.03)% vs (37.31 ± 2.81)%] 分泌量明显降低 ($t = 10.18, 6.42, P = 0.002, 0.006$), Cxc6 [(42.01 ± 2.17)% vs (25.33 ± 2.24)%]、Cxc13 [(45.04 ± 2.94)% vs (24.54 ± 3.08)%] 分泌量明显增加 ($t = -5.47, -9.61, P$

$= 0.007, 0.003$), 而 Pcd1 [(15.31 ± 2.86)% vs (25.31 ± 1.92)%]、Tim-3 [(15.83 ± 1.98)% vs (32.61 ± 2.31)%] 分泌量明显降低 ($t = 4.89, 7.32, P = 0.004, 0.001$)。

3 讨论

NBR1 作为自噬受体,在选择性自噬中起着关键作用^[10]。它能够识别特定的底物,如泛素化的蛋白质,并通过与泛素化的自噬底物形成细胞内包裹物来启动自噬过程。一项在胰腺癌中的研究^[11]发现,*NBR1* 在胰腺癌细胞的免疫逃避中起重要作用,细胞毒性T细胞能通过其表面的 MHC I 识别表达

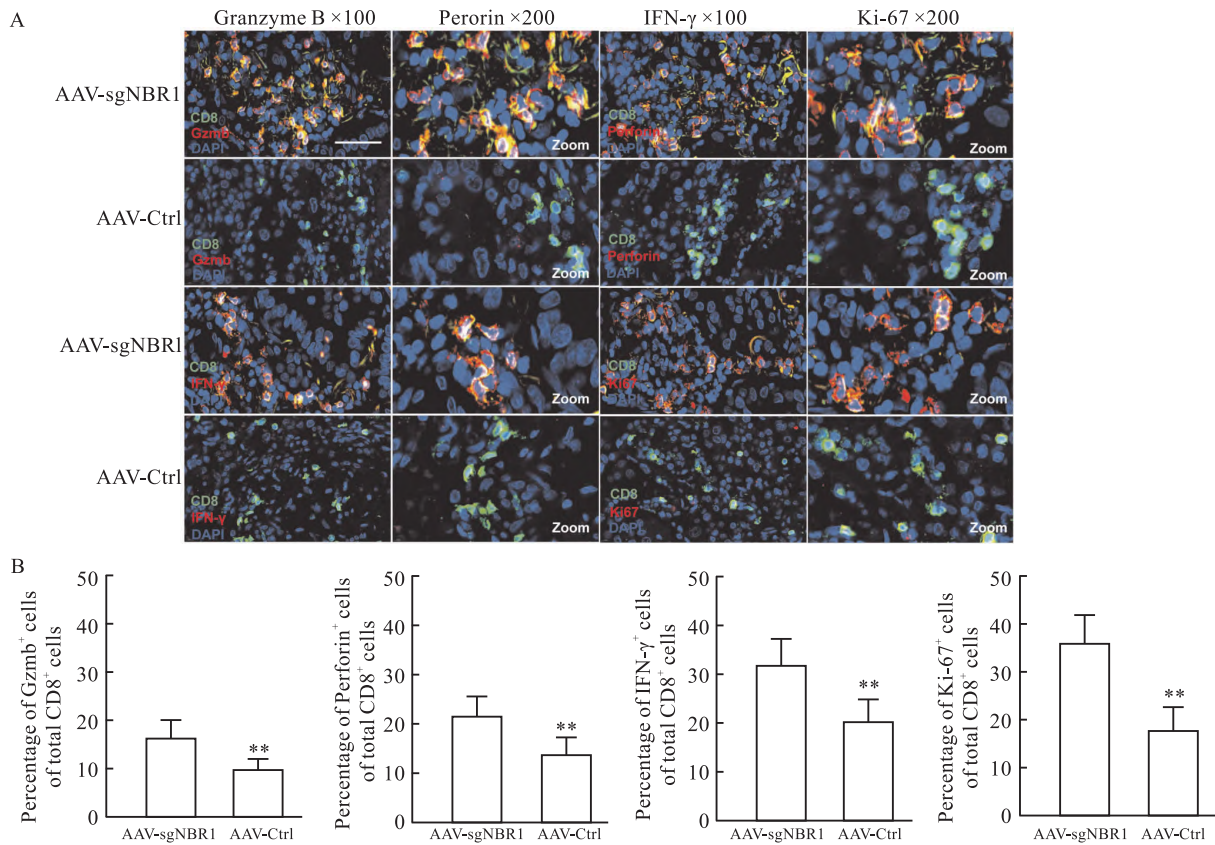


图8 组织免疫荧光检测 CD8⁺ T 细胞表面分子表达情况

Fig. 8 Expression of surface molecules in CD8⁺ T cells in different groups

A: Immunofluorescence detection of expression of Granzyme B, Perforin, IFN-γ and Ki-67; B: The analysis of expression of Granzyme B, Perforin, IFN-γ and Ki-67; ** $P < 0.01$ vs AAV-sgNBR1 group.

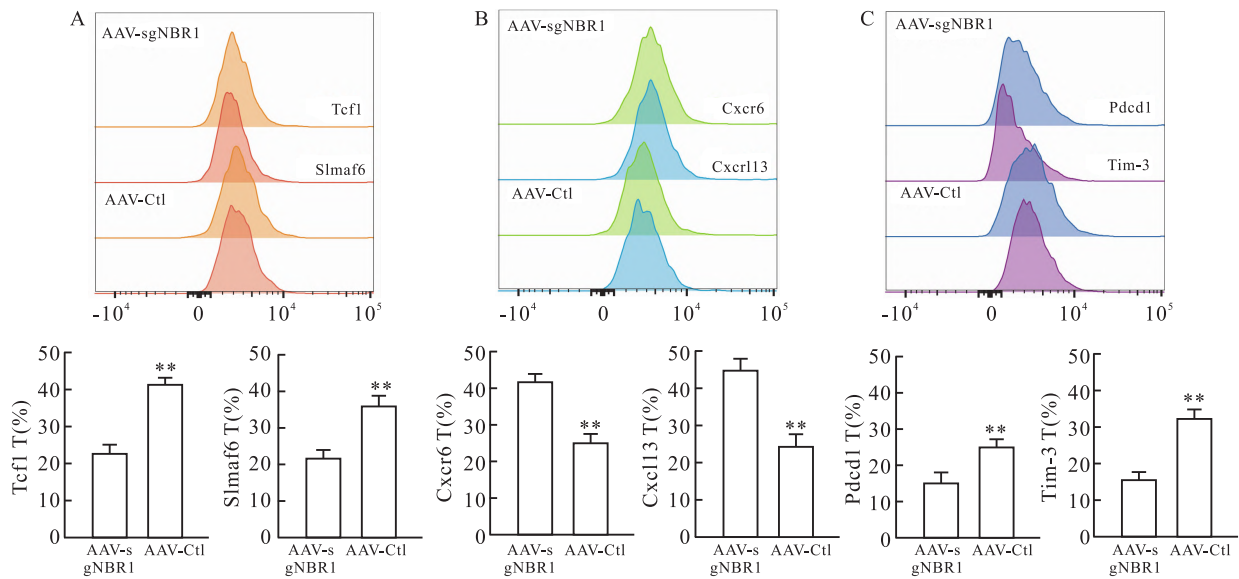


图9 流式细胞术检测 CD8⁺ T 细胞分子表型改变

Fig. 9 Flow cytometry detection of CD8⁺ T cell molecular phenotype changes

A: The expression of phenotypic molecules Tcf1 and Slma16 on the surface of CD8⁺ T cells; B: The expression of phenotypic molecules Cxcr6 and Cxcl13 on the surface of CD8⁺ T cells; C: The expression of phenotypic molecules Pcdcl1 and Tim-3 on the surface of CD8⁺ T cells; ** $P < 0.01$ vs AAV-sgNBR1 group.

肿瘤特异性抗原的癌细胞,许多肿瘤细胞通过突变或 MHC I 分子的丢失来逃避免疫系统的监视,从而发生免疫逃逸,促进肿瘤进展。另外,最近一项利用乳腺癌小鼠模型进行的研究^[12]表明,选择性自噬受体 NBR1 在自噬缺陷乳腺肿瘤细胞胞质中的表达积累能促进肿瘤细胞增殖,促使其侵袭性增强和转移性基底上皮分化。然而,NBR1 在乳腺癌中的作用及其具体机制尚未完全阐明,因此,构建 *NBR1* 基因敲除的肺癌小鼠模型,进一步探索 NBR1 对肺癌发生发展的影响,以及对 CD8⁺T 细胞免疫功能活性的影响,对于阐明 NBR1 在乳腺癌中的作用具有十分重要的意义。

作为一种强大的基因编辑工具,CRISPR/Cas9 技术以其高效、精准的特点,被广泛应用于癌症相关基因的功能探索、荷瘤动物模型的建立以及药物靶点的探测^[13],极大地增加了人们对癌症基因组学的认识。此外,先前已有研究^[14]通过 AAV 介导 CRISPR 系统成功靶向小鼠大脑中的单个基因或多个基因,并表征了基因组修饰对神经元的影响。传统的基因治疗通常使用病毒载体如慢病毒、逆转录病毒等,但这些载体存在免疫原性、基因组整合等风险^[15]。此外,与传统的基因敲除模型相比,Cas9-AAV 技术构建基因敲除模型的方法具有构建时间相对较短,成本较低的优点^[16],这为未来肺癌基因治疗研究提供了新的工具。然而,在本研究中,共设计了 3 个 sgRNA,但只有 sgRNA2 对 *NBR1* 的敲除效率较高,说明 CRISPR-Cas9 技术的基因编辑效率有待提高。此外,此项技术还存在的其他较为突出的问题有脱靶效应、脱氧核糖核酸损伤毒性和免疫毒性等^[17],随着技术的不断发展和完善,相信其在未来的肿瘤研究和治疗中将会发挥更加重要的作用。

本研究通过 CRISPR-Cas9 技术成功构建了靶向 *NBR1* 基因敲除的肺癌小鼠模型,验证了靶向抑制 *NBR1* 表达可增强肺组织 CD8⁺T 淋巴细胞功能活性,使肿瘤生长受到抑制,减轻肿瘤负荷,这些发现与之前关于 NBR1 在细胞自噬和肿瘤发展中的研究结果相一致,但本研究首次在体内模型中对这些发现进行了证实,为研究 *NBR1* 及其他基因在乳腺癌细胞中的作用机制和功能奠定了实验基础。然而,本研究也存在一定的局限性。例如,仅使用了有限数量的小鼠进行实验,这可能在一定程度上影响了结果的稳定性。此外,虽然已经观察到 *NBR1* 敲除对肺癌表型具有显著影响,但其具体的分子机制仍有待进一步阐明。未来的研究可以围绕这些问题展

开,更加全面地理解 NBR1 在肺癌发展中的作用,并为肺癌的治疗提供新的思路。

参考文献

- [1] Leiter A, Veluswamy R R, Wisnivesky J P. The global burden of lung cancer: current status and future trends[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2023, 20(9): 624 - 39. doi:10.1038/s41571-023-00798-3.
- [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 - 49. doi:10.3322/caac.21660.
- [3] Gupta D, Bhattacharjee O, Mandal D, et al. CRISPR-Cas9 system: a new-fangled dawn in gene editing[J]. Life Sci, 2019, 232: 116636. doi:10.1016/j.lfs.2019.116636.
- [4] Zhan T, Rindtorff N, Betge J, et al. CRISPR/Cas9 for cancer research and therapy[J]. Semin Cancer Biol, 2019, 55: 106 - 19. doi:10.1016/j.semcancer.2018.04.001.
- [5] Ronzitti G, Gross D A, Mingozzi F. Human immune responses to adeno-associated virus (AAV) vectors [J]. Front Immunol, 2020, 11: 670. doi:10.3389/fimmu.2020.00670.
- [6] Li C, Samulski R J. Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy[J]. Nat Rev Genet, 2020, 21(4): 255 - 72. doi:10.1038/s41576-019-0205-4.
- [7] Chow R D, Guzman C D, Wang G, et al. AAV-mediated direct in vivo CRISPR screen identifies functional suppressors in glioblastoma[J]. Nat Neurosci, 2017, 20(10): 1329 - 41. doi:10.1038/nn.4620.
- [8] Zhang Y, Zhang Z N, Li N, et al. Nbr1-regulated autophagy in Lactoferrin-induced osteoblastic differentiation[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2020, 84(6): 1191 - 200. doi:10.1080/09168451.2020.1737505.
- [9] Yamamoto K, Venida A, Perera R M, et al. Selective autophagy of MHC-I promotes immune evasion of pancreatic cancer[J]. Autophagy, 2020, 16(8): 1524 - 5. doi:10.1080/15548627.2020.1769973.
- [10] 王雪芹, 刘亚锋, 吴静, 等. 基于 TCGA 数据库构建乳腺癌自噬相关基因预后风险模型[J]. 安徽医科大学学报, 2022, 57(4): 528 - 33. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.04.005.
- [10] Wang X Q, Liu Y F, Wu J, et al. Construction of prognostic risk model of autophagy related genes in lung adenocarcinoma based on TCGA database[J]. Acta Univ Med Anhui, 2022, 57(4): 528 - 33. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.04.005.
- [11] Yamamoto K, Venida A, Yano J, et al. Autophagy promotes immune evasion of pancreatic cancer by degrading MHC-I[J]. Nature, 2020, 581(7806): 100 - 5. doi:10.1038/s41586-020-2229-5.
- [12] Marsh T, Kenific C M, Suresh D, et al. Autophagic degradation of NBR1 restricts metastatic outgrowth during mammary tumor progression[J]. Dev Cell, 2020, 52(5): 591 - 604. doi:10.

- 1016/j.deveel.2020.01.025.
- [13] 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. doi:10.1186/s12943-022-01518-8.
- [14] Swiech L, Heidenreich M, Banerjee A, et al. *In vivo* interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9[J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(1): 102-6. doi:10.1038/nbt.3055.
- [15] Wilbie D, Walther J, Mastrobattista E. Delivery aspects of CRISPR/cas for *in vivo* genome editing[J]. *Acc Chem Res*, 2019, 52(6): 1555-64. doi:10.1021/acs.accounts.9b00106.
- [16] Uddin F, Rudin C M, Sen T. CRISPR gene therapy: applications, limitations, and implications for the future[J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 1387. doi:10.3389/fonc.2020.01387.
- [17] Tyumentseva M, Tyumentsev A, Akimkin V. CRISPR/Cas9 landscape: current state and future perspectives[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(22): 16077. doi:10.3390/ijms242216077.

Inhibiting *NBR1* expression using the AAV6-CRISPR-Cas9 system affects tumor immune regulation in lung cancer mice

Wang Bokang¹, Zhu Mingyang¹, Zhang Xiuse², Sun Jiangtao^{2,3,4}

(¹Clinical Medical College of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000;

²Henan Key Laboratory of Tumor Epigenetics, Luoyang 471000; ³Cancer Institute of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000; ⁴Dept of Thoracic Oncology Surgery,

Cancer Hospital of The First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000)

Abstract Objective To establish a *NBR1*-knockout lung cancer mouse model through CRISPR-Cas9 technology by using adeno-associated virus (AAV) as a vector to specifically inhibit *NBR1* expression and to investigate the impact of *NBR1* knockout on tumor growth and immune cell infiltration and regulation. **Methods** sgRNAs targeting mouse *NBR1* (Gene ID: 17966) was designed using the online tool CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/crispor.py>). AAV6 was utilized as the vector for sgRNA delivery, and the efficiency of gene knockout was confirmed using PCR and DNA sequencing methods. To determine the best AAV infection approach in mice, 6 C57BL/6J mice were randomly divided into intranasal and endotracheal groups. After 28 days, lung tissue sections were assessed for enhanced green fluorescent protein expression to identify the more efficient infection method for subsequent experiments. Lung tumor growth, as well as immune cell infiltration and activation status in tumor tissues, were detected using methods including HE staining, immunohistochemistry, immunofluorescence, and flow cytometry. **Results** DNA sequencing and immunofluorescence results indicated successful construction of the AAV6-U6-sgNBR1-CAG-Cre-GFP vector with stable knockout efficiency. Fluorescence microscopy showed higher efficiency of lung infection in mice through intratracheal administration ($P < 0.05$). HE staining revealed reduced tumor area in mouse lungs after targeted *NBR1* knockout compared to the control group ($P < 0.01$). Immunofluorescence and flow cytometry results demonstrated enhanced functional activity of CD8⁺ T lymphocytes in lung cancer tissues of mice with targeted *NBR1* knockout, characterized by increased effector T lymphocytes and decreased exhausted T lymphocytes ($P < 0.01$). **Conclusion** Using CRISPR/Cas9 technology, we construct a lung cancer mouse model with targeted *NBR1* knockout. We verify that targeted inhibition of *NBR1* expression significantly enhances the functional activity of CD8⁺ T lymphocytes in lung tissues, resulting in suppressed tumor growth, reduced tumor burden, and extended survival in lung cancer mice. This study lays an experimental foundation for investigations into the mechanisms and functions of *NBR1* and other genes in lung adenocarcinoma cells.

Key words lung adenocarcinoma; AAV6; CRISPR/Cas9; *NBR1*; gene editing; immunotherapy

Fund program Key Research and Development Program of Henan Province (No. 242102310155)

Corresponding author Sun Jiangtao, E-mail: sunjtdoctor@126.com