

## 论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.11.004

网络首发 [http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200223.1959.006.html\(2020-02-24\)](http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200223.1959.006.html(2020-02-24))CRISPR/Cas 9 系统构建敲除 FN 表达的卵巢癌  
稳定表达细胞系研究霍茜瑜<sup>1</sup>,邵艳宏<sup>1</sup>,程 优<sup>2</sup>,刘亚珊<sup>1</sup>,李 雪<sup>1</sup>,刘运德<sup>1</sup>,鲍会静<sup>3△</sup>

(1.天津医科大学医学技术学院 300203;2.天津医科大学朱宪彝纪念医院 300400;

3.天津市南开医院精准整合医学实验室 300100)

**[摘要]** **目的** 利用 CRISPR/Cas 9 系统在人卵巢癌细胞系 OVCAR3 中构建敲除纤维连接蛋白(FN)表达的  
稳定表达细胞系。**方法** 检测 4 株卵巢癌细胞系 FN 表达情况。使用 E-CRISP 网站设计针对 FN 基因的  
向导 RNA(sgRNA)序列,将序列连接到 lenti-CRISPR-V2 质粒后转染高表达 FN 的 OVCAR3 细胞。鉴定构  
建的细胞系 FN 表达情况。**结果** 在 4 株细胞系中选择高表达 FN 的 OVCAR3 细胞转入测序结果正确的 len-  
ti-CRISPR-V2-FN-sgRNA 重组质粒,q-PCR 和 Western blot 方法验证结果显示,其成功降低了卵巢癌  
OVCAR3 细胞的 FN 的表达水平。**结论** CRISPR/Cas 9 系统能建立敲除 FN 表达的卵巢癌稳定表达细胞系。

**[关键词]** 卵巢肿瘤;纤维连接蛋白;基因敲除技术;CRISPR/Cas 9**[中图分类号]** R711**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2020)11-1737-05Construction of a stable cell line of ovarian cancer with FN knockout  
by using CRISPR/Cas 9 systemHUO Qianyu<sup>1</sup>,SHAO Yanhong<sup>1</sup>,CHENG You<sup>2</sup>,LIU Yashan<sup>1</sup>,LI Xue<sup>1</sup>,LIU Yunde<sup>1</sup>,BAO Huijing<sup>3△</sup>

(1. School of Medical technology, Tianjin Medical University, Tianjin 300203, China;

2. Zhu Xianyi Memorial Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300400, China;

3. Integrative Medical Diagnosis Laboratory, Nankai Hospital, Tianjin 300100, China)

**[Abstract]** **Objective** To construct a stable cell line of ovarian cancer with fibronectin (FN) gene  
knockout in human ovarian cancer cell line OVCAR3 by CRISPR/Cas 9 system. **Methods** The expression of  
FN in four ovarian cancer cell lines were detected. The small guide RNA(sgRNA) sequences for FN were de-  
signed using E-CRISP website, and the sgRNA sequences were linked to lenti-CRISPR-V2 plasmid and trans-  
fected into OVCAR3 cell line with high expression of FN. Then the expression of FN in the constructed cell  
line was identified. **Results** OVCAR3 with high expression of FN, was selected and transfected the correct  
lenti-CRISPR-V2-FN-sgRNA plasmid. The q-PCR and Western blot results showed that the expression of FN  
in ovarian cancer cell line OVCAR3 was reduced as expectably. **Conclusion** The stable cell line of ovarian  
cancer with FN gene knockout has been successfully established by CRISPR/Cas 9 system.

**[Key words]** ovarian neoplasms; fibronectin; gene knockout techniques; CRISPR/Cas 9

卵巢癌是女性的三大恶性肿瘤之一,是恶性程度最高的妇科癌症。据我国国家癌症中心 2016 年发布的卵巢癌发病与死亡分析报告,2010 年全国卵巢癌新发病例约 4.15 万例,死亡病例约 1.76 万例。卵巢癌发病率为 6.47/10 万,中国人口标化发病率为 5.22/10 万,世界人口标化发病率为 4.97/10 万,累积发病率(0~74 岁)为 0.53%<sup>[1]</sup>。由于卵巢位置居于盆腔深部,且缺乏有效的早期诊断手段,在三大恶性肿瘤中,虽发病率低于子宫内膜癌和宫颈癌,但病死率却居首位,约有 70% 的患者在确诊时已经进入疾

进展期<sup>[2]</sup>,位于女性癌症相关死因的第 5 位<sup>[3]</sup>。

纤维连接蛋白(fibronectin, FN)是由基因 FN 编码的大型糖蛋白。FN 以可溶和不可溶两种形式存在。可溶的血浆型 FN 主要由肝细胞分泌,是由二硫键连接的同源二聚体,广泛分布在血浆及各种体液中;而不可溶的细胞型 FN 主要由成纤维细胞及其他细胞分泌,以二聚体或不溶的多聚纤维的形式分布于细胞表面、基膜、细胞间及细胞外基质中<sup>[4-5]</sup>。

本文研究 CRISPR/Cas9 系统在人类卵巢癌细胞系 OVCAR3 中敲除 FN 表达,建立低表达 FN 的稳定

表达细胞系,为后续研究 FN 在卵巢癌发生、发展、治疗中的作用提供前期基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 生物材料

卵巢癌细胞系 A2780、OVCAR3、skov3、CAOV-3 均购自南京科佰生物科技有限公司;感受态细胞 DH5 $\alpha$ (CB101)购自天根生化科技有限公司;lenti-CRISPR-V2 质粒、胚肾细胞 293T 为天津医科大学医学检验学院实验室留存。实验中涉及的引物合成和质粒测序由上海生工生物有限公司完成。

#### 1.1.2 主要试剂

FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒(KR106)、SuperReal PreMix Plus (SYBR Green) 试剂盒(FP205)、普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(DP209)、无内毒素质粒大提试剂盒(DP117)均购自天根生化科技有限公司;FN ELISA 试剂盒(LH-E10073HU)购自北京六合生物技术有限公司。T4 PNK、T4 Ligase、10 $\times$ T4 Ligation Buffer、10 mmol/L ATP 购自美国 New England Biolabs 公司;FastDigest BsmBI、FastAP、10 $\times$ FastDigest Buffer 购自加拿大 Fermentas 公司;DMEM 高糖培养基、RPMI-1640 培养基及胎牛血清购自美国 Gibco 公司;鼠源 FN 抗体、鼠源  $\beta$ -tubulin 抗体及相应二抗(工作浓度 1:1 000)购自 Affinity Bioscience 公司(中国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 sgRNA 序列的设计

使用 E-CRISP 网站(<http://www.e-crisp.org/E-CRISP/>)进行引物设计,选择物种后,输入在 NCBI 搜索得到的 FN 基因 transcript variant 1 (NM\_212482.2)的外显子的 FASTA 格式序列,在结果中选取得分较高的两组单向导 RNA (sgRNA)序列,在正义链的 5' 端添加 CACC,反义链的 5' 端添加 AAAC。

#### 1.2.2 q-PCR 及 Western blot 检测 4 株卵巢癌细胞系的 FN 表达量

选取 A2780、OVCAR3、skov3、CAOV-3 卵巢癌细胞系,检测其基础表达 FN 的情况。使用 TRIzol 法提取细胞系的总 RNA, FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒逆转录为 cDNA, 利用 SYBR Green 染料法 real-time PCR 进行半定量的 FN 基因表达量检测。具体操作按说明书进行, 95 $^{\circ}$ C 预变性 15 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 20 s 并进行信号检测, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 共 40 个循环。使用 Western blot 检测 4 株细胞系基础表达 FN 蛋白量。去除细胞培养基后, PBS 冲洗细胞 1 次, 用含有 SDS 的 Loading buffer 裂解细胞, 功率 30% 超声, 超声 1 s, 间隔 1 s, 超声 30 次后 97 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳

(SDS-PAGE)分离蛋白,再将蛋白转印至聚偏氟乙烯(PVDF)膜后使用抗体检测蛋白表达情况。

#### 1.2.3 lenti-CRISPR-V2-FN-sgRNA 载体的构建

将两个 oligo sgRNA 稀释至 100  $\mu$ mol/L, 按正向 oligo 1  $\mu$ L、反向 oligo 1  $\mu$ L、10 $\times$ T4 Ligation Buffer 1  $\mu$ L、T4 polynucleotide kinase 1  $\mu$ L、ddH $_2$ O 6  $\mu$ L 配制共 10  $\mu$ L 的反应体系, 在 37 $^{\circ}$ C 30 min, 95 $^{\circ}$ C 5 min, 95 $^{\circ}$ C 至 25 $^{\circ}$ C 每分钟降温 3 $^{\circ}$ C 的反应温度下进行双链形成反应。反应后将产物用 ddH $_2$ O 进行 200 倍稀释。将 lenti-CRISPR-V2 质粒使用 BsmB I、FastAP 进行酶切, 反应条件为 55 $^{\circ}$ C 1 h。琼脂糖凝胶跑胶后回收条带。取回收后的产物 50 ng 和稀释的 sgRNA 1  $\mu$ L 混合后使用 T4 连接酶连接, 16 $^{\circ}$ C 反应 3 h, 而后加入 10 mmol/L ATP 1.5  $\mu$ L、ATP-dependent Plasmid Safe exonuclease 1  $\mu$ L 及 10 $\times$ Plasmid-Safe buffer 1.5  $\mu$ L, 37 $^{\circ}$ C 30 min, 70 $^{\circ}$ C 30 min 反应, 将全部连接产物转入感受态细胞 DH5 $\alpha$ , 涂板后挑取菌落提取质粒后测序。

#### 1.2.4 OVCAR3 细胞 FN 低表达细胞系的获得及鉴定

293T 细胞铺板, 待其细胞融合度约为 80% 时, 将 lenti-CRISPR-V2-FN-sgRNA、psPAX2、pMD2.G 按 4:3:1 比例混合后混入 1 mL Opti-MEM 培养基中, 室温孵育 5 min。向上述混合物中加入 30  $\mu$ L PEI 试剂, 混合后室温孵育 30 min。孵育后将混合物逐滴加入 293T 细胞中, 37 $^{\circ}$ C 5% CO $_2$  孵育 6 h 后将细胞培养基换为低血清培养基(4% FBS), 48 h 后收集培养病毒包装上清液, 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤后-80 $^{\circ}$ C 冻存备用。

病毒转染前 24 h 将 OVCAR3 细胞铺板, 感染时使用含终浓度 10  $\mu$ g/mL 的 polybrene 的病毒包装, 上清液与完全培养基按 1:1 混合后替换原培养基。37 $^{\circ}$ C 5% CO $_2$  孵育 12 h 后换为完全培养基, 继续培养 36 h 后使用含 0.2  $\mu$ g/mL 嘌呤霉素的完全培养基行药敏筛选。上述包装及转染步骤同时使用 lenti-CRISPR-V2 质粒行同样操作作为对照。q-PCR 及 Western blot 检测 OVCAR3 野生型细胞、转染 lenti-CRISPR-V2 质粒细胞、转染 lenti-CRISPR-V2-FN-sgRNA 质粒低表达 FN 细胞的核酸及蛋白表达情况。

### 1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism 6.0 统计软件进行分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 one-way ANOVA 单因素方差分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 sgRNA 序列设计

选取得分较高的两组序列进行合成, 完整序列见表 1。

### 2.2 FN 在人卵巢癌细胞系中的表达

FN 在 4 株卵巢癌细胞系中的 mRNA 表达差异有统计学意义 ( $F=970.7, P<0.0001$ ), 其中以表达量最低的 A2780 为标准, 表达量最高为 OVCAR3 细胞, 相对其他 3 组差异有统计学意义 ( $P<0.0001$ )。Western blot 结果同 q-PCR 结果一致, OVCAR3 细胞 FN 蛋白表达在 4 株细胞系中最高, 故选用 OVCAR3 细胞进行后续基因敲除实验, 见图 1、表 2。

表 1 FN sgRNA 寡核苷酸序列信息

名称	序列(5'-3')	产物大小(bp)
sgRNA-1-F	CACCGCTCATAAGTGTCAACCACT	20
sgRNA-1-R	AAACAGTGGGTGACACTTATGAGC	
sgRNA-2-F	CACCGTGTGCACAGGGGAGGAG	20
sgRNA-2-R	AAACCTCCTCCCTGTGCAGCAC	

表 2 q-PCR 引物序列

名称	序列(5'-3')	产物大小(bp)
FN-qPCR-F	AGTGGGAGACCTCGAGAAG	168
FN-qPCR-R	TCCCTCGGAACATCAGAAAC	
GAPDH-qPCR-F	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	138
GAPDH-qPCR-R	TGGTGAAGACGCCAGTGA	
FN-验证-F	ATCAACAGTGGGAGCGGACC	197
FN-验证-R	CCCGATGCAGGTACAGTCCC	

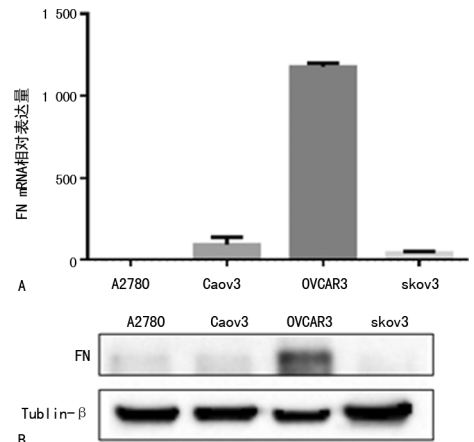
### 2.3 重组质粒 lenti-CRISPR-V2-FN-sgRNA 的测序和转染

质粒构建后在大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$  中表达, 提取质粒后测序。图 2 分别为合成的两组序列插入后测

序结果, 红色方框内为插入的序列, 同表 1 设计序列相同, 可以看到序列插入的位置、核苷酸排列、方向均正确, 质粒构建成功。转染 OVCAR3 lenti-CRISPR-V2-FN-sgRNA-1 和 lenti-CRISPR-V2-FN-sgRNA-2 质粒, 合成序列 FN-sgRNA-1 的细胞状态良好, 建系成功。

### 2.4 OVCAR3 细胞 FN 低表达细胞系的鉴定

与 OVCAR3 野生型细胞和转染空质粒 lenti-CRISPR-V2 的细胞相比, 转染 lenti-CRISPR-V2-FN-sgRNA-1 的细胞系 FN 的 mRNA 表达和蛋白表达明显降低 ( $P<0.05$ ), 成功构建敲除 FN 表达的卵巢癌稳定表达细胞系, 见图 3。



A: q-PCR, 以表达量最低的 A2780 为标准, 检测内参为 GAPDH; B: western blot.

图 1 FN 在 4 株人卵巢癌细胞系中的表达

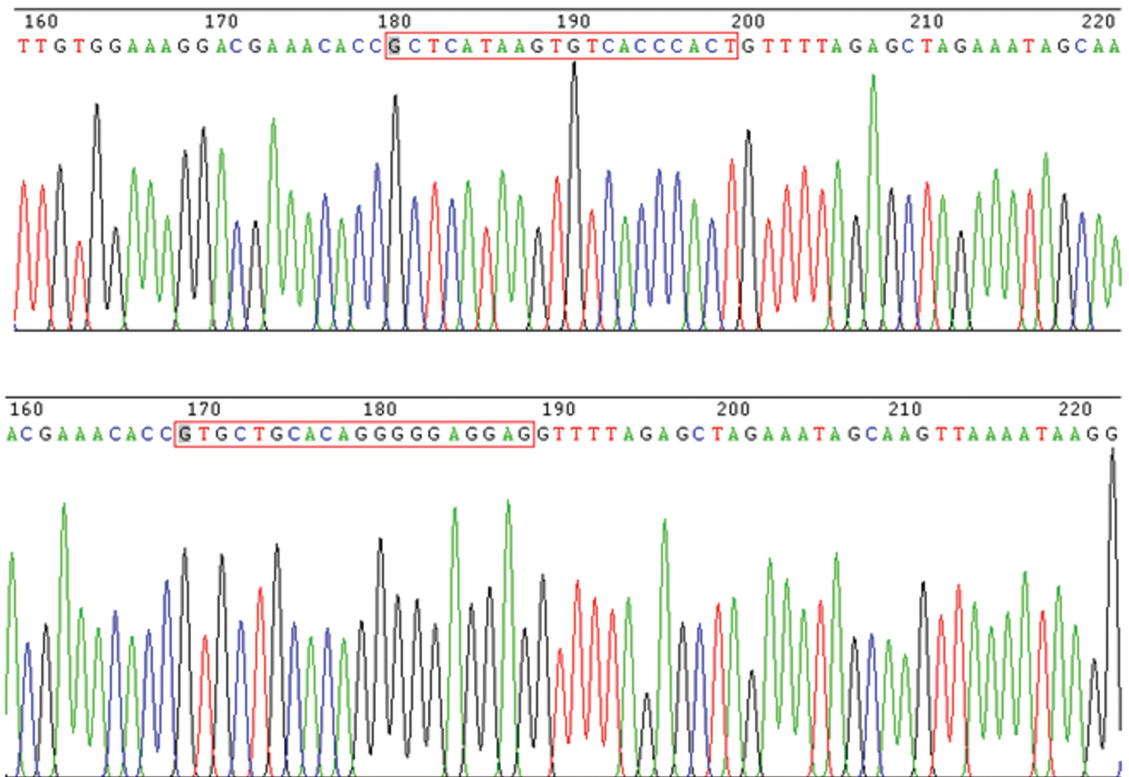
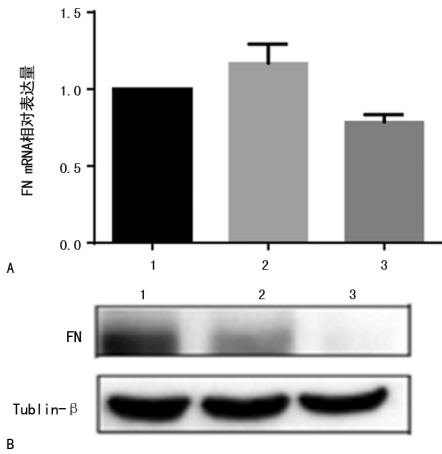


图 2 质粒测序结果



A: q-PCR, 以 OVCAR3 野生型细胞为标准, 内参检测为 GAPDH; B: Western blot; 1: OVCAR3 野生型细胞; 2: 转染空质粒 lenti-CRISPR-V2 的细胞; 3: 转染 lenti-CRISPR-V2-FN-sgRNA-1 的细胞。

图 3 FN 低表达细胞系的鉴定

### 3 讨论

FN 的分子结构复杂, 具有多重的生物学功能。FN 在肿瘤细胞侵袭转移<sup>[6-7]</sup>、增殖<sup>[8]</sup>、耐药<sup>[9]</sup>中也起着重要的作用。

在卵巢癌中, FN 对肿瘤迁移、侵袭的作用, 主要是通过 FN 与肿瘤细胞表面的受体结合作用的。FN 与细胞膜上的整合素受体—— $\alpha 5 \beta 1$  结合,  $\alpha 5$  整合素和受体酪氨酸激酶 c-met 直接关联, 随后 c-met 与 Src 作用, 激活 Src 和粘着斑激酶, 从而促进卵巢癌的侵袭和转移<sup>[10]</sup>。YOUSIF<sup>[11]</sup> 的研究表明 FN 是通过激活, 随后调节磷酸酰肌醇-3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt) 通路促进卵巢癌细胞的迁移和侵袭。在 FN 和整合素受体的作用中, 也存在着影响其结合的基因。张洁清等<sup>[12]</sup> 与 GOURLEY 等<sup>[13]</sup> 两组研究人员同年发表论文, 从不同方向阐述了 WWOX 基因是通过调节卵巢癌细胞与 FN 的相互作用, 调节了肿瘤细胞的黏附能力。WWOX 基因表达与肿瘤细胞黏附性呈负相关。有研究进一步证明, WWOX 基因转染的细胞在悬浮培养中凋亡增多, 且细胞膜上整合素  $\alpha 3$  蛋白表达减少, 从而影响了纤维蛋白和整合素受体的结合。FORD 等<sup>[14]</sup> 研究显示, FN 和卵巢癌细胞的相互作用, 可以被 Wnt 通路抑制蛋白——分泌型卷曲受体蛋白 4 (secreted frizzled receptor protein 4, SFRP4) 增强。

在卵巢癌的治疗中, 针对已经不能手术的晚期患者, 或为了消除卵巢癌术后的残留肿瘤结节, 常常需要进行化疗。目前临床常用的卵巢癌化疗药物有顺铂、紫杉醇等。在 DURAN 等<sup>[15]</sup> 的研究中, 通过对非多重耐药 (non-MDR) 的耐紫杉醇卵巢癌细胞系和非耐药细胞系的基因芯片分析, 发现 FN 基因是卵巢癌耐药的关键基因。有研究显示<sup>[16-17]</sup>, FN/PI3K/Akt2 通路的激活会导致生存素蛋白表达, 从而抵抗化疗药物多西紫杉醇对卵巢癌细胞的凋亡作用。另一方面,

Akt2/survivin 通路和凋亡信号调节激酶 (ASK1)/p38 凋亡通路在多西紫杉醇的耐药中相互作用, 生存素的抗凋亡活性减少依赖于 p38, 细胞和 FN 之间的黏附会导致 p38 活性下降。

FRANKE 等<sup>[18]</sup> 对 211 例卵巢癌患者的病历资料和肿瘤组织进行了回顾性分析, 用免疫组织化学对 FN 的表达量进行了观察。FN 的表达和肿瘤分期 ( $P=0.002$ )、肿瘤生长分数 ( $P=0.005$ ) 明显相关, FN 表达对总生存率有明显的不良影响 ( $P=0.009$ )。

FN 基因表达方面, CHANG 等<sup>[19]</sup> 研究显示, 对更具有侵袭性和转移性的细胞系 SKOV3.ip1、亲代的细胞系 SKOV3、22 例肿瘤组织、正常组织样品进行了基因芯片检测, 经筛选和分析发现 FN 表达和肿瘤的组织学分级有关, 在分级高的肿瘤组织中表达上升。FN 蛋白表达方面, DEMETERA 等<sup>[20]</sup> 使用免疫印迹和光密度定量分析, 检测了 27 例卵巢上皮性肿瘤患者肿瘤标本中的 FN, 并对这些患者进行了随访, 发现同未复发的患者相比, 复发卵巢癌和死亡患者的卵巢癌组织中 FN 表达量升高, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。

FN 在卵巢癌的发生、发展中可能存在促进作用, 但目前对于这些作用的研究还不是很充分, 这主要是由于 FN 是由 2 240 个氨基酸组成的大型糖蛋白, 传统的细胞工程技术在应用时存在一定局限。

CRISPR/Cas 9 系统是一种新型的定向基因编辑技术, 能够快速有效完成各种生物基因组的编辑<sup>[21]</sup>。通过使用模拟天然 tracrRNA、crRNA 结构的 sgRNA, 引导 DNA 核酸内切酶 Cas9 蛋白, 在特定的位点切断 DNA 双链<sup>[22-23]</sup>, 引起 DNA 双链断裂 (double-strand break, DSB)。随后细胞通过非同源末端连接 (nonhomologous end joining, NHEJ) 或同源重组 (homology directed repair, HDR) 进行修复, 在修复发生移位突变或随机插入或缺失, 从而实现对目的基因的编辑。CRISPR/Cas 9 系统作为新兴的定向基因编辑技术, 近年来已在多种植物、动物和疾病研究中得到应用。

本实验使用了目前应用广泛的 II 型 CRISPR/Cas 9 系统, 操作简便, 脱靶效应低。使用 lenti-CRISPR-V2 质粒作为载体, 将针对 FN 基因的 sgRNA 序列插入质粒载体, 转染进入卵巢癌细胞系<sup>[24]</sup>, 通过使用嘌呤霉素, 筛选出了成功转染重组质粒的 OVCAR3 细胞, 建立稳定低表达 FN 的卵巢癌细胞系。通过 q-PCR 和 Western blot 分别检测了稳定低表达细胞系中 FN 的基因及蛋白表达情况。本次实验为今后研究 FN 与卵巢癌的相互作用、FN 在肿瘤进展中的作用、耐药作用机制研究提供了工具, 为卵巢癌治疗方向提供了新的可能。

## 参考文献

- [1] 张爽爽,夏庆民,郑荣寿,等. 中国 2010 年卵巢癌发病与死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2016, 25(3): 169-173.
- [2] LAN C, LI Y, LIU J. Intraperitoneal access via direct puncture is an alternative way to deliver intraperitoneal chemotherapy in ovarian, fallopian tube and primary peritoneal cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2009, 114(1): 42-47.
- [3] KARNEZIS A N, CHO K R, GILKS C B, et al. The disparate origins of ovarian cancers: pathogenesis and prevention strategies[J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(1): 65-74.
- [4] PAUL J I, SCHWARZBAUER J E, TAMKUN J W, et al. Cell-type-specific fibronectin subunits generated by alternative splicing[J]. *J Biol Chem*, 1986, 261(26): 12258-12265.
- [5] WIERZBICKA-PATYNOWSKI I, SCHWARZBAUER J E. The ins and outs of fibronectin matrix assembly[J]. *J Cell Sci*, 2003, 116 (Pt 16): 3269-3276.
- [6] ERDOGAN B, AO M, WHITE L M, et al. Cancer-associated fibroblasts promote directional cancer cell migration by aligning fibronectin[J]. *J Cell Biol*, 2017, 216(11): 3799-3816.
- [7] KNOWLES L M, GURSKI L A, ENGEL C, et al. Integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3 and fibronectin upregulate slug in cancer cells to promote clot invasion and metastasis[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(20): 6175-6184.
- [8] YI W, XIAO E, DING R, et al. High expression of fibronectin is associated with poor prognosis, cell proliferation and malignancy via the NF- $\kappa$ B/p53-apoptosis signaling pathway in colorectal cancer[J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(6): 3145-3153.
- [9] CHO C, HORZEMPA C, JONES D, et al. The fibronectin III-1 domain activates a PI3-Kinase/Akt signaling pathway leading to  $\alpha$ v $\beta$ 5 integrin activation and TRAIL resistance in human lung cancer cells[J]. *BMC Cancer*, 2016, 16: 574.
- [10] MITRA A K, SAWADA K, TIWARI P, et al. Ligand-independent activation of c-Met by fibronectin and  $\alpha$ (5) $\beta$ (1)-integrin regulates ovarian cancer invasion and metastasis[J]. *Oncogene*, 2011, 30(13): 1566-1576.
- [11] YOUSIF N G. Fibronectin promotes migration and invasion of ovarian cancer cells through up-regulation of FAK-PI3K/Akt pathway[J]. *Cell Biol Int*, 2014, 38(1): 85-91.
- [12] 张洁清, 李力, 宋红林, 等. WWOX 基因对卵巢上皮性癌细胞黏附能力的影响[J]. 中华妇产科杂志, 2009, 44(7): 529-532.
- [13] GOURLEY C, PAIGE A J, TAYLOR K J, et al. WWOX gene expression abolishes ovarian cancer tumorigenicity in vivo and decreases attachment to fibronectin via integrin  $\alpha$ 3[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(11): 4835-4842.
- [14] FORD C E, JARY E, MA S S, et al. The Wnt gatekeeper SFRP4 modulates EMT, cell migration and downstream Wnt signalling in serous ovarian cancer cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e54362.
- [15] DURAN G E, WANG Y C, MOISAN F, et al. Decreased levels of baseline and drug-induced tubulin polymerisation are hallmarks of resistance to taxanes in ovarian cancer cells and are associated with epithelial-to-mesenchymal transition[J]. *Br J Cancer*, 2017, 116(10): 1318-1328.
- [16] XING H, WENG D, CHEN G, et al. Activation of fibronectin/PI-3K/Akt2 leads to chemoresistance to docetaxel by regulating survivin protein expression in ovarian and breast cancer cells[J]. *Cancer Lett*, 2008, 261(1): 108-119.
- [17] XING H, CAO Y, WENG D, et al. Fibronectin-mediated activation of Akt2 protects human ovarian and breast cancer cells from docetaxel-induced apoptosis via inhibition of the p38 pathway[J]. *Apoptosis*, 2008, 13(2): 213-223.
- [18] FRANKE F E, VON GEORGI R, ZYGMUNT M, et al. Association between fibronectin expression and prognosis in ovarian carcinoma[J]. *Anticancer Res*, 2003, 23(5b): 4261-4267.
- [19] CHANG X H, ZHANG L, YANG R, et al. Screening for genes associated with ovarian cancer prognosis[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2009, 122(10): 1167-1172.
- [20] DEMETER A, SZILLER I, CSAPO Z, et al. Molecular prognostic markers in recurrent and in non-recurrent epithelial ovarian cancer[J]. *Anticancer Res*, 2005, 25(4): 2885-2889. (下转第 1745 页)

## 参考文献

- [1] 杨婷,崔丽,牛青芳. 经上肢静脉与下肢静脉两种不同途径 PICC 置管在巨大儿中应用护理效果[J]. 医学理论与实践,2017,30(4):606-607.
- [2] KISA P, TING J, CALLEJAS A, et al. Major thrombotic complications with lower limb PICCs in surgical neonates[J]. J Pediatr Surg, 2015,50(5):786-789.
- [3] 沈红五,缪爱梅,茅志娟,等. PICC 两种置管途径在新生儿中应用的效果分析[J]. 护士进修杂志, 2013,28(4):351-353.
- [4] 黄芳. 床旁 B 超定位在新生儿 PICC 置管术中的应用[J]. 当代护士,2018,25(8):130-131.
- [5] 赵京雷,于新颖,范玲. 10 例新生儿经下肢静脉置入中心静脉导管的观察及护理[J]. 中国医科大学学报,2015,44(10):953-955.
- [6] 孟启华. 上下肢静脉置入 PICC 导管在新生儿的可行性研究[J]. 世界最新医学信息文摘,2015,15(78):201,225.
- [7] SUBRAMANIAN S, MOE D C, VO J N. Ultrasound-guided tunneled lower extremity peripherally inserted central catheter placement in infants[J]. J Vasc Interv Radiol, 2013, 24(12): 1910-1913.
- [8] 唐红梅,张惠英,文凤,等. 新生儿经外周静脉置入中心静脉导管的临床观察及应用分析[J]. 护理研究,2015,29(19):2396-2398.
- [9] 王舞妮,孙墅,邓彩弟. 新生儿经上肢静脉与下肢静脉 PICC 置管的应用效果对比分析[J]. 中外医疗,2014,33(7):54-55.
- [10] GREENE M T, FLANDERS S A, WOLLER S C, et al. The association between PICC use and venous thromboembolism in upper and lower extremities[J]. Am J Med, 2015, 128(9):986-993.
- [11] 明静. 不同外周静脉置入中心静脉导管置管途径应用于新生儿的效果对比及临床分析[J]. 中国医药导报,2014,11(1):116-118.
- [12] WILSON T J, BROWN D L, MEURER W J, et al. Risk factors associated with peripherally inserted central venous catheter-related large vein thrombosis in neurological intensive care patients[J]. Intensive Care Med, 2012, 38(2): 272-278.
- [13] BARRIER A, WILLIAMS D J, CONNELLY M, et al. Frequency of peripherally inserted central catheter complications in children[J]. Pediatric Infect Dis J, 2012, 31(5):519-521.
- [14] 赵京雷,于新颖,姜红,等. 极低出生体质量儿经下肢静脉与非下肢静脉留置 PICC 的对照研究[J]. 中国医科大学学报,2016,45(9):855-857.
- [15] 陈赢赢,张静,章优,等. 下肢 PICC 置管术在新生儿中置管效果及对舒适度的影响观察[J]. 中国现代医生,2017,55(30):57-60.

(收稿日期:2019-12-18 修回日期:2020-02-26)

(上接第 1741 页)

- [21] KIM H, KIM J S. A guide to genome engineering with programmable nucleases[J]. Nat Rev Genet, 2014, 15(5):321-334.
- [22] HALE C R, ZHAO P, OLSON S, et al. RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex[J]. Cell, 2009, 139(5):945-956.
- [23] 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.

- [24] CONG L, ZHANG F. Genome engineering using CRISPR-Cas9 system[J]. Methods Mol Biol, 2015, 1239:197-217.

(收稿日期:2019-12-21 修回日期:2020-03-01)