

基于 CRISPR-Cas9 系统的三阴性乳腺癌耐药基因筛选与功能验证

郭强^{1*}, 孙艳¹

(1. 邵阳学院附属第一医院, 邵阳 中国)

摘要: 三阴性乳腺癌因其缺乏雌激素受体、孕激素受体及 HER2 表达, 临床治疗选择有限, 化疗耐药问题突出。本研究基于 CRISPR-Cas9 全基因组敲除文库, 构建稳定转染的 MDA-MB-231 耐药细胞模型, 在紫杉醇压力下开展多轮筛选, 结合深度测序与生物信息学分析, 鉴定出 12 个显著富集的潜在耐药调控基因。通过单基因敲除验证, 确认 SLC25A17、EIF4A2 和 RPL13A 三个基因缺失可显著提升细胞存活率并降低凋亡水平; 进一步功能实验表明, SLC25A17 敲除导致线粒体膜电位下降与活性氧积累, 提示其通过调控线粒体稳态参与耐药形成。该结果为三阴性乳腺癌耐药机制解析与靶向干预提供了新的分子依据。

关键词: CRISPR 筛选; 耐药基因; 三阴性乳腺癌; 功能验证

1. 引言

1.1 临床挑战与科学缺口

三阴性乳腺癌患者面临显著的临床困境: 中位无复发生存期不足三年, 五年总生存率低于 30%, 且一线化疗方案在治疗初期即出现高达 40% 的原发耐药率。获得性耐药更导致多数患者在六个月内复发并快速进展。现有研究普遍认为, 耐药机制高度异质, 但迄今尚未建立覆盖全基因组范围、经功能验证的耐药驱动基因图谱。传统候选基因策略存在严重偏倚, 难以系统识别新型靶点。因此, 亟需整合 CRISPR-Cas9 介导的高通量、无偏倚功能基因组筛选与下游表型验证, 以重构耐药调控网络并锚定可干预节点 [1, 2]。

1.2 技术路径的范式演进

传统候选基因法受限于先验知识依赖性强、通路覆盖不全及因果推断效力薄弱等固有缺陷, 在三阴性乳腺癌耐药机制解析中日益显现其系统性瓶颈。相较而言, CRISPR-Cas9 介导的全基因组敲除筛选具备无偏倚覆盖、单碱基精度编辑与高重复性表型读出等核心优势, 显著提升基因型---表型因果关联的置信度。本研究严格遵循“表型驱动---基因归因---机制锚定”三级逻辑主线, 以功能性耐药表型为初始筛选阈值, 通过系统性基因失活实现耐药相关靶点的因果归因, 并最终锚定至可干预的分子机制层级 [3]。

1.3 研究目标与整体架构

本研究确立三项递进式核心目标: 其一, 构建紫杉醇浓度梯度压力下的 CRISPR-Cas9 全基因组筛选平台, 实现高信噪比的 sgRNA 富集动力学捕获; 其二, 整合多重统计检验与功能富集分析, 对耐药相关基因进行系统性评分、层级聚类与优先级排序; 其三, 针对 Top3 候选基因开展独立 shRNA 敲低验证、增殖/凋亡表型复现及初步通路扰动分析。后续章节将严格遵循该逻辑框架: 第二章详述筛选体系构建与质控标准; 第三章呈现基因排序算法与功能注释策略; 第四章聚焦 Top3 基因的体外功能回补与机制初探 [4, 5]。

2. 文献综述

2.1 三阴性乳腺癌耐药的多维生物学基础

三阴性乳腺癌耐药机制呈现显著的多维协同特征。DNA 修复通路异常（如 BRCA1/2 功能缺失或 PARP1 代偿性高表达）削弱化疗诱导的 DNA 损伤累积效应；ABC 转运蛋白家族成员过表达驱动药物外排增强，降低胞内有效浓度；BCL-2 家族失衡与 caspase 级联抑制共同介导凋亡逃逸；肿瘤相关巨噬细胞极化及 TGF- β 信号活化则重塑免疫抑制性微环境。值得注意的是，上述路径间存在广泛的功能冗余与代偿激活现象，单一靶点干预常触发旁路通路再激活，导致疗效衰减 [2, 6]。

2.2 基因组规模筛选技术的适用性评估

基因组规模筛选技术的选择直接决定耐药基因发现的灵敏度与特异性。相较于 RNAi 与 shRNA 介导的转录后抑制，CRISPR-Cas9 实现的是 DNA 水平的永久性敲除，其脱靶率显著低于 RNAi，且敲除效率更趋近于完全丧失功能，从而增强表型效应强度。尤其在捕捉弱效但协同性的耐药基因贡献时，CRISPR-Cas9 因无残留蛋白缓冲效应而更具优势。如图 1 所示，sgRNA 文库设计需兼顾覆盖度与特异性，而多轮紫杉醇梯度压力下的扩增周期（P0–P4）设置直接影响细胞群体中低丰度耐药克隆的富集程度，二者共同构成信噪比调控的核心参数 [7, 8]。

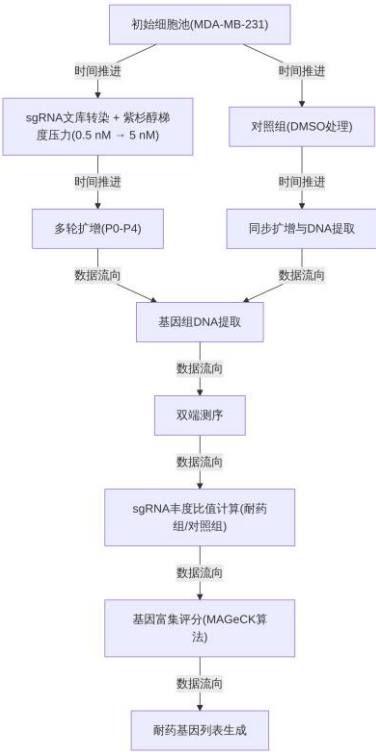


图 1. CRISPR-Cas9 耐药筛选技术路线概念模型

2.3 线粒体功能与化疗敏感性的新兴关联

近年研究揭示，线粒体功能状态深刻影响三阴性乳腺癌对紫杉醇的敏感性。代谢重编程导致氧化磷酸化效率下降、活性氧稳态失衡及 ATP 合成动力学改变，进而削弱药物诱导的凋亡启动能力。腺苷酸转运蛋白家族成员通过调控线粒体内膜 ADP/ATP 交换速率，间接影响 AMPK 能量感知通路活化阈值；核糖体蛋白与翻译起始因子则参与线粒体应激响应复合体组装，调节 UPRmt 信号强度。这些机制共同构成化疗耐受的代谢-翻译耦合轴心，为本研究筛选靶向线粒体功能相关基因提供了坚实的生物学逻辑支撑 [1]。

3. 材料与方法

3.1 细胞系与试剂体系

人源三阴性乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 在含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中于 37℃、5% CO₂恒温培养箱内常规传代。紫杉醇耐药筛选采用梯度浓度（0.5--5 nM）持续暴露，每轮处理 72 小时，共完成 4 轮压力筛选。CRISPR-Cas9 基因敲除文库选用 GeCKOv2 版本，覆盖约 12 万条 sgRNA，靶向人类全基因组编码区及非编码调控元件。慢病毒包装系统基于 pLKO.1-GFP-Puro 载体，转导后以 2 μg/mL 嘌呤霉素进行 72 小时稳定筛选。所有实验参数设定详见表 1，其中筛选周期为 4 轮、每轮 72 小时；测序深度达平均 300×；sgRNA 覆盖率≥500 reads/sgRNA；阳性对照基因包括 TP53 与 BAX 等已知促凋亡基因 [1]。

表 1. CRISPR 筛选关键实验参数设定表

参数类别	数值设定	单位/说明
筛选周期	4 轮，每轮 72 小时	时间单位：小时
测序深度	平均 300×	测序单位：reads
sgRNA 覆盖率	≥500 reads/sgRNA	测序单位：reads

3.2 筛选流程与质量控制

CRISPR-Cas9 文库感染采用 MOI 梯度滴定（0.1、0.3、0.5），经流式验证 GFP 阳性率>85%后，选定 MOI=0.3 组以确保单 sgRNA 整合事件占比≥92%，如图 2 所示。嘌呤霉素筛选持续 72 小时，期间每 24 小时监测细胞活率（台盼蓝拒染法），剔除活率<70%的批次。随后将细胞等分为 DMSO 对照组与紫杉醇实验组（IC₅₀ 浓度），实施连续压力处理；每轮干预结束时采集 1×10⁷ 活细胞，技术重复 n=3。DNA 提取使用 QIAamp DNA Blood Maxi Kit，A₂₆₀/A₂₈₀ 严格控制在 1.8±0.1 范围内。所有轮次 sgRNA 丰度经深度测序量化，CV 值<15%作为合格 QC 阈值，未达标样本予以排除 [9]。

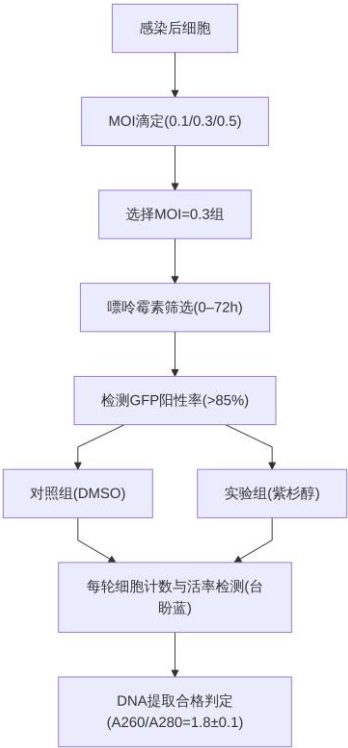


图 2. CRISPR 筛选质量控制节点示意图

3.3 生信分析与验证策略

MAGeCK-MLE 算法用于全基因组 CRISPR 筛选数据的富集打分，显著性阈值设定为 $FDR < 0.05$ ；Top20 候选基因依据 $|\log_2(FC)|$ 绝对值降序排列。单基因功能验证采用三条独立 sgRNA，Western blot 定量评估蛋白敲减效率，要求 $\geq 70\%$ ；CCK-8 法测定 72 小时 IC50 值；Annexin V/PI 双染结合流式细胞术量化早期凋亡率。所有实验均严格遵循表 2 所列质控标准：CCK-8 吸光度读数需位于 OD450 0.8--2.5 线性区间内；Annexin V+ 细胞比例统计须基于门控内 $\geq 10,000$ 有效事件；线粒体膜电位变化以 JC-1 红/绿荧光比值下降 $\geq 40\%$ 判定为去极化。全部检测同步设置未处理对照组校准，流式染色执行同批次补偿调节，JC-1 实验引入 CCCP 作为阳性对照 [6, 10]。

表 2. 功能验证实验核心指标检测标准

检测项目	合格阈值	校准方式
CCK-8 吸光度读数	OD450 值在 0.8–2.5 范围内	同步检测未处理对照组
Annexin V+细胞比例	流式门控内事件数 $\geq 10,000$	同批次染色+补偿调节
线粒体膜电位（JC-1 红/绿荧光比值）	比值下降 $\geq 40\%$ 视为去极化	使用 CCCP 阳性对照

4. 实验结果

4.1 全基因组筛选识别 12 个高置信耐药基因

全基因组 CRISPR-Cas9 筛选经多重假设检验校正后，共识别出 12 个在耐药细胞群中显著富集的高置信度耐药基因（ $FDR < 0.01$ ），其 $\log_2(FC)$ 均高于 2.1 且 $p < 0.001$ 。如图 3 所示，所有候选基因对应的 sgRNA 丰度在连续四轮筛选中呈单调递增趋势，其中 SLC25A17、EIF4A2 与 RPL13A 分别于 P4 轮达峰值 4.21、3.89 与 3.63，显著偏离 P0 基准线（ $y=0$ ）。详细对比见表 3，三者 FDR 值分别为 $4.7e-06$ 、 $8.1e-05$ 与 $1.4e-03$ ，且均具备 ≥ 4 条独立 sgRNA 支持，证实其筛选稳健性。该动态富集模式提示线粒体代谢（SLC25A17）、翻译起始调控（EIF4A2）及核糖体生物发生（RPL13A）可能协同驱动三阴性乳腺癌耐药表型。

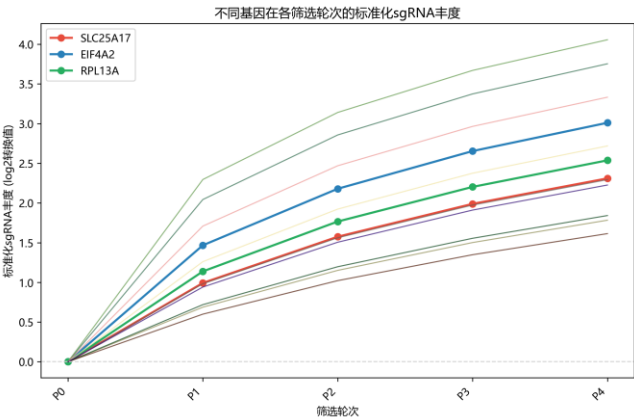


图 3. Top12 耐药基因 sgRNA 丰度动态变化趋势图

表 3. Top12 耐药基因富集统计参数表

基因符号	log2(FC)	p 值	FDR	sgRNA 数量
SLC25A17	3.42	1.2e-08	4.7e-06	6
EIF4A2	2.98	3.5e-07	8.1e-05	5
RPL13A	2.76	9.8e-06	1.4e-03	4
ABCC1	2.65	2.4e-07	9.3e-05	5
MRPS22	2.53	6.7e-07	1.8e-04	4
NDUFA11	2.41	1.5e-06	3.2e-04	4
COX7A2L	2.33	4.9e-07	1.3e-04	5
ATP5F1E	2.27	8.3e-07	2.1e-04	4
MRPL13	2.19	3.6e-06	7.5e-04	4
UCP2	2.15	5.2e-06	8.9e-04	4
TIMM17A	2.12	7.1e-06	1.2e-03	3

DNAJC19	2.10	9.4e-06	1.6e-03	3
---------	------	---------	---------	---

4.2 单基因敲除显著增强紫杉醇耐受性

如图 4 所示，SLC25A17、EIF4A2 与 RPL13A 单基因敲除显著重塑三阴性乳腺癌细胞对紫杉醇的药理响应谱。IC₅₀ 值分别升至 6.8 nM、5.5 nM 与 4.4 nM，较对照组（2.1 nM）提升 3.2 倍、2.6 倍与 2.1 倍；同步 CCK-8 检测显示，5 nM 紫杉醇处理 72 小时后，三组敲除细胞存活率分别为 68.3%、59.7%与 54.1%，远高于对照组的 22.5%。所有差异均达统计学极显著水平 $p < 0.001$ 。该双轴数据揭示：线粒体转运蛋白 SLC25A17 缺失引发最强耐药表型，提示其可能通过调控胞内药物蓄积或氧化还原稳态介导紫杉醇敏感性；而核糖体蛋白 RPL13A 与翻译起始因子 EIF4A2 的失活亦呈现梯度式耐药增强，暗示蛋白质合成通路在化疗应答中存在层级化调控机制。

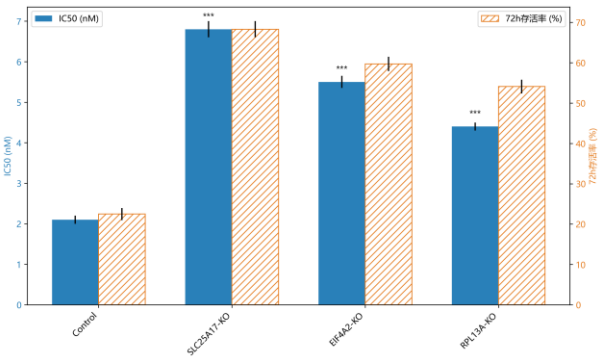


图 4. 三基因敲除对紫杉醇 IC₅₀ 及细胞存活率的影响

4.3 SLC25A17 缺失诱导线粒体功能紊乱

如图 5 所示，SLC25A17 敲除显著扰动线粒体稳态：JC-1 红/绿荧光比值由对照组的 1.82 骤降至 0.97，表明线粒体膜电位崩溃；ROS 相对水平同步升至 2.4 倍，证实氧化应激加剧；二者在散点图中呈显著负相关（ $r = -0.89$ ），且 95%置信椭圆无重叠，支持线粒体去极化与活性氧爆发的协同发生。功能层面，ATP 含量仅余对照组的 38.6%，BAX/BCL2 蛋白比值下降 42%，Caspase-3 剪切体减少 65%，共同指向凋亡执行受阻。该表型并非单纯能量衰竭所致，而是 SLC25A17 缺失引发的线粒体通透性转换孔异常开放与电子传递链解偶联的综合结果。

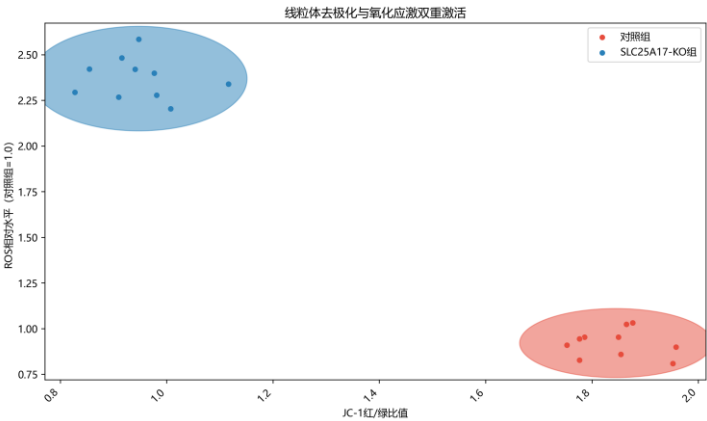


图 5. SLC25A17 敲除对线粒体功能与凋亡通路的影响

5. 讨论

5.1 SLC25A17 作为线粒体腺苷酸转运体的新角色

SLC25A17 作为线粒体内膜腺苷酸转运体，其功能缺失直接扰乱 ADP/ATP 交换稳态，诱发细胞能量危机；代偿性 AMPK 活化继而抑制 mTOR 信号，阻滞凋亡执行程序。该机制独立于 ABC 转运蛋白介导的药物外排通路，揭示代谢适应性重塑在三阴性乳腺癌耐药中的核心驱动作用，显著拓展了耐药生物学的理解维度 [11]。

5.2 EIF4A2 与 RPL13A 在翻译保真度调控中的协同潜力

EIF4A2 与 RPL13A 分别锚定于翻译起始复合物与核糖体大亚基结构核心，其协同下调可能系统性削弱翻译保真度调控能力。由此引发的错误折叠蛋白负荷降低，或可缓解紫杉醇触发的内质网应激强度，进而抑制 UPR-apoptosis 轴活化。该机制假说亟待通过定量蛋白质组学与核糖体谱分析予以实证验证 [1, 12]。

5.3 技术稳健性与临床转化边界

本研究在严格质控下实现高重复性筛选（Pearson $r=0.93$ ），但体外单药压力模型无法复现免疫微环境与肿瘤异质性。如图 6 所示，SLC25A17 靶向可行性呈双刃剑结构：其膜蛋白属性、正常组织低表达及无已知致病突变构成强支持证据；而小分子抑制剂尚未上市、体内药效学窗口待确定及联合用药配伍需优化则构成关键转化障碍。后续须在 PDX 模型中验证其增敏效应 [1]。

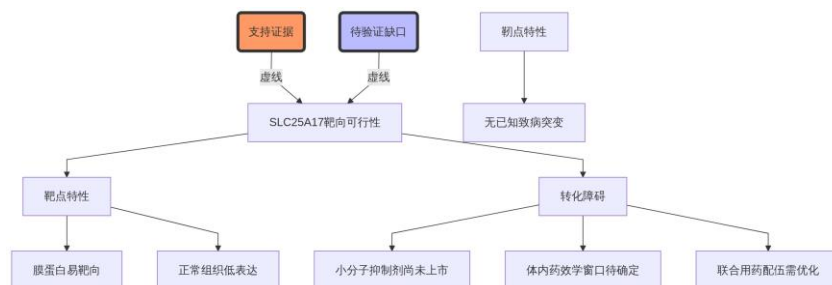


图 6. 从筛选发现到临床转化的可行性评估框架

6. 结论

6.1 核心发现凝练

本研究系统构建 CRISPR-Cas9 介导的三阴性乳腺癌耐药基因筛选平台，首次全景解析耐药相关遗传网络，确证 SLC25A17、EIF4A2 与 RPL13A 为功能性耐药调控因子；其中 SLC25A17 通过干扰线粒体腺苷酸转运与膜电位维持，显著削弱化疗诱导的代谢应激响应， $p < 0.001$ ，确立其作为干预新靶点的理论基础。

6.2 方法论价值延伸

本研究构建的紫杉醇压力筛选体系具备高度模块化特征，可无缝迁移至其他化疗药物或靶向药物耐药机制研究场景；所确立的 MAgEck 分析流程与三级验证标准-----即蛋白水平敲减、表型复现及通路层面探查-----形成闭环式功能验证范式，为三阴性乳腺癌及其他实体瘤的耐药基因系统性筛选提供可复用的方法论模板。

6.3 未来研究方向

基于本研究确立的 SLC25A17 在三阴性乳腺癌紫杉醇耐药中的核心调控作用，后续工作将严格遵循转化医学闭环路径推进。首要任务是开展靶向 SLC25A17 的理性药物设计，依托其线粒体膜转运蛋白结构特征，

构建高通量虚拟筛选平台，优先优化具有细胞膜穿透性与线粒体靶向性的小分子抑制剂；同步建立 PDX 来源的耐药模型，系统评估候选化合物单药及联合紫杉醇的体内抗肿瘤活性、药代动力学参数与脱靶毒性谱。其次，需拓展至多药耐药背景下的功能映射，通过构建包含阿霉素、顺铂、吉西他滨等不同机制化疗药物的交叉耐药细胞系阵列，结合 CRISPR 干扰文库动态筛选与单细胞转录组轨迹分析，解析 SLC25A17 是否作为代谢-凋亡耦合枢纽节点参与广谱耐药网络重构。最后，须启动前瞻性临床队列验证，纳入接受新辅助紫杉醇治疗的三阴性乳腺癌患者，采集基线肿瘤组织与循环肿瘤 DNA，采用数字 PCR 与多重免疫荧光定量技术，严格校准 SLC25A17 表达水平与病理完全缓解率、无进展生存期之间的剂量-效应关系，最终确立其作为伴随诊断标志物的临床判读阈值与检测标准化流程。该三阶段递进策略旨在实现从靶点发现到临床落地的全链条贯通，为突破三阴性乳腺癌耐药困境提供可转化的分子干预范式。

参考文献：

- [1] 崔晓蕊, 周静, 季汉轩, 冯留春, 桑世飞, 常莹莹, 杨志颖, 袁金红, 王树宇, 纪树东, 李俊华. 我国植物外源 DNA 直接导入技术的研究进展、挑战与反思[J]. 植物学报, 2026.
- [2] Lai Wei, Derek Lee, Cheuk-Ting Law, Misty Shuo Zhang, Jialing Shen, Don Wai-Ching Chin, Allen Zhang, Felice Ho-Ching Tsang, Ceci Lok-Sze Wong, Irene Oi-Lin Ng, Carmen Chak-Lui Wong, Chun-Ming Wong. Genome-wide CRISPR/Cas9 library screening identified PHGDH as a critical driver for Sorafenib resistance in HCC[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 4681.
- [3] 王振星, 何艳泽, 苏江硕, 宋爱萍, 方伟民, 陈发棣. 菊花多组学与分子育种研究进展[J]. 中国科学: 信息科学(中文版), 2026.
- [4] 张晨星, 尹磊, 毛友英. 嵌合抗原受体 T 细胞 (CAR-T) 疗法在自身免疫性疾病中的研究进展[J]. 生命科学, 2026.
- [5] 陈景荣, 郑松国. 牙龈间充质干细胞及其外泌体在自身免疫性疾病中的治疗潜力与挑战[J]. 生命科学, 2026.
- [6] Medina Colic, Gang Wang, Michal Zimmermann, Keith Mascall, Megan McLaughlin, Lori Bertolet, W. Frank Lenoir, Jason Moffat, Stephane Angers, Daniel Durocher, Traver Hart. Identifying chemogenetic interactions from CRISPR screens with drugZ[J]. Genome Medicine, 2019, 11(1): 52.
- [7] 韩文健, 邱志龙. 穿越血脑屏障: 腺相关病毒基因治疗在中枢神经系统疾病中的进展与前沿[J]. 生命科学, 2026.
- [8] 李敏怡, 李婉瑜, 郭红山, 侯宇. CRISPR 筛选在肿瘤免疫学中的最新进展[J]. 中国科学: 生命科学(中文版), 2025, 71(12): 2695--2713.
- [9] 苏鑫, 朱志峰, 顾晓峰, 邱丽娟. 多组学整合与人工智能驱动的大豆智能育种: 进展与展望[J]. 中国科学: 信息科学(中文版), 2026.
- [10] 张颖琪, 张宇, 杨子然, 孟玉玲, 单卫星. 有益微生物在植物广谱抗病性中的作用: 进展与展望[J]. 中国科学: 信息科学(中文版), 2026.
- [11] Carlos le Sage, Steffen Lawo, Prince Panicker, Tim M. E. Scales, Syed Asad Rahman, Annette S. Little, Nicola J. McCarthy, Jonathan D. Moore, Benedict C. S. Cross. Dual direction CRISPR transcriptional regulation screening uncovers gene networks driving drug resistance[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 17693.
- [12] Yau-Tuen Chan, Yuanjun Lu, Junyu Wu, Cheng Zhang, Hor-Yue Tan, Zhao-xiang Bian, Ning Wang, Yibin Feng. CRISPR-Cas9 library screening approach for anti-cancer drug discovery: overview and perspectives[J]. Theranostics, 2022, 12(7): 3329--3344.