

CRISPR/Cas9 系统构建 ROCK2 基因敲除肺癌细胞系*

莫婷^{1,2,3} 张海涛^{1,2,3} 李苑琪^{1,2,3} 余华军^{1,2} 李国丹^{1,2} 魏婷^{1,2}
黄小琴^{1,2} 贾玉芳^{1,2} 涂名进^{1,2} 严秀文^{1,2}

(1. 广东医科大学生物化学与分子生物学研究所, 广东 湛江 524023;
2. 广东医科大学生物多肽与蛋白质研究应用重点实验室, 广东 湛江 524023;
3. 南方海洋科学与工程广东省实验室, 广东 湛江 524023)

【摘要】 目的 利用 CRISPR/Cas9 编辑系统对人肺癌细胞系 A549、H460 细胞中 Rho 相关卷曲螺旋形成蛋白激酶 2(ROCK2)基因进行稳定敲除, 并对其敲除效果进行验证。初步探讨 ROCK2 基因敲除肺癌细胞株的细胞水平上的功能改变。方法 利用 Rock-2 CRISPR 质粒和 Rock-2 HDR 质粒转染构建 A549、H460 ROCK2 基因敲除稳定细胞株。蛋白质印迹法验证敲除效果、用定量逆转录-聚合酶链反应(RT-qPCR)检测 ROCK2 基因的 mRNA 表达水平。平板克隆形成实验、MTT 法检测各细胞株的增殖能力。结果 A549、H460 肺癌细胞中 ROCK2 基因稳定敲除株构建成功。与原始细胞株相比, ROCK2 敲除株细胞中的蛋白表达水平完全缺失, 细胞内的 mRNA 表达水平显著下降, 而且能降低 A549、H460 肺癌细胞的增殖能力。结论 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑系统获得 ROCK2 基因敲除的肺癌细胞系, 为进一步研究 ROCK2 对肺癌生长的影响奠定基础。

【关键词】 ROCK2; 肺癌; CRISPR/Cas9

【中图分类号】 R734.2 **【文献标志码】** A **DOI:**10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2022. 09. 003

Construction of ROCK2 knockout lung cancer cell line using CRISPR/Cas9 system

MO Ting^{1,2,3}, ZHANG Haitao^{1,2,3}, LI Yuanqi^{1,2,3}, YU Huajun^{1,2}, LI Guodan^{1,2}, WEI Ting^{1,2},
HUANG Xiaoqin^{1,2}, JIA Yufang^{1,2}, TU Mingjin^{1,2}, YAN Xiuwen^{1,2}

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, Guangdong, China;
2. Peptide and Protein Research and Application Key Laboratory of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, Guangdong, China;
3. Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory, Zhanjiang 524023, Guangdong, China)

【Abstract】 **Objective** The CRISPR/Cas9 editing system was used to stably knock out the ROCK2 gene in human lung cancer cell lines A549 and H460, and the knockout effect was verified. We preliminarily explored the functional changes at the cellular level of the ROCK2 knockout lung cancer cell line. **Methods** The Rock-2 CRISPR plasmid and Rock-2 HDR plasmid were used to construct A549 and H460 ROCK2 gene knockout stable cell lines. Western blotting was used to verify the knockout effect, and quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect the mRNA expression level of ROCK2 gene. Colony formation experiments and MTT method were used to detect the proliferation ability of each cell line. **Results** The results showed that the stable A549 cell line and H460 cell line with deficient ROCK2 expression was successfully obtained. Compared with the original cell line, the protein expression level in the ROCK2 knockout cell line is completely lost, the mRNA expression level in the cell is significantly reduced, and the proliferative abilities were greatly decreased. **Conclusion** ROCK2 gene knockout lung cancer cell lines provide an effective tool for further research on the function and mechanism of ROCK2 in lung cancer.

【Key words】 Rho associated coiled coil forming protein kinase 2; Lung cancer; CRISPR/Cas9

基金项目:国家自然科学基金(81772634);广东医科大学学科建设项目(4SG21012G)

通信作者:张海涛, E-mail: taohaizhang33@163.com

引用本文:莫婷,张海涛,李苑琪,等. CRISPR/Cas9 系统构建 ROCK2 基因敲除肺癌细胞系[J]. 西部医学, 2022, 34(9): 1260-1264, 1271. DOI:

10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2022. 09. 003

肺癌发病率和死亡率在恶性肿瘤中居高不下^[1],其中超过 80% 的肺癌是非小细胞肺癌(Non-small cell lung carcinoma, NSCLC)。早期肺癌多无明显症状,临床上多数患者出现症状就诊时已属晚期,而晚期肺癌患者整体 5 年生存率约为 17% 左右^[2]。因此,寻找肺癌新的分子标记物以及潜在的治疗靶点,为肺癌患者制定新的治疗策略非常重要。Rho 相关卷曲螺旋形成蛋白激酶 2 (Rho associated coiled coil forming protein kinase 2, ROCK2) 是 Rho A 小 GTP 蛋白激酶下游关键的重要效应因子,属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族,主要在脑、骨骼肌和心脏表达。ROCK2 及其下游靶点参与调节肌动蛋白的细胞骨架动力学,从而参与细胞的迁移和运动^[3]。此外,ROCK2 还在促进肿瘤细胞增殖、肿瘤侵袭转移以及血管生成等多种肿瘤进展过程中发挥重要作用。关于 ROCK2 在恶性肿瘤中的研究越来越多,它的异常表达被发现与许多癌症包括肝癌、乳腺癌、前列腺癌和肺癌等的发生、发展机制有关^[4-7]。但有关 ROCK2 在肺癌中致病机制的相关研究报道较少,而它可能作为肺癌发生的危险因素,对其进行相关的功能学研究有非常重要的意义。因此,本文通过利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术对人肺癌细胞系的 ROCK2 基因进行敲除,构建 ROCK2 基因敲除的 A549、H460 稳定细胞株,为进一步揭示 ROCK2 在肺癌细胞中参与调节的功能以及在肺癌发生、发展机制中发挥的作用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 主要材料 人非小细胞肺癌细胞 A549、人大细胞肺癌细胞 H460 由本实验室保存提供,1640 培养基(Gibco)、胎牛血清(Gibco)、100X 青霉素-链霉素溶液及 0.25% 胰酶消化液购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 试剂与仪器 Lipo3000 转染试剂和辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗购于美国赛默飞公司;GAPDH 和 ROCK2 一抗均购于 Cell Signaling Technology 公司;RNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;Realtime PCR 反应试剂盒购自 Takara Bio 公司。PCR 仪器:ABI 7500。

1.3 方法

1.3.1 载体构建与表达 Rock-2 CRISPR/Cas9 KO 质粒、Rock-2 HDR 质粒购于 Santa Cruz Biotechnology 公司。根据 CRISPR/Cas9 的设计原则,3 种不同的 sgRNAs (sgRNA a、sgRNA b 和 sgRNA c) 被设计用来构建针对人类的 ROCK2 基因,见表 1。

1.3.2 细胞培养 人肺癌细胞系 A549、H460 细胞用含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素溶液的 1640

表 1 sgRNA 寡核苷酸序列

Table 1 sgRNA oligonucleotide sequences

sgRNA	寡核苷酸序列(5'-3')
sgRNA a	5'-TATGCTTACCTGAACCACCC-3'
sgRNA b	5'-TACCCACTAGCATCTCATAA-3'
sgRNA c	5'-ACCGGATTATATATCACCTG-3'

培养基,在 37℃、5% CO₂ 的孵箱中培养。

1.3.3 质粒转染 将适量的 A549 细胞和 H460 细胞铺进含 1 mL 新鲜 1640 培养基的 12 孔板中。当细胞密度达到 60%~70% 时,更换为不含血清 1640 培养基,根据赛默飞的 Lipofectamine 3000 试剂实验方案每个孔分别添加 0.5 μg Rock-2 CRISPR 质粒和 0.5 μg Rock-2 HDR 质粒、1.5 μL 的 Lipo3000 和 2 μL P3000 转染细胞。将转染后的 A549 细胞和 H460 细胞培养 24 h 后,在荧光显微镜下观察细胞的转染效率。

1.3.4 稳定细胞株的单克隆筛选 先确定用于杀死未转染耐药基因的细胞的嘌呤霉素的最低浓度。将适当数量的细胞接种到 24 孔培养皿中,以确保第二天细胞密度达到 80% 或以上。细胞在培养箱中培养过夜。第二天,更换含有不同浓度嘌呤霉素的新鲜培养基(0, 0.4, 0.6, 0.8, 1.2, 1.6 μg/mL),更换培养基后在细胞培养箱中继续培养。由于嘌呤霉素的效力非常强,不表达嘌呤霉素抗性基因的细胞可以在 2~3 天内被杀死,因此可以通过显微镜观察确定有效杀死正常细胞的药物的最低浓度。A549 细胞的筛选浓度为 1.2 μg/mL, H460 细胞的筛选浓度为 2.0 μg/mL。稳定细胞系的单克隆筛选。A549 细胞和 H460 细胞转染 24 h 后,分别加入含有 1.2 μg/mL 和 2.0 μg/mL 嘌呤霉素的 10% FBS-1640 培养基培养液继续培养 3 天。3 天后撤去含有嘌呤霉素的培养基,让细胞长到合适的细胞密度。用胰酶消化嘌呤霉素阳性细胞,采用有限稀释法将细胞悬液稀释,接种到 96 孔板中,使得每个孔中最多 1 个细胞,再继续培养,最终可得到 A549 单克隆细胞株和 H460 单克隆细胞株。

1.3.5 蛋白质印迹法(Western blot)检测稳定细胞株 将收集的细胞加入细胞裂解液,冰上裂解 1 h 后离心取上清,BCA 法测定蛋白质浓度,按每组 50 μg 蛋白量上样进行 SDS-PAGE 电泳,电泳条件为:浓缩胶 80V, 30 min;分离胶:120V, 1 h 10 min, 转膜条件为 11V, 2.5 h。裁膜后,采用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后,按 1:500 孵育 ROCK2 抗体(CST)、1:1000 孵育 GAPDH 抗体(CST)。4℃ 慢摇过夜,12 h 回收一抗,1×TBST 洗 3 遍,每次 10 min。之后用 HRP 标记羊抗兔二抗(按 1:2000 配置)室温孵育 1 h,回收二

抗,1×TBST 洗 3 遍,每次 10 min。经过曝光、X 线胶片显影成像、定影后,晾干胶片。

1.3.6 RNA 提取及 RT-qPCR 检测 用总 RNA 提取试剂盒从细胞中提取总 RNA,用 Real-Time PCR 试剂盒进行反转录得到 cDNA。引物序列包括:ROCK2 基因上游引物序列:5'-ATGAAACCAATGCTTTACTGCGAAC-3',下游引物序列:5'-ACATCTGTGTCATTACCACGCTT-3'。内参基因 GAPDH 上游引物序列为:5'-CAGGAGGCATTGCTGATGAT-3',下游引物序列为:5'-GAAGGCTGGGGCTCATTT-3'。所有基因的循环条件分别为:初始阶段 95℃ 预变性 30 s,95℃ 5 s,60℃ 34 s,共 40 个循环。一个周期熔融曲线阶段 95℃ 15 s,60℃ 1 min,最后 95℃ 15 s。用内源性管家基因 GAPDH 的 mRNA 表达水平归一化处理后,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 ROCK2 的相对表达量, $\Delta\Delta Ct = (\text{实验组目的基因 Ct 值} - \text{实验组内参基因 Ct 值}) - (\text{对照组目的基因 Ct 值} - \text{对照组内参基因 Ct 值})$ 。

1.3.7 MTT 法检测细胞活力 A549 组分为 A549 组和 A549 KO 组。同样设置 H460 组的实验分为 H460 组和 H460 KO 组。将处于对数生长期的细胞铺至 96 孔板,每孔铺 1000 个细胞,每组细胞设 5 个复孔,在细胞培养箱中分别培养 24、48、72、96 h。达到相应的培养时间后,每孔加入 100 μL 含 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MTT 的培养基溶液,每组细胞同时设置调零孔(只含有培养基、MTT、二甲基亚砜)。放置培养箱中继续培养 4 h,4 h 后在酶标仪 490 nm 波长下检测吸光度(OD)值。

1.3.8 平板克隆形成实验 用胰酶消化细胞,计数后每孔按 100 个细胞数量进行铺板,各挑选一株稳定敲除细胞株(A549 KO、H460 KO)与未敲除原始细胞株(A549、H460)进行对比,培养 10~14 天。肉眼可见细胞群落出现且在用显微镜观察到大于 50 个细胞克隆数,终止培养。弃去培养液,用 PBS 洗 1 遍,加入甲醇固定 30 min,PBS 洗 1 遍。每孔加入 1 mL 氨基黑溶液染色 15 min,吸出后用流水缓慢冲洗干净染色液,干燥后拍照。

1.4 统计学分析 采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行分析作图,计数数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,两组间采用独立样本的 *t* 检验比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 稳定敲除细胞株的 ROCK2 蛋白质表达水平检测 各选取 3 株纯合子敲除细胞株进行 ROCK2 蛋白表达验证,检测 CRISPR/Cas9 技术的敲除效率。与

A549、H460 野生株相比较,ROCK2 基因敲除株的 ROCK2 蛋白水平表达完全缺失,验证 ROCK2 基因敲除成功。结果表明成功构建 ROCK2 基因敲除的单克隆 A549、H460 细胞株,见图 1。

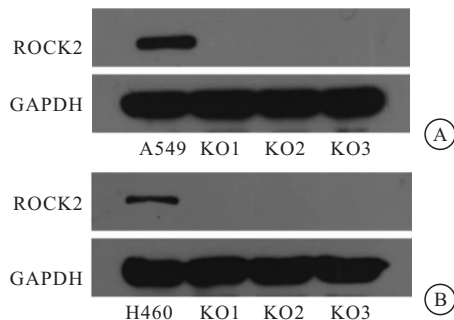


图 1 Western blot 检测 ROCK2 蛋白表达

Figure 1 Western blot analysis the protein expression levels of ROCK2
注:A.检测 ROCK2 蛋白在 A549 与 A549 KO 细胞中的表达;B.检测 ROCK2 蛋白在 H460 与 H460 KO 细胞中的表达

2.2 RT-PCR 检测稳定敲除细胞株的 ROCK2 mRNA 表达水平 与 A549 和 H460 原始细胞株相比,ROCK2 基因敲除细胞株的 mRNA 表达水平明显降低,组内的 mRNA 表达水平差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。

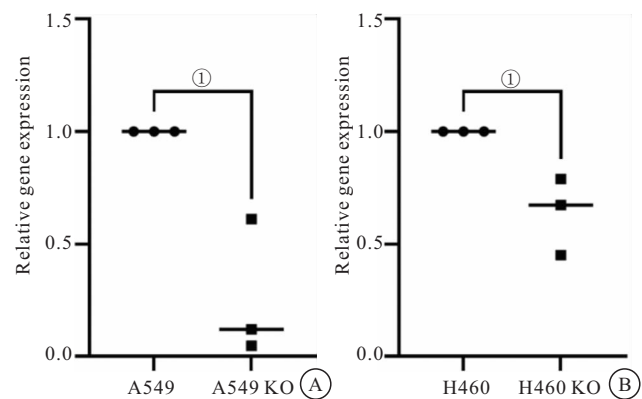


图 2 RT-PCR 检测稳定敲除细胞株的 mRNA 表达水平

Figure 2 RT-PCR detects the mRNA expression levels in stable knockout cell lines

注:A.检测 A549 KO 细胞株中 ROCK2 mRNA 的相对表达量;B.检测 H460 KO 细胞株中 ROCK2 mRNA 的相对表达量。① $P < 0.05$

2.3 MTT 法检测敲除细胞株细胞增殖能力 ROCK2 基因敲除细胞株与 A549、H460 原始细胞株相比,细胞活力显著下降。说明 ROCK2 基因敲除后抑制肺癌细胞的增殖,见图 3。

2.4 平板克隆形成实验检测敲除细胞株细胞集落形成能力 与 A549、H460 原始细胞株相比较,ROCK2 敲除细胞株的增殖能力均低于未敲除细胞,表明 ROCK2 在促进肺癌细胞增殖方面有重要作用,见图 4。

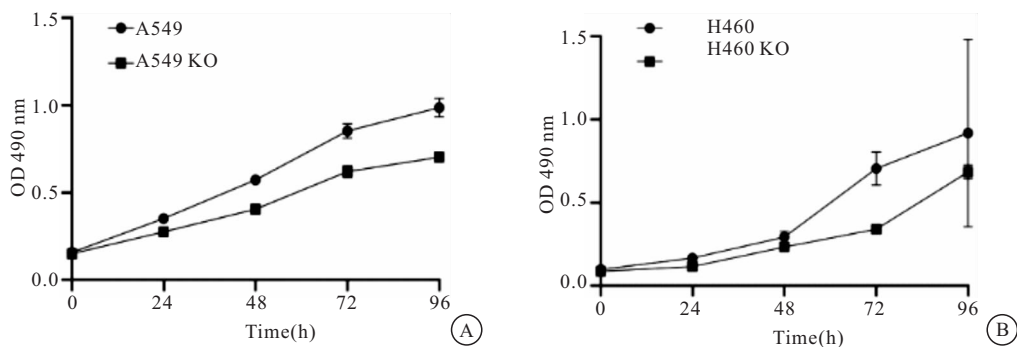


图 3 ROCK2 敲除对肺癌细胞增殖能力的影响

Figure 3 Effect of ROCK2 knockout on the proliferation of lung cancer cells

注: A. A549 与 A549 KO 组各时间点的 OD 值; B. H460 与 H460 KO 组各时间点的 OD 值

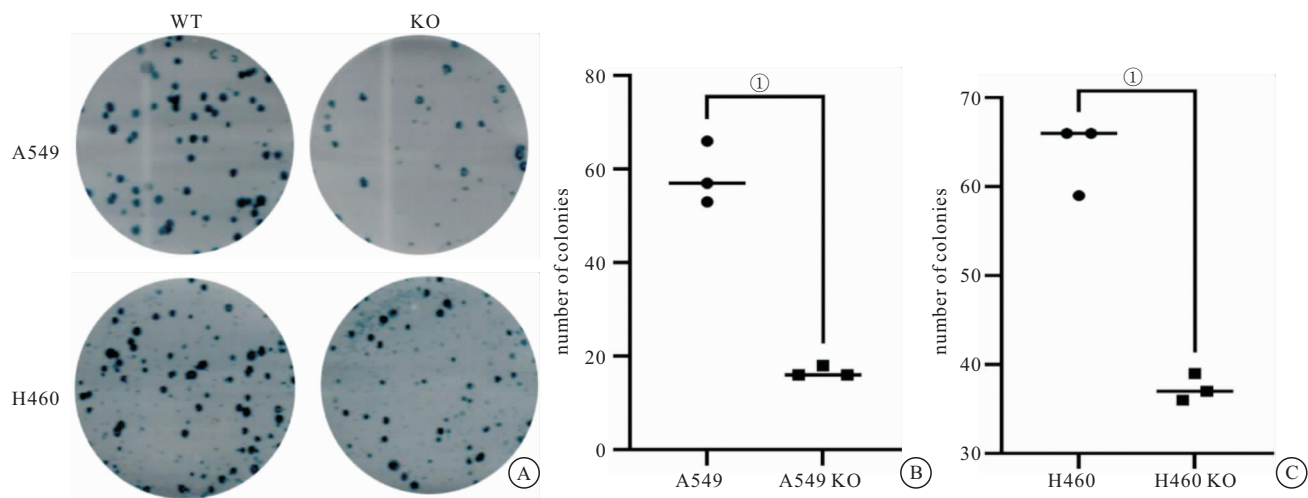


图 4 ROCK2 敲除对肺癌细胞集落形成能力的影响

Figure 4 Effect of ROCK2 knockout on the colony formation ability of lung cancer cells

注: A. A549 与 A549 KO 组、H460 与 H460 KO 组的克隆形成平板; B、C. 各组之间有效细胞克隆数量比较。① $P < 0.001$

3 讨论

ROCK2 是 Rho GTPases 下游效应蛋白研究比较多的靶标之一^[3],也是 Rho/ROCK 信号通路中的关键信号分子,通过调节靶蛋白的活性或磷酸化来调节基因表达^[8]。许多研究表明 ROCK2 对肿瘤细胞转移过程中发生的多种生物学进程具有重要的作用,包括破坏细胞的粘附连接、肌动蛋白细胞骨架重构、细胞簇的解离和增加细胞的运动性等^[3,9-14]。ROCK2 在癌症中过度表达会引起肿瘤细胞迁移和侵袭,参与细胞增殖、细胞形态和运动调节,影响肿瘤的进展和转移^[15]。有研究表明 ROCK2 在肺癌中高表达,它是 NSCLC 独立生长和侵袭所必需的,可能是治疗 NSCLC 的一个靶点^[16]。阻断癌细胞的 ROCK 信号通路能有效地阻止细胞增殖、侵袭和血管生成,从而减少肿瘤的生长和转移。ROCK 抑制剂的效果已在肺癌细胞中得到评估,如使用 ROCK 的抑制剂法舒地尔能抑制 A549 和 95D 肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭^[17-18]。冯飞跃等^[19]用组织芯片联合免疫组化技术

检测了 135 例 NSCLC 和 105 例配对癌旁肺组织中的 ROCK2 表达水平,结果显示在 NSCLC 组织中的 ROCK2 表达远高于癌旁肺组织($P < 0.001$)。患者体内的 ROCK2 在 NSCLC 中的高表达往往提示预后不良,同时也是肺癌患者预后的危险因素。这些证据表明 ROCK2 可能作为一种潜在的肺癌标志物,参与肺癌的发生、发展。虽然目前有研究证实 ROCK2 在肺癌中的表达增加,但其调节肺癌生长的机制研究较少,研究深入了解其在肺癌中的表达及其参与的细胞信号通路机制对于治疗肺癌具有重要意义。

利用 CRISPR/Cas9 编辑系统,可通过靶向肿瘤促进基因、抑制剂治疗相关基因、癌基因和化疗耐药相关基因实现治疗肺癌的目的。近年来,CRISPR/Cas9 编辑系统以其特异性高、时间短、性价比高优点,被认为是一种有效可行的癌症治疗新方法,为肺癌治疗提供了很大的潜力^[20-22]。本研究的 CRISPR/Cas9 编辑系统由 sgRNA(约 20nt,与靶基因序列互

补)引导 Cas9 特异性切割目标基因,造成 DNA 双链断裂(DSBs),在含有外源 DNA 修复供体即是有抗生素耐药选择标记基因存在的情况下,细胞启用高保真同源修复(HDR)机制来对 DSB 进行修复,会导致抗生素耐药基因表达以及目标基因提前终止表达,实现高效的基因定向突变^[23-24]。另外,由多个外显子组成的人类基因在蛋白质翻译时可产生多个蛋白质异构体,所以设计 3 个不同的 sgRNAs 来针对 ROCK2 的基因编码区,可使基因敲除效率大幅提高。

本研究通过 RT-qPCR 技术检测,结果显示在 A549、H460 ROCK2 基因敲除细胞株的 ROCK2 mRNA 表达水平仍有残留表达。分析原因发现,PCR 的引物设计靶点不在 sgRNA 敲除序列上,所以检测仍可扩出 ROCK2 的 mRNA 序列。但是 CRISPR/Cas9 技术作用后插入了 DNA 片段,可能造成移码突变,导致蛋白质无法翻译,且用免疫印迹法也检测不到单克隆细胞中 ROCK2 蛋白质的表达,说明这两株人肺癌 ROCK2 基因敲除稳定细胞株构建成功。

本研究将 Rock-2 CRISPR/Cas9 KO 质粒和 Rock-2 HDR 质粒共转染 A549 细胞和 H460 细胞,嘌呤霉素筛选出阳性细胞并稀释至单个细胞继续培养。免疫印迹法检测单克隆细胞中 ROCK2 蛋白质的表达,结果也证明了细胞株中蛋白 ROCK2 的表达完全缺失。RT-qPCR 检测基因编辑后的 mRNA 基因产物进行分析,结果表明细胞内 ROCK2 mRNA 水平的显著下降($P < 0.05$)。敲除 ROCK2 基因后,克隆形成平板实验以及 MTT 实验的结果均能说明 A549、H460 细胞增殖能力明显下降,提示 ROCK2 正调控肺癌细胞的增殖。这一实验结果也与研究报道的 ROCK2 作为促进细胞增殖的调控分子相吻合。

4 结论

CRISPR/Cas9 系统作为近年来被大量使用的基因编辑技术,是研究基因功能的强有力工具。获得稳定敲除 ROCK2 基因的肺癌细胞株为后续研究 ROCK2 在肺癌细胞中的功能奠定了基础。

【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(3):209-249.

[2] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2020[J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(1):7-30.

[3] JULIAN L, OLSON M F. Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK): structure, regulation, and functions [J]. Small GTPases, 2014, 5:e29846.

[4] WU H, CHEN Y, LI B, *et al.* Targeting ROCK1/2 blocks cell division and induces mitotic catastrophe in hepatocellular carcinoma[J]. Biochem Pharmacol, 2021, 184:114353.

[5] YI H, WANG K, JIN H, *et al.* Overexpression of Rho-Associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase 2 Is Correlated with Clinical Progression and Poor Prognosis in Breast Cancer[J]. Med Sci Monit, 2018, 24:4776-4781.

[6] GONG H, ZHOU L, KHELIFAT L, *et al.* Rho-Associated Protein Kinase (ROCK) Promotes Proliferation and Migration of PC-3 and DU145 Prostate Cancer Cells by Targeting LIM Kinase 1 (LIMK1) and Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2)[J]. Med Sci Monit, 2019, 25:3090-3099.

[7] HUO Z, SU Y, DONG Y, *et al.* Rho-kinase inhibition by Fasudil promotes tumor maturation and apoptosis in small-cell lung cancer[J]. Am J Transl Res, 2020, 12(8):4354-4370.

[8] SCHOFIELD A V, BERNARD O. Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK) signaling and disease[J]. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2013, 48(4):301-316.

[9] CROFT D R, SAHAI E, MAVRIA G, *et al.* Conditional ROCK activation in vivo induces tumor cell dissemination and angiogenesis[J]. Cancer Res, 2004, 64(24):8994-9001.

[10] ETIENNE-MANNEVILLE S, HALL A. Rho GTPases in cell biology[J]. Nature, 2002, 420(6916):629-635.

[11] SAHAI E, MARSHALL C J. ROCK and Dia have opposing effects on adherens junctions downstream of Rho[J]. Nat Cell Biol, 2002, 4(6):408-415.

[12] AMANO M, NAKAYAMA M, KAIBUCHI K. Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity[J]. Cytoskeleton (Hoboken), 2010, 67(9):545-554.

[13] BRYAN B A, DENNSTEDT E, MITCHELL D C, *et al.* RhoA/ROCK signaling is essential for multiple aspects of VEGF-mediated angiogenesis [J]. Faseb j, 2010, 24(9):3186-3195.

[14] OLSON M F, SAHAI E. The actin cytoskeleton in cancer cell motility[J]. Clin Exp Metastasis, 2009, 26(4):273-287.

[15] DU Y, LU S, GE J, *et al.* ROCK2 disturbs MKP1 expression to promote invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma [J]. Am J Cancer Res, 2020, 10(3):884-896.

[16] VIGIL D, KIM T Y, PLACHCO A, *et al.* ROCK1 and ROCK2 are required for non-small cell lung cancer anchorage-independent growth and invasion [J]. Cancer Res, 2012, 72(20):5338-547.

[17] ZHU F, ZHANG Z, WU G, *et al.* Rho kinase inhibitor fasudil suppresses migration and invasion though down-regulating the expression of VEGF in lung cancer cell line A549[J]. Med Oncol, 2011, 28(2):565-571.

[18] YANG X, ZHANG Y, WANG S, *et al.* Effect of fasudil on growth, adhesion, invasion, and migration of 95D lung carcinoma cells in vitro[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2010, 88(9):874-879.

[19] 冯飞跃. 第七版国际肺癌 TNM 分期系统的应用和 ROCK2 在非小细胞肺癌中表达水平及其临床意义的研究[D]. 北京协和医学院, 2012.

- 2020, 41(10): 1085-1090.
- [19] HE W, LIU H, HU L, *et al.* Icarin improves testicular dysfunction via enhancing proliferation and inhibiting mitochondria-dependent apoptosis pathway in high-fat diet and streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2021, 19(1): 168.
- [20] KIM J W, AN H J, YEO H, *et al.* Activation of Hypoxia-Inducible Factor-1 α Signaling Pathway Has the Protective Effect of Intervertebral Disc Degeneration[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(21): 11355.
- [21] ZHOU S, XIE J, YU C, *et al.* CD226 deficiency promotes glutaminolysis and alleviates mitochondria damage in vascular endothelial cells under hemorrhagic shock[J]. *FASEB J*, 2021, 35(11): e21998.
- [22] 王敏. 局灶性脑缺血损伤后 HIF-1 α 双重调节作用的研究进展[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2018, 16(24): 3636-3638.
- [23] TORMOS K V, CHANDEL N S. Inter-connection between mitochondria and HIFs [J]. *J Cell Mol Med*, 2010, 14(4): 795-804.
- [24] LI H S, ZHOU Y N, LI L, *et al.* HIF-1 α protects against oxidative stress by directly targeting mitochondria[J]. *Redox Biol*, 2019, 25: 101109.
- (收稿日期: 2021-09-09; 修回日期: 2022-06-19; 编辑: 张翰林)

(上接第 1264 页)

- [20] JIANG C, LIN X, ZHAO Z. Applications of CRISPR/Cas9 Technology in the Treatment of Lung Cancer[J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2019, 25(11):1039-1049.
- [21] ZHANG H, QIN C, AN C, *et al.* Application of the CRISPR/Cas9-based gene editing technique in basic research, diagnosis, and therapy of cancer[J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1):126.
- [22] HAZAFA A, MUMTAZ M, FAROOQ M F, *et al.* CRISPR/Cas9: A powerful genome editing technique for the treatment of cancer cells with present challenges and future directions[J]. *Life Sci*, 2020, 263:118525.
- [23] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. *Science (New York, N. Y.)*, 2012, 337(6096): 816-821.
- [24] PAWELCZAK K S, GAVANDE N S, VANDERVERE-CAROZZA P S, *et al.* Modulating DNA Repair Pathways to Improve Precision Genome Engineering[J]. *ACS Chem Biol*, 2018, 13(2):389-396.
- (收稿日期: 2022-01-01; 修回日期: 2022-02-15; 编辑: 张翰林)

《西部医学》可直接使用缩写的常用词汇

缩略语	中文全称	缩略语	中文全称	缩略语	中文全称
AFP	甲胎蛋白	AIDS	获得性免疫缺陷综合征(艾滋病)	ALB	白蛋白
ALT	丙氨酸氨基转移酶	APTT	活化部分凝血活酶时间	AST	天冬氨酸氨基转移酶
AUC	曲线下面积	BMI	体重指数	BUN	尿素氮
Ccr	肌酐清除率	CEA	癌胚抗原	CRPC	反应蛋白
D-BIL	直接胆红素	ECG	心电图	eGFR	估算肾小球滤过率
ESR	血沉	FBS	胎牛血清	FIB	纤维蛋白原
GFR	肾小球滤过率	GGT	γ 谷氨酰转肽酶	Hb	血红蛋白
HBeAb	乙型肝炎病毒核心抗体	HBeAg	乙型肝炎病毒 e 抗原	HBsAg	乙型肝炎病毒表面抗原
HBsAb	乙型肝炎病毒表面抗体	HBV	乙型肝炎病毒	HCG	人绒毛膜促性腺激素
HCV	丙型肝炎病毒	HDL-C	高密度脂蛋白胆固醇	HIV	人类免疫缺陷病毒
HLA	人类白细胞抗原	IFN	干扰素	IL	白细胞介素
INR	国际标准化比值	LDL-C	低密度脂蛋白胆固醇	MIC	最小抑菌浓度
MRI	磁共振成像	NF-B	核因子 κ -B	NK	细胞自然杀伤细胞
PaCO ₂	动脉血二氧化碳分压	PaO ₂	动脉血氧分压	PBS	磷酸盐缓冲液
PSA	前列腺特异性抗原	PT	凝血酶原时间	PET	正电子发射断层扫描
PLT	血小板计数	PPD	结核菌素试验	RBC	红细胞计数
RCT	随机对照试验	ROC	曲线接受者操作特性曲线	SARS	严重呼吸窘迫综合征
SCr	血肌酐	SPECT	单光子发射计算机断层成像术	T3	三碘甲状原氨酸
T4	四碘甲状原氨酸(甲状腺素)	T-BIL	总胆红素	TC	总胆固醇
TG	甘油三酯	Th	辅助性 T 淋巴细胞	TNF	肿瘤坏死因子
TP	总蛋白	WBC	白细胞计数	WHO	世界卫生组织