

· 基础研究 ·

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2022.01.003

MLL5 基因敲除对小鼠结肠癌 CT26 细胞移植瘤生长的影响及其机制

石秀珍,高玮,徐萍[上海交通大学医学院附属松江医院(筹) 消化内科,上海 201600]

[摘要] **目的:**探讨混合谱系白血病 5(MLL5)基因在小鼠结肠癌 CT26 细胞移植瘤生长中的作用及其分子机制。**方法:**利用 CRISPR/Cas9 技术构建 MLL5 基因缺失、MLL5 和 DDX58 双基因缺失的结肠癌 CT26 细胞模型,用 Sanger 测序和 WB 法验证敲除效果。将基因敲除的 CT26 细胞接种到野生型 BALB/c 小鼠和免疫缺陷型 NSG 小鼠皮下,构建基因缺失结肠癌 CT26 细胞移植瘤小鼠模型,并观察移植瘤的生长及荷瘤小鼠的总生存期(OS)。**结果:**在野生型小鼠中,MLL5 基因缺失的 CT26 细胞移植瘤生长速度显著性低于野生型细胞移植瘤,并延长荷瘤小鼠的 OS($P<0.01$);在 NSG 小鼠中,MLL5 基因缺失对 CT26 细胞移植瘤的生长速度以及荷瘤小鼠的 OS 没有明显改变。MLL5 基因缺失提高了癌细胞中视黄酸诱导基因 1(RIG-1)蛋白水平,DDX58 基因缺失可逆转 MLL5 基因缺失在 CT26 细胞移植瘤中的作用。**结论:**MLL5 基因缺失可提高结肠癌 CT26 细胞中 RIG-1 蛋白水平、促进肿瘤免疫,从而抑制荷瘤小鼠肿瘤生长,提示 MLL5 可能成为结肠癌治疗的新靶点。

[关键词] 结肠癌;混合谱系白血病 5;视黄酸诱导基因 1;CT26 细胞;肿瘤免疫;CRISPR/Cas9 技术

[中图分类号] R735.3⁵; R730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2022)01-0018-05

Effect and mechanism of MLL5 knock-out on the growth of colon cancer CT26 cell transplanted tumor

SHI Xiuzhen, GAO Wei, XU Ping (Gastroenterology Department, Songjiang Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine [Preparatory Stage], Shanghai 201600, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of mixed lineage leukemia 5 (MLL5) gene on growth of colon cancer CT26 cell transplanted tumors in mice and its molecular mechanism. **Methods:** The colon cancer CT26 cell model with MLL5 gene deletion or double deletion of MLL5 and DDX58 (encoding RIG-1 gene) was constructed using CRISPR/Cas9 technology, and the knock-out efficiency was verified using Sanger sequencing and WB. Then, the constructed CT26 cells were inoculated into the scapular subcutaneous tissues of wild BALB/c mice and immunodeficient mice (NSG) to establish the gene-deficient CT26 cell transplanted tumor model. The tumor growth and the overall survival (OS) of tumor-bearing mice were observed. **Results:** In wild BALB/c mice, MLL5 gene depletion significantly slowed the tumor growth down and prolonged the OS of mice as compared with the mice transplanted with CT26 cells with normal MLL5 expression ($P<0.01$). However, in immunodeficient NSG mice, MLL5 gene depletion had no significant effect on the tumor growth and OS of host mice. MLL5 knockout increased the protein level of retinoic acid inducible gene-1 (RIG-1) in cancer cells, while DDX58 gene deletion could reverse the effect of MLL5 knockout on CT26 cell transplanted tumors. **Conclusion:** MLL5 knockout can increase RIG-1 protein level in CT26 cells and promote tumor immunity to inhibit tumor growth in tumor-bearing mice, suggesting that MLL5 may become a new target for colon cancer treatment.

[Key words] colon cancer; mixed lineage leukemia 5 (MLL5); retinoic acid inducible gene-1 (RIG-1); CT 26 cell; tumor immunity; CRISPR/Cas9 technology

[Chin J Cancer Biother, 2022, 29(1): 18-22. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.01.003]

混合谱系白血病 5(mixed lineage leukemia 5, MLL5) 基因属于 TrxG 基因家族,是重要的表观遗传学调控基因和人急性髓细胞性白血病的重要致病基因^[1]。MLL5 诱导组蛋白 H3K4 转移酶参与肿瘤的广泛生物学过程^[2]。有研究结果^[3-5]表明,MLL5 基因缺失的小鼠会导致造血干细胞(hemopoietic stem cell, HSC)的自我更新能力受损,并引起 HSC 中 DNA 损伤和活性氧积累^[6]。此外,MLL5 在固有免疫中也起重要作用,参与视黄酸诱导基因 1(retinoic acid inducible gene-1, RIG-1)蛋白和 E3 泛

素连接酶 STUB1 之间的相互作用,MLL5 基因缺失直接减弱 RIG-1 和 STUB1 的相互作用,降低 RIG-1 泛素化,增加 RIG-1 蛋白表达水平^[7]。有趣的是,RIG-1 在结肠癌的肿瘤免疫中起重要作用,DDX58 基因缺失后的黑色素瘤 B16 细胞和结肠癌 CT26 细胞抵抗 CTLA-4 单抗

[基金项目] 上海市卫生和计划生育委员会青年项目(No. 2019Y0462)

[作者简介] 石秀珍(1989—),女,硕士,住院医师,主要从事消化内科临床医学研究,E-mail: sxz20190917@163.com

[通信作者] 徐萍,E-mail: sjzxpp@yeah.net

治疗作用,而激活RIG-1可以显著缩小B16和CT26细胞移植瘤体积并延长荷瘤小鼠总生存期(OS)^[8-10]。然而,MLL5在结肠癌中的作用及其机制尚未明了。本研究利用CRISPR/Cas9基因编辑技术构建MLL5基因缺失及MLL5和DDX58双基因缺失的结肠癌CT26细胞模型,并将其接种到野生型BALB/c小鼠和免疫缺陷型NSG小鼠皮下,观察移植瘤的生长及荷瘤小鼠的OS,以期确定MLL5在小鼠结肠癌及肿瘤免疫中的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞系、实验动物及主要试剂

人胚肾上皮细胞系293T和小鼠结肠癌细胞系CT26购于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。6周龄、雄性野生型BALB/c小鼠和NSG小鼠(动物合格证:20170005023369)购于上海斯莱克公司。

PBS缓冲液、DMEM高糖培养基、RPMI 1640培养基、Opti-MEM培养基、0.25%胰蛋白酶、胎牛血清和青霉素-链霉素溶液均购于美国Gibco公司, FastDigest *Esp3* I、转染试剂Lipofectamine 2000购于美国Thermo公司,助慢病毒感染试剂聚凝胺polybrene购于美国Sigma公司,无内毒素质粒中量提取试剂盒购于天根生化科技有限公司, pSPAX、pMD2.G、lentiCRISPRv2和lentiGuide-BSD质粒购于美国Addgene公司, Stb13感受态购于唯地生物公司,兔抗鼠RIG-1购于Proteintech公司,兔抗鼠MLL5购于美国Active Motif公司,兔抗鼠 β -actin购于Abclonal公司,荧光羊抗兔IgG二抗购于美国LI-COR公司。

1.2 CRISPR/Cas9载体构建、包装和慢病毒合成及感染

利用<http://crispr.mit.edu/>网站在线工具,设计靶向MLL5和DDX58的sgRNA。MLL5-sgRNA1#引物序列:上游为5'-CACCGATGTAACCAGGTGCATATG-3',下游为5'-AAACCATATGCACCTGGTTACATC-3'; MLL5-sgRNA2#引物序列:上游为5'-CACCGATGTCATGACGTTTCGCCTC-3',下游为5'-AAACGAGGCGAACGTCATGAGCATC-3'; DDX58-sgRNA1#引物序列:上游为5'-CACCGCGTTGGAGATGCTAAGACCG-3',下游为5'-AAACCGGTCTTAGCATCTCCAACGC-3'; DDX58-sgRNA2#引物序列:上游为5'-CACCGTCCGCCAGAGATGAACGAAG-3',下游为5'-AAACCTTCGTTTCATCTCTGGCGGAC-3'; NTC-sgRNA引物序列:上游为5'-CACCGGCGAGGTATTCGGCTCCGCG-3',下游为5'-AAACCGCGGAGCCGATACCTCGCC-3'。

LentiCRISPRv2和lentiGuide-BSD慢病毒质粒经*Esp3* I酶切后琼脂糖凝胶电泳回收,磷酸化退火引

物,将退火后的MLL5-sgRNA、DDX58-sgRNA和NTC-sgRNA DNA片段连接到lentiCRISPRv2或lentiGuide-BSD载体上。连接反应体系如下:50 ng *Esp3* I酶切的lentiCRISPRv2或lentiGuide-BSD线性化质粒、0.1 pmol/L磷酸化退火片段、5 μ L 2 $\times$ Quick DNA ligase (DNA连接酶) Buffer、1 μ L Quick DNA ligase在室温连接10 min^[11]。连接产物转化Stb13大肠杆菌感受态细胞并挑选阳性克隆测序验证。按照无内毒素质粒中量提取试剂盒说明书抽提质粒。

将293T细胞接种到100 mm培养皿(3×10^6 个/皿),置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中过夜。按照Lipofectamine 2000说明书进行转染,每个培养皿的质粒用量为7.5 μ g lentiCRISPRv2 sgRNA或lentiGuide-BSD sgRNA质粒、5 μ g pSPAX2和2.5 μ g pMD2.G, Lipofectamine 2000:质粒为2:1。转染24 h时更换新鲜培养基,48 h后收集含有慢病毒的上清液。

1.3 基因敲除CT26细胞系的建立

将小鼠结肠癌CT26细胞置于含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素的RPMI 1640完全培养基中培养。将对数生长期的CT26细胞消化后,接种到24孔板(3×10^4 个/孔)中,第2天吸去培养液,加入用RPMI 1640完全培养基1:1稀释的lentiCRISPRv2-MLL5 sgRNA或lentiCRISPRv2-NTC sgRNA慢病毒,并加入终质量浓度8 μ g/mL慢病毒助感染试剂polybrene,混匀后置于37 $^{\circ}$ C培养箱培养24 h时换新鲜RPMI 1640完全培养基。感染48 h时,加入含有20 μ g/mL嘌呤霉素的RPMI 1640完全培养基,筛选被感染的细胞。筛选48 h后未感染病毒的对照组细胞全部死亡,消化细胞并利用稀释法接种到96孔板,标记单细胞孔,待单克隆细胞扩增后检测MLL5蛋白的表达,另外提取单克隆细胞株基因组通过PCR扩增MLL5 sgRNA靶向基因区域序列进行Sanger测序。

利用MLL5 sgRNA1#克隆系同上述步骤感染lentiGuide-BSD-DDX58 sgRNA1#、lentiGuide-BSD-DDX58 sgRNA2#或lentiGuide-BSD-NTC sgRNA病毒,挑取MLL5和RIG-1双基因缺失的克隆细胞系用于MLL5调控RIG-1的研究。

1.4 WB法检测CT26细胞中MLL5、RIG-1蛋白表达

收集各组细胞,加入RIPA裂解液裂解细胞,4 $^{\circ}$ C、12 000 $\times$ g离心15 min后取上清,用BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。用10%SDS-PAGE分离蛋白质,将蛋白质转移至NC膜上。5%脱脂奶粉室温封闭1 h,加入MLL5(1:1 000)、RIG-1(1:1 000)和 β -actin(1:10 000)一抗4 $^{\circ}$ C过夜。TBST洗涤3次(10 min/次),加入羊抗兔IgG二抗(1:10 000)室温下处理1 h,洗膜后用CLX

Odyssey LICOR 双色红外激光成像系统扫描并成像,利用 Image Studio 软件分析蛋白条带的灰度值。实验重复3次。

1.5 结肠癌 CT26 细胞移植瘤小鼠模型的建立和观察

BALB/c 小鼠和 NSG 小鼠饲养于 SPF(无特定病原体)级动物房,温度维持 22 °C,相对湿度 30%~70%,人工照明,昼夜明暗 12 h 交替。所有实验动物相关的操作均经上海市松江区中心医院实验动物伦理委员会审核并批准。

将 NSG 小鼠和 BALB/c 小鼠分别随机分成 3 组: Control sgRNA 组、MLL5 sgRNA1# 组和 MLL5 sgRNA2# 组,8 只/组。将 24 只 BALB/c 小鼠随机分为 3 组: Control sgRNA 组、MLL5 sgRNA1#+DDX58 sgRNA1# 组和 MLL5 sgRNA1#+DDX58 sgRNA2# 组。将处于对数生长期的 CT26 细胞消化制备成细胞悬液,用不含血清的 RPMI 1640 培养基调整细胞密度为 2×10^6 个/mL。取 100 μ L 细胞悬液接种到小鼠背部皮下,每只小鼠细胞接种量为 2×10^5 个。从接种第 7 天起,每 3 d 监测肿瘤块体积一次,用游标卡尺测量肿

瘤块最长和最短直径,计算肿瘤体积。肿瘤体积=(瘤体长径 $\times$ 瘤体短径²)/2。当最长径达到 15 mm 时达到伦理终点,将小鼠安乐死,以获取移植瘤标本。

1.6 统计学处理

采用 Origin 9 软件进行统计学分析。符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建敲除 MLL5 基因的 CT26 细胞系

Sanger 测序检测结果(图 1A)显示,MLL5 sgRNA1# 单克隆 CT26 细胞系基因组中 MLL5 基因分别缺失 2 bp 和插入 1 bp;MLL5 sgRNA2# 单克隆分别缺失 4 bp 和 1 bp。WB 法检测结果(图 1B)显示,MLL5 sgRNA1# 和 MLL5 sgRNA2# 单克隆细胞均不表达 MLL5 蛋白。结果表明,成功构建 MLL5 基因敲除的结肠癌 CT26 细胞系,可以用于后续实验。

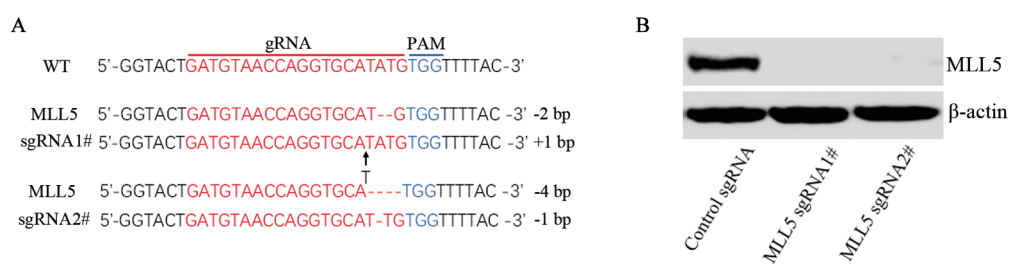


图1 Sanger测序(A)和WB法(B)验证 MLL5 基因敲除效果

2.2 MLL5 基因缺失上调 CT26 细胞中 RIG-1 表达水平

WB 实验结果(图 2)显示,MLL5 sgRNA1# 和 MLL5 sgRNA2# 组 CT26 细胞中 RIG-1 水平显著高于 Control sgRNA 组 CT26 细胞(均 $P < 0.01$)。结果表明,MLL5 基因敲除可显著上调 CT26 细胞中 RIG-1 蛋白的表达水平。

2.3 MLL5 基因敲除抑制野生型小鼠 CT26 细胞移植瘤的生长并延长 OS

小鼠荷瘤实验结果显示,在免疫缺陷 NSG 小鼠中 Control sgRNA 和 MLL5 sgRNA CT26 细胞移植瘤体积比较差异无统计学意义(图 3A),而在野生型 BALB/c 小鼠中 MLL5 sgRNA1# 和 MLL5 sgRNA2# 组 CT26 细胞移植瘤的体积显著小于 Control sgRNA 组(均 $P < 0.01$,图 3B)。同样,MLL5 基因敲除对种植 CT26 细胞的 NSG 小鼠的 OS 无显著影响(图 3C),而在野生型小鼠中 CT26 细胞敲除 MLL5 基因可以显著延长荷瘤小鼠的 OS 率(图 3D)。实验结果表明,在小鼠结肠癌 CT26 细胞移植瘤模型中,MLL5 基因敲除可增强野生型小鼠对 CT26 细胞移植瘤的免疫作用。

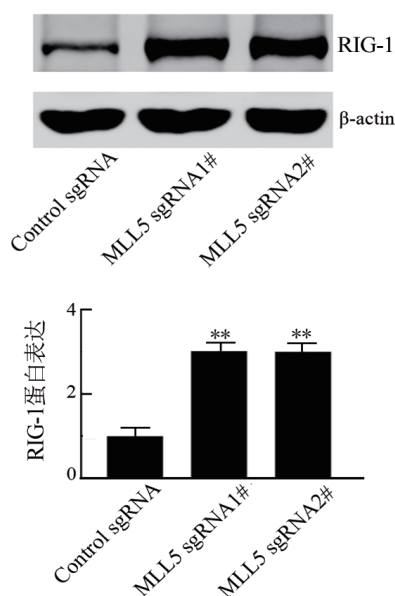
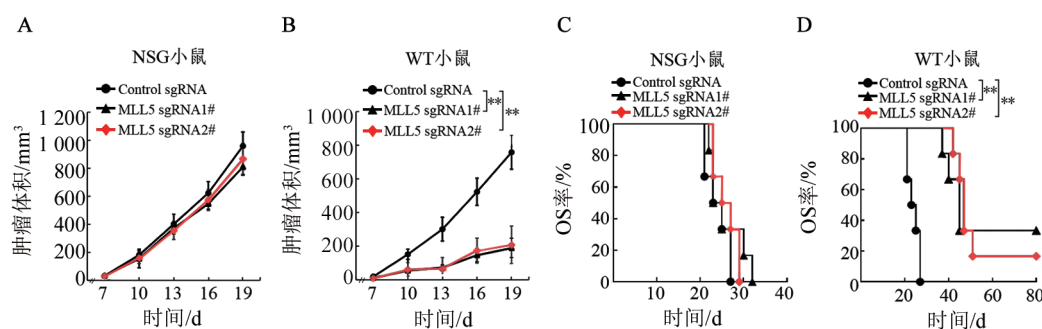


图2 WB法检测 MLL5 基因敲除后 CT26 细胞中 RIG-1 蛋白的表达



与 Control sgRNA 组比较, * $P < 0.01$

图3 MLL5基因敲除对各组裸鼠CT26细胞移植瘤体积(A、B)和荷瘤小鼠OS率(C、D)的影响

2.4 CT26细胞缺失MLL5增强肿瘤免疫依赖于RIG-1

MLL5基因敲除可增强肿瘤免疫而显著抑制野生型BALB/c小鼠CT26细胞移植瘤的生长和延长荷瘤小鼠的OS。为验证MLL5基因敲除是否通过提高RIG-1表达水平而增强肿瘤免疫,在MLL5 sgRNA1#CT26细胞中同时敲除DDX58基因后,WB法检测结果(图4A)显示,DDX58 sgRNA1#和DDX58 sgRNA2#敲除成功。将Control sgRNA、

MLL5和DDX58双基因缺失的CT26细胞接种于野生型BALB/c小鼠,结果显示Control sgRNA、MLL5 sgRNA1#+DDX58 sgRNA1#和MLL5 sgRNA1#+DDX58 sgRNA2#三组小鼠CT26细胞移植瘤体积和小鼠的OS差异比较均无统计学意义(均 $P > 0.05$,图4B、C)。实验结果表明,MLL5基因敲除增强肿瘤免疫依赖于RIG-1。

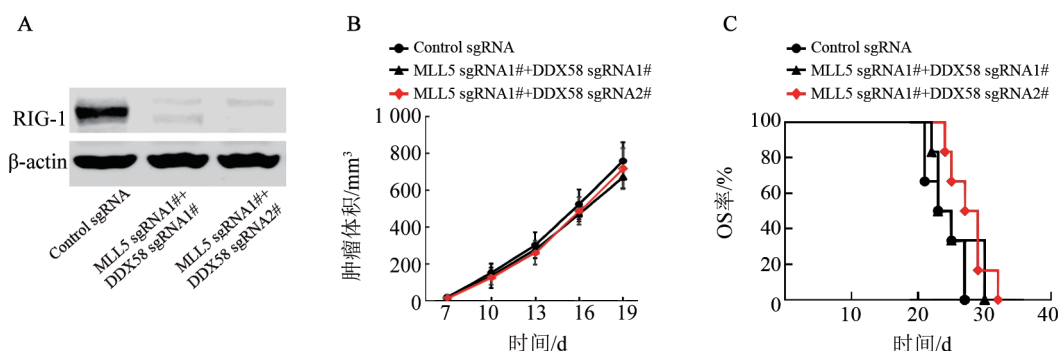


图4 同时敲除MLL5和DDX58基因对RIG-1表达(A)、CT26细胞移植瘤体积(B)和荷瘤小鼠OS率(C)的影响

3 讨论

结肠癌是消化道中常见的恶性肿瘤之一,在中国以41~65岁人群发病率最高,其发病率和病死率均呈逐年上升趋势^[12]。目前结肠癌仍以手术为主,但复发率高,初诊已是转移患者的5年OS率不到10%^[13]。近年来,免疫治疗已成为肿瘤治疗的重要手段,其中靶向免疫检查点程序性死亡蛋白-1(PD-1)和细胞毒性T淋巴细胞相关抗原-4(CTLA-4)已经被证明是一种有效的治疗方法^[14-15]。临床上,抗PD-1单抗纳武单抗和派姆单抗被用于治疗结直肠癌患者,在部分结直肠癌亚型患者中具有较高的免疫应答率^[16-17]。但是单纯的抑制免疫检查点疗法仅对部分结直肠癌亚型患者表现出良好的免疫应答率,而大部分患者免疫应答率仍然较低,因此仍需要研究新的免疫治疗

靶点以降低癌细胞的免疫逃逸和免疫耐受。本研究结果发现,敲除小鼠结肠癌CT26细胞中MLL5基因后可以上调RIG-1水平,提高移植瘤的肿瘤免疫,提示MLL5可能成为结肠癌免疫治疗的新靶点。

MLL5通过促进RIG-1降解而加强在宿主抗病毒免疫反应中的负调控作用,位于细胞质中的MLL5通过与RIG-1和RIG-1的E3连接酶STUB1结合,促进K48连接多泛素化和RIG-1的蛋白酶体降解^[7, 18]。MLL5基因缺失减弱了RIG-1和STUB1之间的相互作用并减少了K48连接的多泛素化,从而增加细胞中RIG-1的积累。MLL5基因缺失促进体内外INF- α 、促炎细胞因子的产生以及对RNA病毒的天然抗病毒免疫应答^[19];在病毒感染后,MLL5从细胞核转移到细胞质中,以诱导STUB1介导的RIG-1降解^[7]。本研究结果发现,MLL5基因缺失后小鼠结肠癌CT26细

胞中 RIG-1 水平显著提高,其通过增强肿瘤免疫而抑制 CT26 细胞移植瘤的生长。

在 NSG 小鼠中, MLL5 基因缺失和野生型小鼠结肠癌 CT26 细胞移植瘤的生长速度以及荷瘤小鼠的 OS 比较差异无统计学意义,说明 MLL5 基因缺失对 CT26 细胞的增殖没有显著性影响。在免疫系统正常的野生型小鼠中, MLL5 基因缺失的结肠癌 CT26 细胞移植瘤的生长速度显著低于野生型细胞移植瘤,同样 MLL5 基因缺失的 CT26 细胞荷瘤小鼠的 OS 显著延长,说明 MLL5 基因缺失的抗肿瘤作用依赖于小鼠免疫系统。然而, MLL5 和 RIG-1 双基因缺失后又显著逆转 MLL5 基因缺失的作用,因此 MLL5 基因缺失通过上调 RIG-1 水平而增强野生型小鼠对 CT26 细胞移植瘤的免疫作用。

综上所述,本研究发现 MLL5 基因缺失可上调结肠癌 CT26 细胞中 RIG-1 水平,增强野生型小鼠肿瘤免疫、抑制移植瘤生长并延长荷瘤小鼠 OS。本研究采用的 MLL5 基因缺失的 CT26 细胞仅在 NSG 小鼠和 BALB/c 野生型小鼠中验证,未能在 MLL5 基因缺失的小鼠中验证。因此 MLL5 能否成为结肠癌治疗的新靶点还需进一步研究。

【参 考 文 献】

- [1] HEUSER M, YUN H Y, THOL F. Epigenetics in myelodysplastic syndromes[J/OL]. *Semin Cancer Biol*, 2018, 51: 170-179[2021-05-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7116652/>. DOI:10.1016/j.semcancer.2017.07.009.
- [2] ZHANG X M, NOVERA W, ZHANG Y, *et al.* MLL5 (KMT2E): structure, function, and clinical relevance[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(13): 2333-2344. DOI:10.1007/s00018-017-2470-8.
- [3] ZHANG Y, WONG J, KLINGER M, *et al.* MLL5 contributes to hematopoietic stem cell fitness and homeostasis[J/OL]. *Blood*, 2009, 113(7): 1455-1463[2021-05-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2644073/>. DOI:10.1182/blood-2008-05-159905.
- [4] HEUSER M, YAP D B, LEUNG M, *et al.* Loss of MLL5 results in pleiotropic hematopoietic defects, reduced neutrophil immune function, and extreme sensitivity to DNA demethylation[J]. *Blood*, 2009, 113(7): 1432-1443. DOI:10.1182/blood-2008-06-162263.
- [5] MADAN V, MADAN B, BRYKCYNSKA U, *et al.* Impaired function of primitive hematopoietic cells in mice lacking the Mixed-Lineage-Leukemia homolog MLL5[J]. *Blood*, 2009, 113(7): 1444-1454. DOI:10.1182/blood-2008-02-142638.
- [6] GALLO M, COUTINHO F J, VANNER R J, *et al.* MLL5 orchestrates a cancer self-renewal state by repressing the histone variant H3.3 and globally reorganizing chromatin[J]. *Cancer Cell*, 2015, 28(6): 715-729. DOI:10.1016/j.ccell.2015.10.005.
- [7] ZHOU P P, DING X D, WAN X L, *et al.* MLL5 suppresses antiviral innate immune response by facilitating STUB1-mediated RIG-I degradation[J/OL]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1243[2021-05-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5871759/>. DOI: 10.1038/s41467-018-03563-8.
- [8] HEIDEGGER S, WINTGES A, STRITZKE F, *et al.* RIG-I activation is critical for responsiveness to checkpoint blockade[J/OL]. *Sci Immunol*, 2019, 4(39): eaau8943[2021-05-09]. <https://www.science.org/doi/10.1126/sciimmunol.aau8943>. DOI:10.1126/sciimmunol.aau8943.
- [9] RUZICKA M, KOENIG L M, FORMISANO S, *et al.* RIG-I-based immunotherapy enhances survival in preclinical AML models and sensitizes AML cells to checkpoint blockade[J/OL]. *Leukemia*, 2020, 34(4): 1017-1026[2021-05-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7214254/>. DOI:10.1038/s41375-019-0639-x.
- [10] JACOBSON M E, WANG-BISHOP L, BECKER K W, *et al.* Delivery of 5'-triphosphate RNA with endosomolytic nanoparticles potently activates RIG-I to improve cancer immunotherapy[J]. *Biomater Sci*, 2019, 7(2): 547-559. DOI:10.1039/c8bm01064a.
- [11] 李蕊, 杨柳, 李金洁, 等. 通过 CRISPR/Cas9 技术抑制 TFD3P 基因对前列腺癌 PC3 细胞生物学功能的影响[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2021, 28(5):443-450. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2021.05.004.
- [12] 张宇涛. 结直肠癌的治疗进展[J]. *山西医药杂志*, 2020, 49(5): 535-536. DOI:10.3969/j.issn.0253-9926.2020.05.012.
- [13] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, *et al.* Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132. DOI: 10.3322/caac.21338.
- [14] 陈功. 2019 年结直肠癌治疗进展盘点[J]. *肿瘤综合治疗电子杂志*, 2020, 6(1): 80-89. DOI:10.12151/JMCM.2020.01-10.
- [15] 顾炎, 曹雪涛. 肿瘤免疫与免疫治疗: 机遇与挑战[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2021, 28(1):1-10. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X. 2021. 01.001.
- [16] LE D T, DURHAM J N, SMITH K N, *et al.* Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade [J/OL]. *Science*, 2017, 357(6349): 409-413[2021-05-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5576142/>. DOI: 10.1126/science.aan6733.
- [17] OVERMAN M J, MCDERMOTT R, LEACH J L, *et al.* Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study[J/OL]. *Lancet Oncol*, 2017, 18(9): 1182-1191[2021-05-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6207072/>. DOI:10.1016/S1470-2045(17)30422-9.
- [18] ZHAO K, ZHANG Q, LI X, *et al.* Cytoplasmic STAT4 promotes antiviral type I IFN production by blocking CHIP-mediated degradation of RIG-I[J]. *J Immunol*, 2016, 196(3): 1209-1217. DOI: 10.4049/jimmunol.1501224.
- [19] KHAN M I, NUR S M, ADHAMI V, *et al.* Epigenetic regulation of RNA sensors: Sentinels of immune response[J/OL]. *Semin Cancer Biol*, 2021: S1044-579X(21)00009-2[2021-05-09]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1044579X21000092?via%3Dihub>. DOI: 10.1016/j.semcancer.2020.12.028.

【收稿日期】 2021-07-10

【修回日期】 2021-11-28

【本文编辑】 党瑞山