

CRISPR 靶向切割毒力因子 tcdB 基因抑制致病艰难梭菌生长

张大炜, 夏云[△], 赵靳鑫, 陈盈竹, 邹家齐, 严佳, 杨蜜
(重庆医科大学附属第一医院检验科实验室, 重庆 400016)

摘要:目的 应用 CRISPR/Cas9 系统对艰难梭菌主要毒力因子 tcdB 基因进行切割, 达到特异性抑制致病艰难梭菌生长的效果。方法 在线设计针对 tcdB 的 sgRNA, 分别将 sgRNA 与 Cas9 单独或共同作用于 tcdB 基因扩增产物, 验证体外切割效能; 分别将穿膜肽(CPP)-sgRNA 或单独的 sgRNA 与 CPP-Cas9 单独或共同作用于产毒艰难梭菌, 通过监测菌液 A 值和菌落计数, 观察对细菌生长的抑制效果。同样的方法处理肠道其他细菌, 验证特异性。结果 sgRNA 和 Cas9 共同作用可把 tcdB 扩增产物有效切割, 而单独加入 sgRNA 或 Cas9 均无切割作用; 单独加入 CPP-sgRNA、CPP-Cas9、CPP 对细菌生长没有影响; CPP-sgRNA 与 CPP-Cas9 共同作用, 无细菌生长; 单独 sgRNA 与 CPP-Cas9 共同作用, 细菌生长轻度受抑。用同样的方法将 CPP-sgRNA + CPP-Cas9 处理肠道其他细菌后, 菌液 A 值和菌落计数与空白对照无差别。结论 建立的针对 tcdB 的 sgRNA 与 Cas9 混合可在体外高效切割 tcdB 基因, 抑制细菌生长; CPP 可提高 sgRNA 转染进入细菌的效率。

关键词: CRISPR/Cas9; 艰难梭菌; tcdB 基因; 穿膜肽

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2019.24.023

中图法分类号: R346

文章编号: 1673-4130(2019)24-3036-05

文献标识码: A

CRISPR targeting and incising toxin gene tcdB inhibits the growth of disease-causing *Clostridioides difficile*

ZHANG Dawei, XIA Yun[△], ZHAO Jinxin, CHEN Yinzhu, ZOU Jiaqi, YAN Jia, YANG Mi

(Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** The CRISPR/Cas9 system was used to cleave the major virulence factor tcdB gene of *Clostridioides difficile* to achieve specific inhibition of the growth of disease-causing *Clostridioides difficile*. **Methods** The sgRNA targeting tcdB was designed online, and sgRNA and Cas9 were separately or co-operated on the tcdB gene amplification product to verify the cleavage efficiency in vitro. The CPP-sgRNA or the sgRNA alone and CPP-Cas9 were used alone or in combination to the toxin-producing *Clostridioides difficile*, the inhibition of bacterial growth was observed by monitoring the A value of the bacterial liquid and the colony count. The same method was used to treat other bacteria in the intestine for specific verification. **Results** The combination of sgRNA and Cas9 can effectively cleave the tcdB amplification product, while sgRNA or Cas9 alone has no cleavage effect. In contrast to the untreated group, the groups in which CPP-sgRNA, CPP-Cas9, and CPP were added alone had no effect on bacterial growth; the group in which the CPP-sgRNA interacted with CPP-Cas9 has no bacterial growth; sgRNA and CPP-Cas9 Together, it has a slightly inhibited effect on bacterial growth. After treated used CPP-sgRNA + CPP-Cas9 by the same method, there was no difference of the A value and the colony count of the other intestinal bacteria from the blank. **Conclusion** The sgRNA targeting tcdB combined with Cas9 can efficiently cleave the tcdB gene and inhibit bacterial growth in vitro. CPP can improve the efficiency of sgRNA transfecting into bacteria.

Key words: CRISPR/Cas9; *Clostridioides difficile*; tcdB gene; penetrating peptide

艰难梭菌是一种革兰阳性厌氧芽孢杆菌^[1], 是医院感染性腹泻的主要病原菌, 主要引起自限性腹泻到中度腹泻、伪膜性肠炎。重症患者会出现中毒性巨结肠、肠穿孔、感染性休克等并发症, 甚至最终导致死

亡^[2-3]。随着大量使用广谱抗菌药物、质子泵抑制剂, 艰难梭菌感染的发病率、复发率和病死率越来越高, 艰难梭菌感染已成为世界范围内一个广受关注的新型公共卫生问题^[4]。甲硝唑、万古霉素、非达霉素是

作者简介: 张大炜, 男, 硕士研究生在读, 主要从事医院感染性疾病的诊断与治疗方向研究。 [△] 通信作者, E-mail: xiayun12cn@aliyun.com。

本文引用格式: 张大炜, 夏云, 赵靳鑫, 等. CRISPR 靶向切割毒力因子 tcdB 基因抑制致病艰难梭菌生长[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(24): 3036-3040.

2018 年美国感染病学会推荐治疗艰难梭菌感染的主要药物^[5],前两者都不是特异性地针对艰难梭菌,这种非特异性的杀菌往往导致肠道相关菌群的变化,造成艰难梭菌致病核糖体型的选择优势。临床常出现常规抗菌药物治疗效果不可预测、复发率较高的情况,并且目前已发现对甲硝唑和万古霉素均耐药的菌株^[6]。非达霉素作为治疗艰难梭菌感染的窄谱新药,尚未有明确的临床疗效评估,且在不远的将来有再度耐药的可能。近年来有用灭活毒素制备艰难梭菌疫苗的报道^[7-9],由于尚处于临床试验阶段,疗效尚未可知。艰难梭菌最主要的致病因子是其产生的毒素。有研究报道称,tcdB 是造成产毒艰难梭菌毒力的主要原因^[10]。CRISPR/Cas9 技术由于其高效的基因编辑能力而被广泛应用于基因工程领域。目前 CRISPR-Cas 系统多应用于真核细胞基因编辑领域,而应用于原核生物特别是作为抗微生物药物的研究尚不多见。有研究证明 CRISPR/Cas9 可以序列特异性的方式杀灭肺炎链球菌^[11],且细菌基因组内的任何序列都可以作为基于 CRISPR 抗微生物药物的靶标^[12]。

本文旨在建立靶向抑制 tcdB 基因的 CRISPR/Cas9 系统,运用穿膜肽将 sgRNA 和 Cas9 导入菌体内,在体外特异性切割艰难梭菌主要毒力因子 tcdB 基因,以特异性抑制致病菌株的生长。为开发一种新的治疗方法,降低临床抗菌药物非特异性的杀菌导致的肠道相关菌群失调的影响,提供思路。

1 材料与方法

1.1 菌株和引物 艰难梭菌标准菌株 ATCC43255,为本实验室保存;根据 GenBank 数据库中提供的艰难梭菌 tcdB 基因全长序列(Gene ID:491407.4)以引物设计软件 premier5.0 设计全长基因扩增引物,序列分别为上游引物:5'-ACT GTA GTA GAA TCA GCA ATA AAT GAT ACA C-3';下游引物:5'-TCC TCT CTC TGA ACT TCT TGC TAA TGA AG-3',扩增产物长度为 1 299 bp。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。在线设计 sgRNA 序列为:ATG AAC AAG AGT TGG TAG AAA GG。由于适当延长可以增强稳定性和剪切效果,利于转化,上游延申后形成 CTT ATA TGA ACA AGA GTT GGT AGA AAG G,作为靶向 tcdB 的 sgRNA 序列。用于与 Cas9 缀合的穿膜肽(CPP)序列为:4-马来酰亚胺基-GGG RRR RRR RRR LLL L(m9R),用于与 sgRNA 连接的 CPP 序列为:CGG GRR RRR RRR RLL LLC(9R)。

1.2 细菌培养 艰难梭菌培养:厌氧液体培养基(北京路桥技术有限责任公司),布鲁菌血琼脂(重庆庞通医疗器械有限公司),37 °C 厌氧袋培养;其他肠道菌培养:LB 培养基(Bioflux),哥伦比亚血平板(赛默飞世尔生物化学制品有限公司),37 °C 培养。

1.3 仪器与试剂 Cas9 和 sgRNA(百奥迈科生物技术有限公司)浓度均为 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、反应液(南京金斯瑞生物科技有限公司)、DL 2 000 DNA 标志物(Takara)、细菌 DNA 提取试剂盒(广州欣研生物科技有限公司)、DNA 产物纯化试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)、PCR 扩增仪(重庆道益医疗器械有限公司)、GelDoc™ XR 凝胶成像系统(美国 BIO-RAD)、气浴恒温振荡器(江苏金坛市岸头国瑞实验仪器厂)、恒温培养箱(Heal Force)、电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司)、冷冻离心机(德国艾本德公司)。

1.4 CRISPR 体外切割靶基因

1.4.1 tcdB 基因的扩增 扩增体系为 20 μL : ddH₂O 7.2 μL ,上游引物 0.4 μL ,下游引物 0.4 μL ,模板 2 μL ,Taq 酶 10 μL ;扩增步骤为 95 °C 10 min 预变性;94 °C 30 s,52 °C 30 s,72 °C 30 s,35 个循环;72 °C 10 min 延伸。扩增引物序列如 1.1 所示,扩增产物用 DNA 产物纯化试剂盒提纯,琼脂糖凝胶电泳证实目标基因扩增成功。

1.4.2 CRISPR 系统对 tcdB 的切割 (1)根据扩增产物浓度,设置反应混合物(扩增产物 40 nmol/L $\times$ 2.5 μL ,sgRNA 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}\times$ 2 μL ,Cas9 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}\times$ 2 μL ,反应液 4 μL ,用焦碳酸二乙酯处理过并经高温高压灭菌的纯水(DEPC-H₂O) 9.5 μL 。(2)将 sgRNA 与反应液预混 90 °C 孵育 10 min,并缓慢冷却至室温使 sgRNA 退火。(3)在未加 DNA 的反应混合物中加入和 sgRNA 等摩尔量的 Cas9 蛋白,室温下孵育 30~60 min。(4)将靶 DNA 添加到反应混合物中,并立即在 37 °C 下孵育 1~2 h,开始切割反应。(5)取出 10 μL 样品,加入 1 μL 蛋白酶 K,37 °C 孵育 30 min,以消化与 DNA 结合的 Cas9。(6)配置 1% 琼脂糖凝胶电泳,于 1 孔加入 2 000 bp 的 DNA 标志物,2、3、4 孔加入 1.4.1 的扩增产物,并分别于 2、3 孔加入 sgRNA 和 Cas9,5 孔加入 1.4.2 处理后的切割产物。220 V 30 min 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统显像。将 1.4.2 处理后的切割产物进行基因测序,以验证是否在预期位点切割成功。

1.5 CPP-sgRNA、CPP-Cas9 的制备

1.5.1 CPP-Cas9 的制备 (1)在 pH7.4 的缓冲液(PBS)中纯化 Cas9 蛋白(1 mg)、m9R 肽(50 μg),用于缀合。(2)将 m9R 逐滴加入 Cas9 蛋白质中进行缀合,不断轻拍管子以保证均匀混合。(3)使反应在振荡器上室温下持续 2 h。(4)过量游离或未结合的 m9R 肽是通过在 pH7.4 的 PBS 中 4 °C,24 h 透析除去。透析过程中更换 2~3 次缓冲液(PBS)。(5)对于透析,使用相对分子质量 50×10^3 的截留膜来确保透析袋中仅保留 Cas9-m9R 蛋白(168×10^3),而游离 m9R(2×10^3)被除去。(6)从透析膜收集 Cas9-m9R 蛋白,使用考马斯亮蓝法(Bradford 法)测定蛋白质浓

度检测。

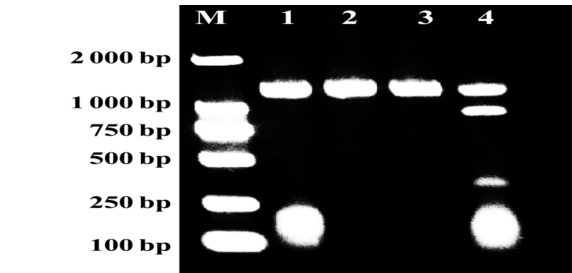
1.5.2 CPP-sgRNA 的制备 将 sgRNA 和 9R 肽以 1 : 3 的摩尔量混合,室温下孵育 30 min,形成 sgRNA:9R 复合物。

1.6 CRISPR 对产毒艰难梭菌生长的抑制作用 配置 0.5 麦氏浓度菌液,取 6 支无菌试管编号,每管加入 1 800 μ L 厌氧肉汤,200 μ L 菌液。管 1 作为空白对照,管 2~6 分别加入 CPP-sgRNA、CPP-Cas9、CPP、CPP-sgRNA + CPP-Cas9、sgRNA + CPP-Cas9。6 支试管震荡混匀,37 $^{\circ}$ C 厌氧培养,分别于 0、6、12、18、24 h 接种布鲁菌血琼脂平板菌落计数,并测菌液 A 值。

1.7 特异性验证 用同样的方法将 CRISPR 系统 (CPP-sgRNA+CPP-Cas9) 分别作用于不产毒艰难梭菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌、阴沟肠杆菌、鲍曼不动杆菌等细菌,观察细菌的生长情况。

2 结 果

2.1 tcdB 基因扩增产物的切割 琼脂糖凝胶电泳及测序结果均显示,加入 sgRNA 和 Cas9 后,靶基因在预期位点被成功切割开;单独加入 sgRNA 或 Cas9 后,靶基因未被切割开。



注:M 为标志物、1 为 sgRNA、2 为 Cas9、3 为空白对照、4 为 sgRNA+Cas9

图 1 CRISPR 系统切割 tcdB 基因扩增产物

2.2 CRISPR 对细菌生长的抑制作用 根据测定 A 值及菌落计数结果绘制经 CRISPR 不同成分处理产毒艰难梭菌的生长曲线,与空白对照比较,加入 CPP-sgRNA+CPP-Cas9 显著抑制产毒艰难梭菌生长,加入 sgRNA+CPP-Cas9 对产毒艰难梭菌生长有轻度抑制作用。而单独加入 CPP-sgRNA、CPP-Cas9 或 CPP 对产毒艰难梭菌生长无影响。同时将 CRISPR (CPP-sgRNA + CPP-Cas9) 作用于不产毒艰难梭菌,根据测定 A 值及菌落计数的对数绘制细菌的生长曲线。发现 CRISPR 只对产毒艰难梭菌有作用,对不产毒菌株无作用,表明本研究设计的 CRISPR 系统只对含有 tcdB 基因的产毒株有切割效果。同样的方法用其他细菌做效果验证实验,见图 2、3,A 值及菌落计数均和空白对照无差别。

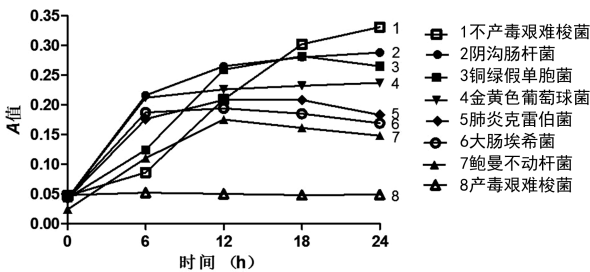
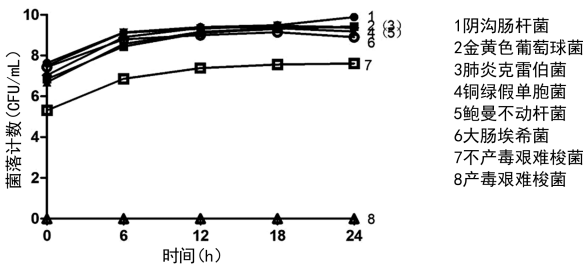


图 2 CRISPR 系统对不同细菌生长的吸光度的影响



注:纵坐标菌落计数取 Log10 的对数

图 3 CRISPR 系统对不同细菌生长的菌落计数的影响

3 讨 论

CRISPR/Cas9 技术作为一种新型的基因编辑技术逐步被用于对病原微生物的研究中。CITORIK 等^[13]运用 CRISPR 技术使 blaNDM-1 和 blaSHV-18 两种耐药基因的表达下降了 100~1 000 倍,这种高效的基因抑制作用可有效地阻止耐药突变株出现,因此 CRISPR-Cas 系统作为全新的抗菌药物制剂颇具开发潜力。这也使得运用 CRISPR 技术靶向切割毒力因子 tcdB 基因,抑制致病艰难梭菌生长成为可能。

本研究中,CRISPR/Cas9 在体外直接切割靶基因:由图 1 结果可知单独添加 sgRNA 或 Cas9 对靶基因无切割效果;只有将 sgRNA 和 Cas9 共同作用,才能将靶基因在预期的靶点成功切割开来,证实了本研究设计的 sgRNA 在体外切割测试中取得了成功。

用 CPP-sgRNA 与 CPP-Cas9 共同作用,无细菌生长;单独 sgRNA 与 CPP-Cas9 共同作用,对细菌生长影响轻微。表明单独的 sgRNA 递送能力差,CPP 可以提高 sgRNA 的递送效率,进而加强对细菌生长的抑制作用。sgRNA 与 CPP 的预混能更好地将 sgRNA 递送到菌体内,其原因可能是 sgRNA 和细胞膜本身都带负电荷,不易导入;当将 CPP 和 sgRNA 混合时能形成缩合的带正电的纳米颗粒,有助于将 sgRNA 递送到细胞中^[14]。单独加 CPP-sgRNA、CPP-Cas9 或 CPP 的菌落计数和 A 值与和空白对照管相差无异,表明 CRISPR 作用的发挥需要 sgRNA 和 Cas9 二者共同作用。另外单独的 CPP 对细菌也无作用,这与 ABUSHAHBA 等^[15]所持观点一致。

CRISPR/Cas9 载体的有效递送是实现高效靶基因表达抑制的关键,应用 CRISPR 系统消除 tcdB 基因的表达的关键就是如何将 sgRNA 和 Cas9 有效地递送至目标细菌体内。目前尚缺乏适宜的运载工具。

将表达 sgRNA 和 Cas9 的质粒采用转染剂或电转的方式转染进入目标细胞的方式转染效率不高。获得较高转染效率的做法是采用噬菌粒为载体^[16-17]。但因其难于纯化、宿主范围窄、要求细菌必须表达适宜的表面噬菌体受体等因素,实际转染效率并不高^[18]。而且目前还发现艰难梭菌细胞壁蛋白 CwpV 具有抵抗噬菌体的作用^[19],因此采用噬菌粒作为质粒递送工具对于艰难梭菌并不可行。

另一种比较有潜力的是使用 CPP 与重组 Cas9 蛋白和 sgRNA 结合后可以直接递送到哺乳动物细胞内^[20]。CPP 以其穿膜效率高、细胞毒性低、可以携带各种生物活性分子等优点因而在细胞转染方面得到广泛应用^[21-22]。目前常用的针对革兰阳性菌的穿膜肽有 (KFF)3K、GRKKKKRRQRRRYK、(RXR)4XB,据报道,GRKKKKRRQRRRYK、(RXR)4XB 的穿膜效果最好^[15]。有研究采用 (KFF)3K、(RXR)4XB 作为 CPP 携带靶向 *gyrA* 和 *ftsZ* 基因的肽核酸成功抑制多重耐药的鲍曼不动杆菌和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的生长^[23-24]。目前使用穿膜肽递送 CRISPR 的应用鲜见报道。

本研究首次运用穿膜肽来递送 CRISPR 系统。本研究中使用 CPP 递送 sgRNA 和 Cas9 蛋白,与将同时表达 sgRNA 和 Cas9 蛋白的质粒转染细胞相比,避免了通过质粒介导递送到细胞中导致的质粒序列不可控制地整合到宿主基因组中,以及附加的免疫反应和由细菌序列引起的潜在的安全问题。CPP 介导的 RGEN 传递系统,无需质粒和额外的转染试剂,并且减少了脱靶效应^[14]。本研究使用以穿膜肽为载体的 CRISPR/Cas9 系统,成功实现对艰难梭菌 *tcdB* 毒素基因的切割,抑制了艰难梭菌的生长。其原因可能与细菌缺少非同源末端连接的修复途径,运用 CRISPR 后引起的 DNA 双链断裂缺口容易引起细胞死亡有关^[25]。经其他细菌的特异性验证,本研究中设计合成的 CRISPR/Cas9 系统对产毒艰难梭菌显示了高度的特异性。

本研究构建的针对艰难梭菌毒素基因 *tcdB* 的 CRISPR/Cas9 系统,通过穿膜肽转染的方法,明确了 CRISPR-Cas9 能够高效特异切割艰难梭菌 *tcdB* 毒素基因,为 CRISPR/Cas9 系统应用于产毒艰难梭菌的精准特异治疗奠定了基础,同时成功构建了利用穿膜肽递送 CRISPR/Cas9 的新型递送系统,为临床治疗耐药菌感染提供了新的思路。由于该系统只对产毒艰难梭菌有作用,对不产毒艰难梭菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌、阴沟肠杆菌、鲍曼不动杆菌等细菌无作用,有利于保护肠道正常菌群,显示了其良好的应用前景。同时本研究尚存在不足之处,比如由于未做小鼠模型验证,本研究所建立的体系能否应用于体内环境及可能存在的问

题和缺陷,尚有待于进一步探究。

4 结 论

本研究设计的 CRISPR 系统可靶向切割 *tcdB* 毒素基因,抑制致病艰难梭菌生长,且具有高度特异性,有利于保护肠道正常菌群,为解决临床抗菌药物非特异性杀菌导致肠道菌群失调的问题及耐药菌感染的治疗提供了新的思路。

参考文献

- [1] MARTIN J S, MONAGHAN T M, WILCOX M H. Clostridium difficile infection; epidemiology, diagnosis and understanding transmission[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2016, 13(4): 206-216.
- [2] 程敬伟, 刘文恩, 马小军, 等. 中国成人艰难梭菌感染诊断和治疗专家共识[J]. 协和医学杂志, 2017, 8(1): 131-138.
- [3] LEFFLER D A, LAMONT J T. Clostridium difficile infection[J]. N Engl J Med, 2015, 372(1): 1539-1548.
- [4] KURT Z, LOVASZ B D, MANDEL M D, et al. Burden of Clostridium difficile infection between 2010 and 2013: Trends and outcomes from an academic center in Eastern Europe[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(21): 6728-6735.
- [5] MCDONALD L C, GERDING D N, JOHNSON S, et al. Clinical practice guidelines for clostridium difficile infection in adults and children; 2017 update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) [J]. Clin Infect Dis, 2018, 66(7): 987-994.
- [6] KNIGHT D R, GIGLIO S, HUNTINGTON P G, et al. Surveillance for antimicrobial resistance in Australian isolates of Clostridium difficile, 2013-14 [J]. J Antimicrob Chemother, 2015, 70(11): 2992-2999.
- [7] MATSUOKA O, PATEL D M, SASAKI S, et al. Safety and immunogenicity of Clostridium difficile toxoid vaccine in Japanese adults[J]. Hum Vaccin Immunother, 2018, 14(2): 322-328.
- [8] BÉZAY N, AYAD A, DUBISCHAR K, et al. Safety, immunogenicity and dose response of VLA84, a new vaccine candidate against Clostridium difficile, in healthy volunteers[J]. Vaccine, 2016, 34(23): 2585-2592.
- [9] VIDUNAS E, MATHEWS A, WEAVER M, et al. Production and characterization of chemically inactivated genetically engineered clostridium difficile toxoids [J]. J Pharm Sci, 2016, 105(7): 2032-2041.
- [10] KAZANOWSKI M, SMOLAREK S, KINNARNEY F, et al. Clostridium difficile; epidemiology, diagnostic and therapeutic possibilities-a systematic review[J]. Tech Coloproctol, 2014, 18(3): 223-232.
- [11] BIKARD D, HATOUM-ASLAN A, MUCIDA D, et al. CRISPR interference can prevent natural transformation and virulence acquisition during in vivo bacterial infection [J]. Cell Host Microbe, 2012, 12(2): 177-186.
- [12] GOMAA A A, KLUMPE H E, LUO M L, et al. Pro-

- grammable removal of bacterial strains by use of genome-targeting CRISPR-Cas systems[J]. MBio, 2014, 5(1): e00913-00928.
- [13] CITORIK R J, MIMEE M, LU T K. Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases[J]. Nat Biotechnol, 2014, 32(11): 1141-1145.
 - [14] RAMAKRISHNA S, KWAKU DAD A B, BELOOR J, et al. Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA[J]. Genome Res, 2014, 24(6): 1020-1027.
 - [15] ABUSHAHBA M F, MOHAMMAD H, THANGAMANI S, et al. Impact of different cell penetrating peptides on the efficacy of antisense therapeutics for targeting intracellular pathogens[J]. Sci Rep, 2016, 6(1): 20832.
 - [16] BIKARD D, EULER C W, JIANG W, et al. Development of sequence-specific antimicrobials based on programmable CRISPR/Cas9 nucleases[J]. Nat Biotechnol, 2014, 32(11): 1146-1150.
 - [17] BERNHEIM A G, LIBIS V K, LINDNER A B, et al. Phage-mediated Delivery of Targeted sRNA Constructs to Knock Down Gene Expression in E. coli. [J]. J Vis Exp, 2016, 30(2): 1012-1014.
 - [18] BEISEL C L, GOMAA A A, BARRANGOU R A. CRISPR design for next-generation antimicrobials[J]. Genome Biol, 2014, 15(11): 516-519.
 - [19] SEKULOVIC O, OSPINA BEDOYA M, FIVIAN-HUGHES A S, et al. The Clostridium difficile cell wall protein CwpV confers phase-variable phage resistance[J]. Mol Microbiol, 2015, 98(2): 329-342.
 - [20] RAMAKRISHNA S, KWAKUDAD A B, BELOOR J, et al. Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA[J]. Genome Res, 2014, 24(6): 1020-1027.
 - [21] KLIMPEL A, LUTZENBURG T, NEUNDORF I. Recent advances of anti-cancer therapies including the use of cell-penetrating peptides[J]. Curr Opin Pharmacol, 2019, 47(1): 8-13.
 - [22] DERAKHSHANKHAH H, JAFARI S. Cell penetrating peptides: a concise review with emphasis on biomedical applications[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 108(1): 1090-1096.
 - [23] WANG H, HE Y, XIA Y, et al. Inhibition of gene expression and growth of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii by antisense peptide nucleic acids[J]. Mol Biol Rep, 2014, 41(11): 7535-7541.
 - [24] LIANG S, HE Y, XIA Y, et al. Inhibiting the growth of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in vitro with antisense peptide nucleic acid conjugates targeting the ftsZ gene[J]. Int J Infect Dis, 2015, 30(1): 1-6.
 - [25] 张昆, 陈景超, 李祎, 等. CRISPR/Cas9 技术在微生物研究中的应用进展[J]. 微生物学通报, 2018, 45(2): 451-464.

(收稿日期: 2019-05-08 修回日期: 2019-08-28)

(上接第 3035 页)

- 厄贝沙坦治疗的疗效及其对血清 hs-CRP 和 BNP 水平的影响[J]. 河北医学, 2017, 23(7): 1158-1161.
- [2] 杨婷, 赵茜茜, 崔晓博, 等. 曲美他嗪联合卡维地洛治疗高血压性心脏病心力衰竭的临床效果[J]. 宁夏医科大学学报, 2017, 39(5): 579-582.
 - [3] CHEN Y, HONG X. Effects of carvedilol reduce conjunctivitis through changes in inflammation, NGF and VEGF levels in a rat model[J]. Exper Ther Med, 2016, 11(5): 1987-1992.
 - [4] 楼丽娜, 陈炼, 沈菁原, 等. 脑钠肽在慢性左心衰竭与肺源性心脏病的诊断及治疗中的价值[J]. 中国临床医学, 2015, 20(2): 186-188.
 - [5] 中华医学会心血管病学分会. 中国心力衰竭诊断和治疗指南 2014[J]. 中华心血管病杂志, 2014, 42(2): 3-10.
 - [6] 魏艺, 胡元会, 杨传华, 等. 老年高血压伴慢性心衰患者心功能分级与动态血压参数相关性研究[J]. 中国心血管病研究, 2015, 13(6): 497-501.
 - [7] 王淑辉, 张强, 杨丽红, 等. 他汀类药物对慢性心力衰竭合并中枢性睡眠呼吸暂停患者的影响研究[J]. 中国全科医学, 2016, 20(6): 628-632.
 - [8] 赵明昕, 于霞, 张晓非, 等. 瑞舒伐他汀钙片联合芪参益气滴丸治疗慢性心力衰竭的临床观察[J]. 中国药房, 2017, 28(8): 1098-1101.
 - [9] 李玲, 胡汉昆, 刘薇芝, 等. 卡维地洛对比美托洛尔治疗慢性心力衰竭疗效和安全性的 Meta 分析[J]. 中国药房, 2015, 26(6): 788-792.
 - [10] 杨婷, 赵茜茜, 崔晓博, 等. 曲美他嗪联合卡维地洛治疗高血压性心脏病心力衰竭的临床效果[J]. 宁夏医科大学学报, 2017, 39(5): 579-582.
 - [11] 杨婷, 赵茜茜, 崔晓博, 等. 曲美他嗪联合卡维地洛对高血压心脏病慢性心力衰竭患者心功能及 N 末端脑钠肽前体、肌钙蛋白 I 的影响[J]. 安徽医药, 2018, 22(5): 971-974.
 - [12] 杨婷, 赵茜茜, 崔晓博, 等. 曲美他嗪联合卡维地洛治疗高血压性心脏病心力衰竭的临床效果[J]. 宁夏医科大学学报, 2017, 39(5): 579-582.
 - [13] WANG L, LIU Z Q, HUO Y Q, et al. Change of hs-CRP, sVCAM-1, NT-proBNP levels in patients with pregnancy-induced hypertension after therapy with magnesium sulfate and nifedipine[J]. Asian Pacific J Trop Med, 2013, 6(11): 897-901.
 - [14] 周素芹, 童嘉毅, 朱从飞, 等. 奥美沙坦酯对慢性心力衰竭患者心功能、血浆 N 末端脑钠肽前体和血清白细胞介素 23 水平的影响[J]. 中国药房, 2017, 28(29): 4126-4129.
 - [15] CANDIDO S, ABRAMS S L, STEELMAN L S, et al. Roles of NGAL and MMP-9 in the tumor microenvironment and sensitivity to targeted therapy[J]. Mole Cell Res, 2016, 1863(3): 438-448.

(收稿日期: 2019-05-18 修回日期: 2019-09-10)