

寄生蠕虫遗传操纵的研究进展

王吉鹏*, 顾梦杰

复旦大学生命科学学院遗传工程国家重点实验室, 上海 200438

摘要: 全球约20亿人感染蠕虫, 由此导致的蠕虫病是发展中国家的严重健康负担。寄生蠕虫是一类多细胞寄生虫, 主要包括吸虫、绦虫和线虫, 其生活史复杂, 有多个发育时期且一般具有1个或多个宿主。从分子层面理解寄生蠕虫的生长、发育及其致病与传播的机理对于诊断和治疗蠕虫病具有重要意义。遗传操纵技术能够改变靶基因的表达水平, 极大地促进了生物医学领域的研究。近年来, 随着寄生蠕虫基因组信息的释放, 遗传操纵技术, 如RNA干扰、规律成簇间隔短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 基因编辑等在寄生蠕虫中的应用愈加广泛。本文对重要医学蠕虫中的遗传操纵进展、遗传操纵的方式及手段进行了综述, 以期对寄生蠕虫的基因功能研究提供参考。

关键词: 蠕虫; 遗传操纵; 基因功能

中图分类号: R383 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-9727(2023)10-1049-09

DOI: 10.13604/j.cnki.46-1064/r.2023.10.07

Advances of genetic manipulations in helminth parasites

WANG Jipeng, GU Mengjie

State Key Laboratory of Genetic Engineering, School of Life Sciences Fudan University, Shanghai 200438, China

Corresponding author: WANG Jipeng, E-mail: jipengwang@fudan.edu.cn

Abstract: Approximately 2 billion people worldwide are infected with helminths and the resulting helminthiasis is a heavy health burden for developing countries. Parasitic helminths are a class of multicellular parasites, mainly including trematodes, tapeworms and nematodes, with complex life cycle involving multiple developmental stages and typically one or more hosts. Understanding the growth, development, pathogenesis and transmission of these parasites at the molecular level is of great significance for the diagnosis and treatment of helminthiasis. Genetic manipulations, which alter the expression level of target genes, have greatly promoted the biomedical research. In recent years, with the release of genomic data of worms, genetic manipulation techniques, such as RNA interference and clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) gene editing, have been increasingly applied in the studies of parasitic helminths. This article reviews the progress of genetic manipulations in important medical worms, as well as the methods of genetic manipulations, which would be expected to inspire the future functional study in parasitic helminths.

Keywords: Parasitic helminths; genetic manipulations; gene function

蠕虫是一类在扁形动物门、线形动物门和棘头动物门中的多细胞无脊椎动物, 其种类庞大, 约10万种^[1]。其中, 营寄生生活的蠕虫能够侵入人或动物体内, 破坏或逃避宿主免疫系统, 同时夺取营养用于自身发育, 从而对宿主健康造成危害。寄生蠕虫的生活史复杂, 宿主范围广泛。全球约有1/4的人口感染蠕虫, 尤其在发展中国家, 蠕虫是最常见的病原体^[2-3], 这些能够引起人体疾病的蠕虫也被称为医学蠕虫。我国常见的几种蠕虫病有: 蛔虫病 (ascariasis)、血吸虫病 (schistosomiasis)、肝吸虫病 (clonorchiasis)、包虫病 (echinococcosis)、带绦虫病 (taeniasis) 和裂头绦虫病 (diphyllobothriasis)。目前, 蠕虫病的治疗主要依靠杀虫药物,

尚无有效的抗蠕虫疫苗^[4]。开发新的蠕虫病干预策略需要对寄生蠕虫的生物学有更深入的认识。

遗传操纵 (genetic manipulation) 是指对靶基因的表达水平进行改变或者引入新基因的分子操纵过程, 已成为基因功能研究中不可或缺的工具^[5]。通过对各种模式生物的研究, 目前已经开发出若干有效的遗传操纵手段, 如RNA干扰 (RNA interference, RNAi)、规律成簇间隔短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 基因编辑等。这些技术工具可以实现对生物及细胞进行靶基因表达的特异性下调和过表达、报告基因表达的组织特异性诱导以及条件性基因敲除等, 从而研究具体基

基金项目: 国家重点研发计划项目 (No. 2021YFC2300800, No. 2021YFC2300803)

作者简介: 王吉鹏 (1986—), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 血吸虫发育生物学及抗虫药物开发。

***通信作者:** 王吉鹏, E-mail: jipengwang@fudan.edu.cn

因的功能以解析生物行为的内在分子机制^[6-8]。寄生蠕虫具有复杂的生活史,一些种类需经1种或多种中间宿主,如血吸虫和肝吸虫等。因此,对靶标基因进行有效的操纵是研究寄生蠕虫的发育、存活、致病、生殖等重要过程的关键。然而,除部分寄生线虫可参考自由生活线虫的基因操纵手段,在吸虫和绦虫等寄生虫中可用的遗传操纵较为匮乏,如无法实现过表达和可遗传基因敲除。鉴于上述技术手段的限制,寄生蠕虫等分子功能研究仍处于相对慢速的发展状态。

本文对重要医学蠕虫的遗传操纵进行了综述,试图结合该领域的现状与不足,为未来新的蠕虫基因操纵技术体系的建立提供思路,从而深化对蠕虫重要生物行为的分子层面的认识。

1 寄生蠕虫的基因组与转录组研究

基因操纵的前提是获得目标区段的详细序列信息,因此寄生蠕虫的基因组信息提供了重要基础。自1998年秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)的全基因组测序完成,寄生蠕虫的基因组测序也陆续展开。随着测序技术的进步,多种寄生蠕虫的基因组获得解析。为整合这些宝贵的数据并实现国际共享,欧洲生物信息研究所和格拉斯哥大学合作设立了在线资源数据库 WormBase ParaSite (<https://parasite.wormbase.org>)。截至2023年7月20日,该数据库已收录175种寄生蠕虫的基因组信息。其中包括重要的医学蠕虫:蛔虫、吸虫和绦虫。寄生蠕虫基因组数据的测定不仅深化了人们对这类生物进化的认识,也促进了广谱驱虫策略的开发。2018年,国际蠕虫基因组联盟(International Helminth Genomes Consortium)对81种寄生和非寄生蠕虫的基因组比较分析,鉴定出寄生蠕虫所特有的基因群,并以此为靶点筛选出约5 000个小分子驱虫候选药物^[9]。

另一方面,转录组测序技术的出现使研究者们知悉基因的表达特征,从而获取蠕虫生活史不同阶段的关键基因。以血吸虫为例,包括其生活史不同阶段^[10]、成虫发育的不同时间点^[11]、杀虫药物处理后^[12]、雌雄虫之间^[13]、生殖器官发育前后^[14]、靶基因RNAi前后^[15]等多维度的转录组数据均被成功收集和分析,这些数据揭示了血吸虫生长发育、性别分化、药物反应等现象的基因表达规律,极大地丰富了人们对血吸虫生物学的认知,促进了抗血吸虫病疫苗和药物的开发。

寄生蠕虫基因组和转录组的研究既释放了详细的序列信息,也提供了功能研究的潜在靶点基因,这为进一步的遗传操作奠定了基础。

2 寄生蠕虫的基因沉默技术(Gene silencing)

基因沉默指在转录水平或翻译水平抑制基因的表达。Andrew A. Fire和Craig C. Mello于1998年在秀丽隐杆线虫中发现注射外源双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA)可引起体内相应信使核糖核酸(messenger RNA, mRNA)的降解。此后这种基因干扰被广泛应用于多种真核动、植物的分子功能研究。2006年,两人凭借上述工作获得诺贝尔奖。目前对RNAi调节内源性基因表达的分子机制已经清楚,寄生蠕虫遗传操纵技术示意图见图1,图中显示了由dsRNA、siRNA和shRNA诱导的细胞RNAi途径,以及基于载体的报告基因表达和CRISPR/Cas9基因编辑过程。在秀丽隐杆线虫中,进入体内的dsRNA被细胞膜上的dsRNA结合蛋白SID(systemic RNA-interference defective protein)识别并运输进细胞,随后内源的Dicer核酸酶将dsRNA切割为抑制性小核糖核酸(small inhibitory RNA, siRNA)。解旋酶drh-1(dicer related helicase)和dsRNA结合蛋白Rde4(RNAi deficient 4)负责将siRNA加载到RNA诱导沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)中。双链siRNA在RISC组装过程中被解开,随后其中一条单链与胞质中的目标mRNA互补结合。最终通过RISC中的限制性核酸内切酶Argonaute将该mRNA降解。由于SID和RSD(RNAi spreading defective)蛋白会将siRNA传递至全身大部分细胞,因此上述RNAi导致的基因沉默是全身性的^[16]。由此可见,RNAi主要通过降解靶基因的mRNA来降低其表达水平。除dsRNA外,外源性引入siRNA或可表达短发夹RNA(short hairpin RNA, shRNA)的载体也可以实现RNAi。与dsRNA和siRNA不同,shRNA方法需要首先通过引入的载体在细胞核中转录出前体shRNA,随后经核内的核糖核酸酶Drosha切割为成熟shRNA并通过核膜上的核输出蛋白Exportin5转移到胞质,最后shRNA被胞质中的Dicer切割为siRNA,最终进入RNAi过程。

RNAi是目前在寄生蠕虫中应用较广泛的基因沉默技术(表1)。2003年,SKELLY等^[17]最早在曼氏血吸虫童虫中进行了dsRNA处理,并从mRNA水平、免疫染色和酶活水平证实血吸虫肠道中的cathepsin B基因被成功干扰。2005年,ISSA等^[18]使用siRNA对蛇形毛圆线虫(*Trichostrongylus colubriformis*)L1期幼虫的泛素(ubiquitin)基因进行干预,结果显示该基因的表达水平被明显敲低。随后,RNAi成为研究血吸虫基因分子功能的主流工具。近期,WANG等^[19]利用dsRNA介导的RNAi对曼氏血吸虫中2 260个基因在

体外培养中分别进行了沉默,并从中筛选到195个潜在的药靶蛋白,为抗血吸虫新药开发提供了重要的基础。RNAi除了用于体外虫体基因的干扰,也可通过尾静脉注射法在宿主体内研究寄生蠕虫基因的分子功能。LI等^[20]发现将dsRNA注射到感染小鼠体内可有效干预日本血吸虫(*Schistosoma japonicum*)靶基因的表达,该方法已经成功用于组织蛋白酶B1(cathepsin B1)、次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, HGPRTase)、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)、G蛋白偶联受体(G Protein-Coupled Receptors, GPCRs)和长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)等靶标的干扰^[20-24]。PEREIRA等^[21]将siRNA注射到小鼠体内,成功干扰了宿主体内曼氏血吸虫HGPRTase基因的表达,并发现虫体回收率降低。RNAi在其他的吸虫纲蠕虫中也同样发挥作用,如肝片形吸虫(*Fasciola hepatica*, 脱囊童虫阶段)^[25-26]、华支睾吸虫(*Clonorchis sinensis*)^[27]和泰国肝吸虫(*Opisthorchis viverrine*; 成虫)^[28-29]等。

绦虫中RNAi技术的应用比吸虫稍晚,2010年首次在扩展莫尼茨绦虫(*Moniezia expansa*)的成虫头节中应用。PIERSON等^[30]通过浸泡和电穿孔递送dsRNA,成功干扰了肌动蛋白(*actin*)和疏水脂质结合蛋白(*hydrophobic lipid-binding protein, lbp*)基因。目前其他被证明可使用RNAi进行基因沉默的绦虫有多

房棘球绦虫(*Echinococcus multilocularis*, 原头蚴阶段)^[31]和微口膜壳绦虫(*Hymenolepis microstoma*, 囊尾蚴阶段)^[32]等。对于线虫类蠕虫, RNAi不仅在钩虫(hookworm)、丝虫(filarial nematodes)等动物寄生性线虫中被证实有效^[18, 33-37],在寄生植物的线虫,如大豆胞囊线虫(*Heterodera glycines*)^[38]、马铃薯白线虫(*Globodera pallida*)^[38]和根结线虫(*Meloidogyne* spp.)^[39-40]等物种中也被成功应用。

总之, RNAi技术介导的基因沉默在寄生蠕虫中已广泛应用,技术路线如图2所示。当然,尽管RNAi具有高效率的优势,但并非所有基因都能被有效敲低。亦有研究指出dsRNA处理存在脱靶效应^[41-42],因此在运用RNAi技术的同时也要进行靶基因干扰效率的评估。

3 寄生蠕虫的基因过表达技术(Gene overexpression)

与基因沉默相反,基因过表达指提升靶基因的表达水平。上述两种技术通常联用,在比较中获取仅在传统的基因沉默分析中所无法识别的潜在生物学表型。由于过表达技术需要构建包含调控元件和靶基因的载体并导入细胞,因此一个能表达报告基因的载体是建立过表达技术的基本条件。寄生蠕虫中首次报道的是荧光素酶报告基因载体。DAVIS等^[43]在猪蛔虫(*Ascaris suum*)幼虫胚胎和曼氏血吸虫成虫中成功构建了荧光素酶报告体系。研究者认为蠕虫中很

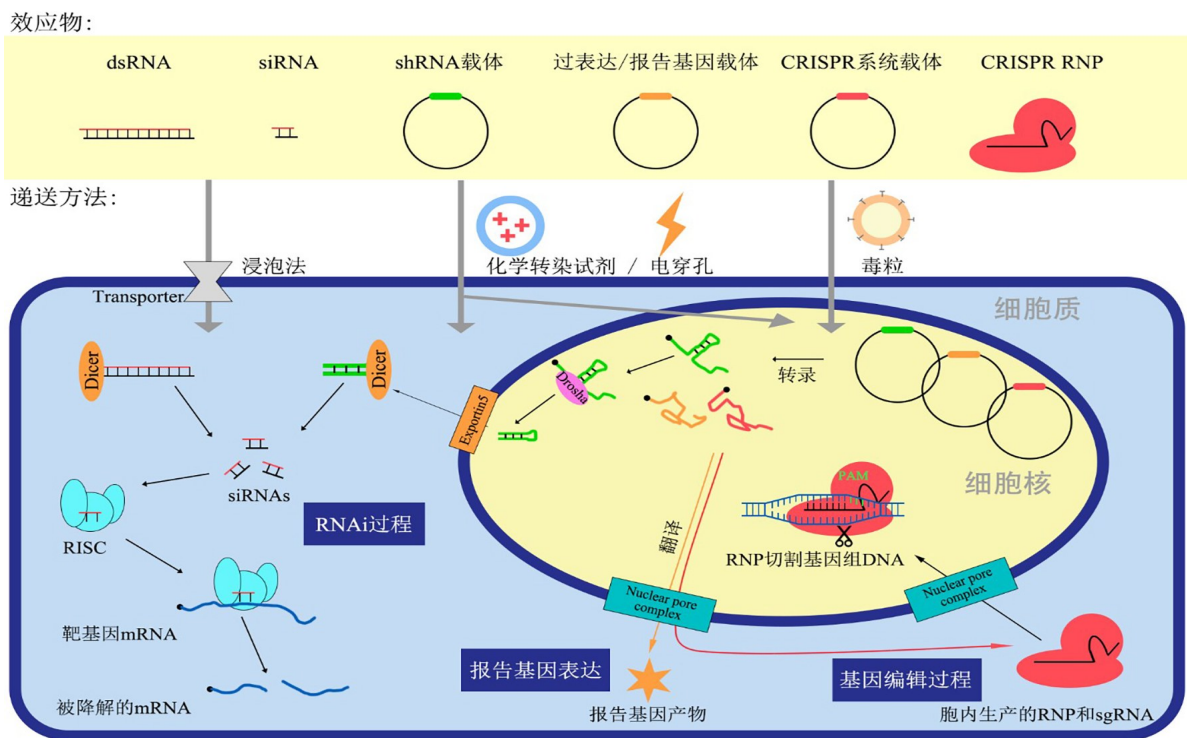


图1 寄生蠕虫遗传操纵技术示意图

Fig. 1 Schematic diagram of genetic manipulation techniques in parasitic helminths

表1 寄生蠕虫遗传操作的实例

Table 1 Examples of genetic manipulations in parasitic helminths

物种 Species	基因 Genes	方法 Methods	结果 Results
线虫 Nematodes			
蛇形毛圆线虫 <i>Trichostrongylus colubriformi</i>	<i>ubiquitin</i>	RNAi	虫体死亡或发育迟缓 ^[18]
巴西日圆线虫 <i>Nippostrongylus brasiliensis</i>	<i>acetylcholinesterase</i>	RNAi	mRNA 敲低但无明显表型 ^[33]
马来布鲁线虫 <i>Brugia malayi</i>	<i>beta-tubulin, RNA polymerase II large subunit</i>	RNAi	虫体死亡 ^[34]
旋盘尾丝虫 <i>Onchocerca volvulus</i>	<i>cathepsin L, cathepsin Z-like cysteine proteases</i>	RNAi	幼虫无法蜕皮 ^[35]
	<i>serine protease inhibitor</i>	RNAi	幼虫无法蜕皮或死亡 ^[36]
捻转血矛线虫 <i>Haemonchus contortus</i>	<i>beta-tubulin</i>	RNAi	幼虫运动力下降 ^[37]
大豆胞囊线虫 <i>Heterodera glycines</i>	<i>cysteine proteinase</i>	RNAi	雌虫比例下降 ^[38]
南方根结线虫 <i>Meloidogyne incognita</i>	<i>duox</i>	RNAi	卵数减少 ^[39]
猪蛔虫 <i>Ascaris suum</i>	荧光素酶	过表达	检测到荧光素酶活性 ^[43]
鼠类圆线虫 <i>Strongyloides ratti</i>	<i>CD4+ T cell epitope 2WIS</i>	过表达	宿主 T 细胞同时产生 Th2 和 Treg 表型 ^[44]
	<i>unc-22</i>	基因编辑	子代虫体运动性下降并伴随抽搐,且尼古丁能诱导加剧抽搐 ^[45]
	<i>rol-6</i>	基因编辑	异常滚动 ^[46]
	<i>tax-4</i>	基因编辑	趋热性下降 ^[47]
吸虫 Trematodes			
曼氏血吸虫 <i>Schistosoma mansoni</i>	<i>cathepsin B</i>	RNAi	免疫染色信号减少;酶活下降 ^[17]
	<i>Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i>	体内 RNAi	虫数减少 ^[21]
	<i>LINC101519, LINC110998, LINC175062</i>	体内 RNAi	虫数减少 ^[24]
	2 216 个基因	大规模 RNAi	250 个基因被干扰后观察到表型 ^[19]
	荧光素酶	过表达	检测到荧光素酶活性 ^[43]
	<i>myocyte enhancer factor 2</i>	过表达	检测到 WNT 通路基因的转录下调 ^[48]
	<i>ω1</i>	基因编辑	虫卵致病性下降 ^[49]
日本血吸虫 <i>Schistosoma japonicum</i>	<i>acetylcholinesterase</i>	基因编辑	酶活下降;虫卵致病性下降 ^[50]
	<i>cathepsin B1</i>	体内 RNAi	虫体发育迟缓 ^[20]
肝片形吸虫 <i>Fasciola hepatica</i>	<i>GRM7</i>	体内 RNAi	虫数减少;虫体发育迟缓 ^[23]
	<i>cathepsin B/cathepsin L</i>	RNAi	运动异常;侵入宿主能力下降 ^[25]
华支睾吸虫 <i>Clonorchis sinensis</i>	<i>Csenolase</i>	RNAi	虫体死亡 ^[27]
泰国肝吸虫 <i>Opisthorchis viverrine</i>	<i>cathepsin B</i>	RNAi	酶活下降 ^[28]
	<i>tetraspanin-1</i>	RNAi	虫体空泡化;表皮变薄 ^[29]
	<i>granulin-1</i>	基因编辑	虫体致病性下降
绦虫 Cestodes			
扩展莫尼茨绦虫 <i>Moniezia expansa</i>	<i>actin</i>	RNAi	表皮破损和产生空泡 ^[30]
多房棘球绦虫 <i>Echinococcus multilocularis</i>	<i>14-3-3</i>	RNAi	mRNA 敲低但无明显表型 ^[31]
微口膜壳绦虫 <i>Hymenolepis microstoma</i>	<i>Hox</i>	RNAi	mRNA 敲低但无明显表型 ^[32]

多物种都存在自发荧光,但没有自体发光,使用荧光素酶作为报告基因在体内检测时具有背景低的优点。该载体的主要元件包括:物种自身剪接前导序列 RNA 基因 (spliced leader RNA, SL RNA) 的启动子、SL RNA、SL RNA 基因内含子、pGL-3 载体的荧光素酶基因开放阅读框 (open reading frame, ORF)、物种自身的 3' 非翻译区 (3' untranslated region, UTR) 和 poly(A) 信号。在使用基因枪技术递送载体后,荧光素酶信号在猪蛔虫和曼氏血吸虫中被检测到。因荧光素酶本身具有信号放大的效果,所以实际表达效率难以确定。此后,在包括

绦虫类蠕虫在内的其他多种寄生蠕虫中相继开展了类似哺乳动物细胞中应用的报告体系,其中以荧光蛋白报告载体居多^[51]。尽管在部分寄生虫中某些载体会产生一些荧光信号,但表达效率不高,无法满足过表达的需要。LIANG 等^[48]发现 Sm23 启动子载体能够在血吸虫虫体内表达 mCherry 并能被 Western Blot 检测到,但未见后续再应用的报道。由于大部分的蠕虫均未开发出可靠的报告基因载体,故关于过表达的研究仍然停留在表达报告基因的摸索阶段,真正在蠕虫中进行了基因过表达的研究屈指可数^[44, 52-53]。

4 寄生蠕虫的基因编辑(Gene editing)

与沉默或过表达不同,基因编辑是通过生物的基因组序列进行编辑改造,从而影响靶基因表达的技术。该技术发展历经30年的发展,从应用锌指核酸内切酶(zinc finger nucleases, ZFN)到转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN),再到规律成簇间隔短回文重复序列/相关核酸酶(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR/CRISPR associated nuclease, Cas9)。随着最新一代基于CRISPR/Cas9的基因编辑的开发,已经在多种生物中实现了高效的单碱基分辨率的基因编辑。CRISPR技术源于细菌对抗病毒的防御机制。细菌利用Cas内切酶在CRISPR RNA(crRNA)的引导下使入侵的病毒DNA失活^[54-57]。CRISPR/Cas9介导的基因编辑过程如图1所示,Cas9首先与DNA上原间隔区相邻基序(protospacer adjacent motif, PAM)相互作用以定位,然后Cas9-单链向导RNA(single guide RNA, sgRNA)复合物打开DNA的双链结构^[58]。sgRNA通过RNA-DNA碱基配对识别互补靶链。随后,Cas9的HNH结构域和RuvC结构域分别切割靶支架和非靶链,以引入位点特异性双链断裂(double-strand breaks, DSBs)^[59]。然后通过非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)修复断裂,产生随机核苷酸插入和缺失(insertion-deletions, INDELS)或同源定向修复(homology-directed repair, HDR),用模板DNA替代修复途径时,可以通过同源模板进行高度准确的修复及外源基因的引入^[60-62]。

目前在寄生蠕虫中关于CRISPR基因编辑的应用较少,仅在少数线虫类和吸虫类蠕虫中有相关报告,技术路线如图2所示。其中线虫类蠕虫主要参照秀丽隐杆线虫的已知表型基因进行了基因编辑的尝试。粪类圆线虫的研究利用CRISPR/Cas9系统对该虫自

由生活阶段的雌性成虫进行了*unc-22*基因诱变,再将其与野生型雄性交配,结果在子代感染性三期幼虫(infective third-larval stage, iL3)中筛选到与秀丽隐杆线虫*unc-22*突变相似的表型,即虫体运动性下降并伴随抽搐,且尼古丁能诱导加剧抽搐^[45]。在另一项粪类圆线虫的研究中,科研人员发现对成虫和iL3幼虫进行*rol-6*基因突变后,子代及iL3幼虫均产生异常的滚动表型^[46]。还有研究报道经CRISPR/Cas9系统敲除*tax-4*基因会影响粪类圆线虫的趋热性^[47]。在吸虫中也有关于CRISPR/Cas9的基因编辑报告。ITTIPRASERT等^[49]最早在曼氏血吸虫进行CRISPR基因编辑。他们以虫卵中的 $\omega 1$ 蛋白的编码基因为靶标,因为 $\omega 1$ 蛋白是曼氏血吸虫虫卵分泌蛋白中引起宿主Th2型免疫反应的主要因子。尽管该研究发现基因编辑处理后的虫卵诱导肉芽肿的能力显著下降,但是高通量测序显示基因编辑效率仅为0.19%。一项针对乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)的研究指出,作为许多抗蠕虫药物的靶标,乙酰胆碱酯酶在血吸虫神经和肌肉系统中具有重要作用,当对血吸虫成虫和虫卵进行乙酰胆碱酯酶基因敲除后,乙酰胆碱酯酶活性显示下降,引起宿主的虫卵肝脏肉芽肿症状也出现减轻,但基因编辑效率<0.21%^[50]。*SULT-OR*基因编码一种磺基转移酶,该酶的突变被认为能增加血吸虫对抗血吸虫药物羟氨喹(oxamniquine)的抗性,在使用CRISPR/Cas9系统对血吸虫成虫、虫卵和母胞蚴进行*SULT-OR*基因敲除后,研究者发现针对这3种发育阶段血吸虫的编辑效率均在0~2.0%之间,其中成虫相对较高(0.3%~2.0%)^[63]。泰国肝吸虫的基因编辑也有报道,ARUNSAN等^[64]构建了针对该吸虫颗粒体蛋白*granulin-1*基因的CRISPR/Cas9载体,将其递送至成虫后检测到基因组DNA上的NHEJ效率为1.3%。将被编辑的脱囊童虫感染宿主后,宿

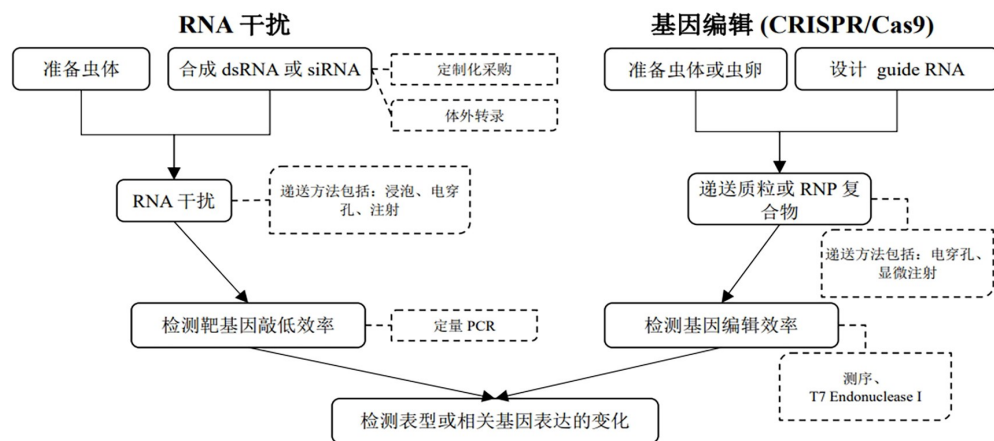


图2 寄生蠕虫RNAi与基因编辑的技术路线图

Fig. 2 Technology roadmap of RNAi and gene editing techniques in parasitic helminths

主呈现胆道增生和纤维化症状减轻并且被肝吸虫诱导的细胞癌变被抑制^[64-65]。近年来,随着基因组数据的测序完成,蠕虫的基因编辑相关研究也逐渐增加^[66-68],但这些研究仍未能获得可遗传的基因编辑虫株,蠕虫的基因编辑技术仍有很大的提升空间。

5 遗传操纵中的递送方法

不论是基因沉默、过表达还是基因编辑,均涉及dsRNA、质粒载体或RNP复合物等外源效应物的转入。如何高效、稳定地递送这些效应物是影响遗传操纵效率的重要环节。现有的主要递送方式如下。

5.1 浸泡法 浸泡法在RNAi较为常用。dsRNA和siRNA可以通过虫体自身的主动运输直接从溶液中摄入体内发挥作用。在大多数寄生蠕虫中广泛应用^[16]。如血吸虫中仅需要在体外培养基中添加即可发挥作用。针对Cathepsin B基因的实验评估了一次干扰可以起效20 d,而且一般可以实现大于60%的沉默效率^[25,69-70]。浸泡法递送的优点有:成本低,方便快捷。

5.2 电穿孔法 电穿孔法是一种常见的细胞转染方法,借助电穿孔设备制造电场在细胞膜上产生瞬时孔隙(transient pores),使得外源分子进入细胞^[71]。NDE-GWA等^[70]在曼氏血吸虫中以碱性磷酸酶(alkaline phosphatase)为靶基因比较了两种递送体系的RNAi效率,结果发现在童虫和成虫中,浸泡组的靶基因敲低效率>40%,而电穿孔组>80%。该结果提示电穿孔能够促进外源分子向血吸虫细胞的递送。尽管如此,由于电穿孔会对虫体造成一定程度的损伤,dsRNA和siRNA的递送仍然优先使用浸泡法。电穿孔更多的用于质粒、核糖核蛋白复合物(ribonucleoprotein, RNP)等大分子的传递。曼氏血吸虫和泰国肝吸虫的多项研究中通过电穿孔,将构建的载体和RNP递送至虫体,并取得了成功,但最终表达和编辑效率不高^[49-50,63-64,66-68]。另一方面,电穿孔在寄生线虫中的应用效果并不理想,当采用电穿孔法向巴西日圆线虫(*Nippostrongylus brasiliensis*)递送荧光标记的dsRNA和mRNA后,结果显示虫体没有吸收荧光分子,并且mRNA编码的荧光素酶也未检测到表达^[72]。

5.3 显微注射 显微注射是线虫研究中常用到的一种方法。寄生线虫的雌性生殖腺为合胞体结构(syncytial gonad),生殖细胞的边界不完整,若向生殖腺内注射DNA,随着生殖细胞的成熟外源DNA有几率被包裹进卵内^[73]。基于载体的基因过表达和基因编辑一样,需要设计启动子,5'端非编码区,外源基因编码序列(coding sequence, CDS)和3'端非编码区等必需元件。通过向粪类圆线虫和鼠类圆线虫的合胞体生殖腺内注射eef-1A启动子引导的Cas9蛋白载体,以

及U6启动子引导的unc-22 gRNA载体,研究者们成功筛选到了具有unc-22基因突变表型的子代^[45]。吸虫和绦虫的显微注射目前还未见报道。

5.4 化学转染 化学转染也是常见的细胞转染之一,常见的转染试剂包括以聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)为主要成分的阳离子聚合物(cationic polymer)和以脂质为主要成分的脂质体(liposome)。ADAMS等^[46]尝试使用脂质体作为转染试剂,配合显微注射递送dsRNA和CRISPR/Cas9效应物,结果显示该方法能够显著提升线虫的RNAi表型个体比例(>66%)和基因突变表型个体(>40%)。LIANG等^[48]则使用了PEI将Sm23启动子引导的mCherry荧光蛋白基因递送的曼氏血吸虫中,该报告基因的表达能够被Western Blot检测到。

5.5 病毒转染 在哺乳动物中,病毒被广泛用于细胞转染,该方法具有高度特异和高转导效率,如腺病毒(adenovirus)、腺相关病毒(adeno-associated virus)和慢病毒(lentivirus)等。然而目前没有专性感染蠕虫的病毒被发现。有研究尝试在寄生蠕虫中应用哺乳动物细胞转染体系中开发出的病毒转染。如RINALDI等^[74]报道鼠白血病病毒能够感染血吸虫卵并将外源基因插入到基因组上,作者认为可以开发为新颖有效的蠕虫转基因递送手段。另外,ITTIPRASERT等^[49]使用了慢病毒向虫卵中递送CRISPR载体,但实际的编辑效率很低(大约0.19%)。

6 展望

近20年来,遗传操纵技术的使用加深了我们对寄生蠕虫生物学的认识。然而相对于其他模式生物,寄生蠕虫中尚缺乏稳定高效的遗传操纵手段。目前寄生蠕虫应用最为广泛的基因操纵手段是RNAi技术,其存在两个主要不足,一是仅能够进行基因表达水平的降低;二是不能进行可以遗传的干预。由于寄生蠕虫的生活史涉及宿主体内及多个发育时期等复杂因素,在基因组序列上进行编辑以敲除或过表达靶基因能够更好地研究相关生物学问题,尤其是涉及寄生虫与宿主互作的研究。CRISPR/Cas9是近年来开发出的高效基因编辑技术,但在诸多重要医学蠕虫中尚未成功应用。在一些初步的尝试中显示,CRISPR/Cas9在寄生蠕虫中的编辑效率不高,例如曼氏血吸虫、泰国肝吸虫中均低于2%。这提示在寄生蠕虫中应开展更多的研究以提升CRISPR体系的基因编辑效率。如开发更加高效的递送体系,筛选适宜的外源质粒表达调控元件等。建立稳定、高效、可遗传的基因操纵技术是深入探索寄生蠕虫生长发育以及与宿主互作所必需的,将会为未来开发医学蠕虫的防控手段

提供重要靶标。此外,应对寄生蠕虫感染目前尚无有效的疫苗。利用基因编辑技术获得减毒的虫株或许可以成为疫苗开发的重要方向,为未来防治寄生蠕虫提供新的思路。

伦理审查与知情同意 本研究不涉及伦理批准和患者知情同意

利益冲突声明 所有作者声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] CARLSON C J, DALLAS T A, ALEXANDER L W, et al. What would it take to describe the global diversity of parasites?[J]. Proc R Soc B, 2020, 287(1939): 20201841.
- [2] AL AMIN A S M, WADHWA R. Helminthiasis [M]. Treasure Island: StatPearls Publishing. 2023.
- [3] JOURDAN P M, LAMBERTON P H L, FENWICK A, et al. Soil-transmitted helminth infections[J]. Lancet, 2018, 391(10117): 252-265.
- [4] PERERA D J, NDAO M. Promising technologies in the field of helminth vaccines[J]. Front Immunol, 2021, 12: 711650.
- [5] MAYSHAR Y, BENVENISTY N. Genetic manipulation of human embryonic stem cells[M]//Essentials of Stem Cell Biology. Amsterdam: Elsevier, 2009: 409-415.
- [6] BAANANNOU A, MOJICA-VAZQUEZ L H, DARRAS G, et al. *Drosophila* distal-less and Rotund bind a single enhancer ensuring reliable and robust bric-a-brac2 expression in distinct limb morphogenetic fields[J]. PLoS Genet, 2013, 9(6): e1003581.
- [7] AZZI C, AESCHIMANN F, NEAGU A, et al. A branched heterochronic pathway directs juvenile-to-adult transition through two LIN-29 isoforms[J]. eLife, 2020, 9: 53387.
- [8] XU C W, XU J, TANG H W, et al. A phosphate-sensing organelle regulates phosphate and tissue homeostasis[J]. Nature, 2023, 617(7962): 798-806.
- [9] CONSORTIUM I H G. Comparative genomics of the major parasitic worms[J]. Nat Genet, 2019, 51(1): 163-174.
- [10] PROTASIO A V, TSAI I J, BABBAGE A, et al. A systematically improved high quality genome and transcriptome of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2012, 6(1): e1455.
- [11] ARPORN W, PROTASIO ANNA V, SHONA W, et al. Transcriptome of the parasitic flatworm *Schistosoma mansoni* during intra-mammalian development[J]. PLoS Neglected Trop Dis, 2020, 14(5): e0007743.
- [12] MCCUSKER P, ROHR C M, CHAN J D. *Schistosoma mansoni* alter transcription of immunomodulatory gene products following in vivo praziquantel exposure[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2021, 15(3): e0009200.
- [13] PICARD M A L, BOISSIER J, ROQUIS D, et al. Sex-biased transcriptome of *Schistosoma mansoni*: host-parasite interaction, genetic determinants and epigenetic regulators are associated with sexual differentiation[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2016, 10(9): e0004930.
- [14] LU Z G, SESSLER F, HOLROYD N, et al. Schistosome sex matters: a deep view into gonad-specific and pairing-dependent transcriptomes reveals a complex gender interplay[J]. Sci Rep, 2016, 6: 31150.
- [15] WENDT G R, COLLINS J N, PEI J M, et al. Flatworm-specific transcriptional regulators promote the specification of tegumental progenitors in *Schistosoma mansoni*[J]. eLife, 2018, 7: 33221.
- [16] GELDHOF P, VISSER A, CLARK D, et al. RNA interference in parasitic helminths: current situation, potential pitfalls and future prospects[J]. Parasitology, 2006, 134(5): 609-619.
- [17] SKELLY P J, DA'DARA A, HARN D A. Suppression of cathepsin B expression in *Schistosoma mansoni* by RNA interference[J]. Int J Parasitol, 2003, 33(4): 363-369.
- [18] ISSA Z, GRANT W N, STASIUK S, et al. Development of methods for RNA interference in the sheep gastrointestinal parasite, *Trichostrongylus colubriformis*[J]. Int J Parasitol, 2005, 35(9): 935-940.
- [19] WANG J P, PAZ C, PADALINO G, et al. Large-scale RNAi screening uncovers therapeutic targets in the parasite *Schistosoma mansoni* [J]. Science, 2020, 369(6511): 1649-1653.
- [20] LI J, XIANG M Y, ZHANG R X, et al. RNA interference in vivo in *Schistosoma japonicum*: establishing and optimization of RNAi mediated suppression of gene expression by long dsRNA in the intra-mammalian life stages of worms[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 503(2): 1004-1010.
- [21] PEREIRA T C, PASCOAL V D B, MARCHESINI R B, et al. *Schistosoma mansoni*: evaluation of an RNAi-based treatment targeting HGPRTase gene[J]. Exp Parasitol, 2008, 118(4): 619-623.
- [22] DE ANDRADE L F, DE MORAES MOURÃO M, GERALDO J A, et al. Regulation of *Schistosoma mansoni* development and reproduction by the mitogen-activated protein kinase signaling pathway[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2014, 8(6): e2949.
- [23] WANG X L, CHENG S Y, CHEN X Y, et al. A metabotropic glutamate receptor affects the growth and development of *Schistosoma japonicum*[J]. Front Microbiol, 2022, 13: 1045490.
- [24] SILVEIRA G O, COELHO H S, PEREIRA A S A, et al. Long non-coding RNAs are essential for *Schistosoma mansoni* pairing-dependent adult worm homeostasis and fertility[J]. PLoS Pathog, 2023, 19(5): e1011369.
- [25] MCGONIGLE L, MOUSLEY A, MARKS N J, et al. The silencing of cysteine proteases in *Fasciola hepatica* newly excysted juveniles using RNA interference reduces gut penetration[J]. Int J Parasitol, 2008, 38(2): 149-155.
- [26] DELL'OCA N, BASIKA T, CORVO I, et al. RNA interference in *Fasciola hepatica* newly excysted juveniles: long dsRNA induces more persistent silencing than siRNA[J]. Mol Biochem Parasitol, 2014, 197(1/2): 28-35.
- [27] WANG X Y, CHEN W J, TIAN Y L, et al. RNAi-mediated silencing of enolase confirms its biological importance in *Clonorchis sinensis* [J]. Parasitol Res, 2014, 113(4): 1451-1458.
- [28] SRIPA J, PINLAOR P, BRINDLEY P J, et al. RNA interference targeting cathepsin B of the carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini*[J]. Parasitol Int, 2011, 60(3): 283-288.
- [29] PIRATAE S, TESANA S, JONES M K, et al. Molecular characterization of a tetraspanin from the human liver fluke, *Opisthorchis viverrini* [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2012, 6(12): e1939.

- [30] PIERSON L, MOUSLEY A, DEVINE L, et al. RNA interference in a cestode reveals specific silencing of selected highly expressed gene transcripts[J]. *Int J Parasitol*, 2010, 40(5): 605–615.
- [31] MIZUKAMI C, SPILOTIS M, GOTTSSTEIN B, et al. Gene silencing in *Echinococcus multilocularis* protoscoleces using RNA interference [J]. *Parasitol Int*, 2010, 59(4): 647–652.
- [32] POUCHKINA–STANTCHEVA N N, CUNNINGHAM L J, HRČKOVA G, et al. RNA-mediated gene suppression and in vitro culture in *Hymenolepis microstoma*[J]. *Int J Parasitol*, 2013, 43(8): 641–646.
- [33] HUSSEIN A S, KICHENIN K, SELKIRK M E. Suppression of secreted acetylcholinesterase expression in *Nippostrongylus brasiliensis* by RNA interference[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2002, 122(1): 91–94.
- [34] ABOUBAKER A A, BLAXTER M L. Use of RNA interference to investigate gene function in the human filarial nematode parasite *Bruugia malayi*[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2003, 129(1): 41–51.
- [35] LUSTIGMAN S, ZHANG J, LIU J, et al. RNA interference targeting cathepsin L and Z-like cysteine proteases of *Onchocerca volvulus* confirmed their essential function during L3 molting[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2004, 138(2): 165–170.
- [36] FORD L, GUILIANO D B, OKSOV Y, et al. Characterization of a novel filarial serine protease inhibitor, Ov-SPI-1, from *Onchocerca volvulus*, with potential multifunctional roles during development of the parasite[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(49): 40845–40856.
- [37] KOTZE A C, BAGNALL N H. RNA interference in *Haemonchus contortus*: suppression of beta-tubulin gene expression in L3, L4 and adult worms in vitro[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2006, 145(1): 101–110.
- [38] URWIN P E, LILLEY C J, ATKINSON H J. Ingestion of double-stranded RNA by preparasitic juvenile cyst nematodes leads to RNA interference[J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2002, 15(8): 747–752.
- [39] BAKHETIA M, CHARLTON W, ATKINSON H J, et al. RNA interference of dual oxidase in the plant nematode *Meloidogyne incognita* [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2005, 18(10): 1099–1106.
- [40] FANELLI E, DI VITO M, JONES J T, et al. Analysis of chitin synthase function in a plant parasitic nematode, *Meloidogyne artiellia*, using RNAi[J]. *Gene*, 2005, 349: 87–95.
- [41] DINGUIRARD N, YOSHINO T P. Potential role of a CD36-like class B scavenger receptor in the binding of modified low-density lipoprotein (acLDL) to the tegumental surface of *Schistosoma mansoni* sporocysts[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2006, 146(2): 219–230.
- [42] BAKHETIA M, CHARLTON W L, URWIN P E, et al. RNA interference and plant parasitic nematodes[J]. *Trends Plant Sci*, 2005, 10(8): 362–367.
- [43] DAVIS R E, PARRA A, LOVERDE P T, et al. Transient expression of DNA and RNA in parasitic helminths by using particle bombardment[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(15): 8687–8692.
- [44] DOUGLAS B, WEI Y, LI X S, et al. Transgenic expression of a T cell epitope in *Strongyloides ratti* reveals that helminth-specific CD4+ T cells constitute both Th2 and Treg populations[J]. *PLoS Pathog*, 2021, 17(7): e1009709.
- [45] GANG S S, CASTELLETTO M L, BRYANT A S, et al. Targeted mutagenesis in a human-parasitic nematode[J]. *PLoS Pathog*, 2017, 13(10): e1006675.
- [46] ADAMS S, PATHAK P, SHAO H G, et al. Liposome-based transfection enhances RNAi and CRISPR-mediated mutagenesis in non-model nematode systems[J]. *Sci Rep*, 2019, 9: 483.
- [47] BRYANT A S, RUIZ F, GANG S S, et al. A critical role for thermosensation in host seeking by skin-penetrating nematodes[J]. *Curr Biol*, 2018, 28(14): 2338–2347.e6.
- [48] LIANG S, KNIGHT M, JOLLY E R. Polyethyleneimine mediated DNA transfection in schistosome parasites and regulation of the WNT signaling pathway by a dominant-negative SmMef2[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2013, 7(7): e2332.
- [49] ITTIPRASERT W, MANN V H, KARINSHAK S E, et al. Programmed genome editing of the omega-1 ribonuclease of the blood fluke, *Schistosoma mansoni*[J]. *eLife*, 2019, 8: 41337.
- [50] YOU H, MAYER J U, JOHNSTON R L, et al. CRISPR/Cas9-mediated genome editing of *Schistosoma mansoni* acetylcholinesterase[J]. *FASEB J*, 2021, 35(1): e21205.
- [51] QUINZO M J, PERTEGUER M J, BRINDLEY P, et al. Transgenesis in parasitic helminths: a brief history and prospects for the future[J]. *Parasit Vectors*, 2022, 15(1): 110.
- [52] DVOŘÁK J, BECKMANN S, LIM K C, et al. Biolistic transformation of *Schistosoma mansoni*: studies with modified reporter-gene constructs containing regulatory regions of protease genes[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2010, 170(1): 37–40.
- [53] SUTTIPRAPA S, RINALDI G, TSAI I J, et al. HIV-1 integrates widely throughout the genome of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*[J]. *PLoS Pathog*, 2016, 12(10): e1005931.
- [54] ISHINO Y, SHINAGAWA H, MAKINO K, et al. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product [J]. *J Bacteriol*, 1987, 169(12): 5429–5433.
- [55] JANSEN R, EMBDEN J D, GAASTRA W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes[J]. *Mol Microbiol*, 2002, 43(6): 1565–1575.
- [56] LANDER E S. The heroes of CRISPR[J]. *Cell*, 2016, 164(1/2): 18–28.
- [57] LEDFORD H. CRISPR: gene editing is just the beginning[J]. *Nature*, 2016, 531(7593): 156–159.
- [58] SZCZELKUN M D, TIKHOMIROVA M S, SINKUNAS T, et al. Direct observation of R-loop formation by single RNA-guided Cas9 and Cascade effector complexes[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(27): 9798–9803.
- [59] DICKINSON D J, GOLDSTEIN B. CRISPR-based methods for *Caenorhabditis elegans* genome engineering[J]. *Genetics*, 2016, 202(3): 885–901.
- [60] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816–821.
- [61] LINO C A, HARPER J C, CARNEY J P, et al. Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches[J]. *Drug Deliv*, 2018, 25(1): 1234–1257.
- [62] HEFFERIN M L, TOMKINSON A E. Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining[J]. *DNA Repair*, 2005, 4(6): 639–648.
- [63] SANKARANARAYANAN G, COGHLAN A, DRIGUEZ P, et al.

- Large CRISPR-Cas-induced deletions in the oxamniquine resistance locus of the human parasite *Schistosoma mansoni*[J]. Wellcome Open Res, 2020, 5: 178.
- [64] ARUNSAN P, ITTIPRASERT W, SMOUT M J, et al. Programmed knockout mutation of liver fluke granulin attenuates virulence of infection-induced hepatobiliary morbidity[J]. eLife, 2019, 8: 41463.
- [65] CHAIYADET S, TANGKAWATTANA S, SMOUT M J, et al. Knockout of liver fluke granulin, *Ov-grn-1*, impedes malignant transformation during chronic infection with *Opisthorchis viverrini*[J]. PLoS Pathog, 2022, 18(9): e1010839.
- [66] HULME B J, GEYER K K, FORDE-THOMAS J E, et al. *Schistosoma mansoni* α -N-acetylgalactosaminidase (SmNAGAL) regulates coordinated parasite movement and egg production[J]. PLoS Pathog, 2022, 18(1): e1009828.
- [67] ITTIPRASERT W, CHATUPHEERAPHAT C, MANN V H, et al. RNA-guided AsCas12a- and SpCas9-catalyzed knockout and homology directed repair of the Omega-1 locus of the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(2): 631.
- [68] ZHANG L C, WANG L F, XIANG S Y, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene knockout of Sj16 in *Schistosoma japonicum* eggs upregulates the host-to-egg immune response[J]. FASEB J, 2022, 36(11): e22615.
- [69] CORRENTI J M, BRINDLEY P J, PEARCE E J. Long-term suppression of cathepsin B levels by RNA interference retards schistosome growth[J]. Mol Biochem Parasitol, 2005, 143(2): 209-215.
- [70] NDEGWA D, KRAUTZ-PETERSON G, SKELLY P J. Protocols for gene silencing in schistosomes[J]. Exp Parasitol, 2007, 117(3): 284-291.
- [71] GEHL J. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research[J]. Acta Physiol Scand, 2003, 177(4): 437-447.
- [72] SELKIRK M E, HUANG S C, KNOX D P, et al. The development of RNA interference (RNAi) in gastrointestinal nematodes[J]. Parasitology, 2012, 139(5): 605-612.
- [73] PAZDERNIK N, SCHEDL T. Introduction to germ cell development in *Caenorhabditis elegans*[M]//SCHEDL T. Germ Cell Development in *C. elegans*. New York: Springer, 2013: 1-16.
- [74] RINALDI G, ECKERT S E, TSAI I J, et al. Germline transgenesis and insertional mutagenesis in *Schistosoma mansoni* mediated by murine leukemia virus[J]. PLoS Pathog, 2012, 8(7): e1002820.

收稿日期:2023-07-01 编辑:王佳燕

(上接第1048页)

- [51] SZE K M F, CHU G K Y, LEE J M F, et al. C-terminal truncated hepatitis B virus x protein is associated with metastasis and enhances invasiveness by c-Jun/matrix metalloproteinase protein 10 activation in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2013, 57(1): 131-139.
- [52] CHEN Z, TANG J, CAI X F, et al. HB_x mutations promote hepatoma cell migration through the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. Cancer Sci, 2016, 107(10): 1380-1389.
- [53] LIU W B, CAI S L, PU R, et al. HBV preS mutations promote hepatocarcinogenesis by inducing endoplasmic reticulum stress and upregulating inflammatory signaling[J]. Cancers, 2022, 14(13): 3274.
- [54] HUANG J, DENG Q, WANG Q, et al. Exome sequencing of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma[J]. Nat Genet, 2012, 44(10): 1117-1121.
- [55] POLLICINO T, CACCIOLA I, SAFFIOTI F, et al. Hepatitis B virus PreS/S gene variants: Pathobiology and clinical implications[J]. J Hepatol, 2014, 61(2): 408-417.
- [56] WANG CHING-L H, HUANG W Y, LAI M D, et al. Aberrant cyclin A expression and centrosome overduplication induced by hepatitis B virus Pre-S2 mutants and its implication in hepatocarcinogenesis[J]. Carcinogenesis, 2012, 33(2): 466-472.
- [57] NG C K Y, DAZERT E, BOLDANOVA T, et al. Integrative proteogenomic characterization of hepatocellular carcinoma across etiologies and stages[J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 2436.
- [58] KUMAR R, DIMENNA L, SCHRODE N, et al. AID stabilizes stem-cell phenotype by removing epigenetic memory of pluripotency genes[J]. Nature, 2013, 500(7460): 89-92.
- [59] ZHENG C Q, LIU M, GE Y P, et al. HB_x increases chromatin accessibility and ETV4 expression to regulate dishevelled-2 and promote HCC progression[J]. Cell Death Dis, 2022, 13(2): 116.
- [60] YIN C, LI D Y, GUO X, et al. NGS-based profiling reveals a critical contributing role of somatic D-loop mtDNA mutations in HBV-related hepatocarcinogenesis[J]. Ann Oncol, 2019, 30(6): 953-962.
- [61] GIOSA D, LOMBARDO D, MUSOLINO C, et al. Mitochondrial DNA is a target of HBV integration[J]. Commun Biol, 2023, 6: 684.
- [62] CHEN L J, LIN X Y, LEI Y M, et al. Aerobic glycolysis enhances HB_x-initiated hepatocellular carcinogenesis via NF- κ Bp65/HK2 signalling[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2022, 41(1): 329.
- [63] CHIU AMY P, TSCHIDA BARBARA R, TUNG-TING S, et al. HB_x-K130M/V131I promotes liver cancer in transgenic mice via AKT/FOXO1 signaling pathway and arachidonic acid metabolism[J]. Mol Cancer Res, 2019, 17(7): 1582-1593.
- [64] ZHOU L L, XIA S H, LIU Y Y, et al. A lipid metabolism-based prognostic risk model for HBV-related hepatocellular carcinoma[J]. Lipids Health Dis, 2023, 22(1): 46.

收稿日期:2023-06-29 编辑:王思衢 黄艳