

文章编号 1006-8147(2022)05-0491-06

论 著

宫颈癌细胞 *PAX1* 基因甲基化的 CRISPR 靶向调控系统的构建

张文帆¹, 杨金豪¹, 陈爽¹, 时淑娟², 王蓉¹

(1.天津医科大学医学检验学院, 300203 天津; 2.天津医科大学基础医学院解剖教研室, 300070 天津)

摘要 目的: 建立 *PAX1* 基因甲基化的 CRISPR 靶向调控系统。方法: 首先, 通过甲基化特异性 PCR(MSP)测定宫颈癌细胞系(CaSki, SiHa)及正常细胞(人胚肾细胞 HEK293T)中 *PAX1* 基因启动子的 DNA 甲基化水平; 通过荧光定量 PCR(RT-PCR)和免疫印迹(Western blotting)分别检测上述细胞系的 mRNA 及蛋白表达。然后, 在 *PAX1* 高甲基化的宫颈癌细胞共转染 sgRNA(single guide RNA)和 dCas9-Tet1 质粒, 采用焦磷酸测序(Pyrosequencing)和 RT-PCR 分别检测其基因甲基化和表达水平的改变。最后, 结合生物信息学预测和 RT-PCR 评估该 CRISPR 系统的脱靶效应。结果: 与 HEK293T 细胞相比, 宫颈癌细胞的 *PAX1* 基因启动子呈现高甲基化, 且其 mRNA(CaSki: $t=9.13$; SiHa: $t=12.31$; $P<0.05$)和蛋白表达水平(CaSki: $t=16.72$; SiHa: $t=11.81$; $P<0.05$)均降低。在 CaSki 及 SiHa 细胞系中, 去甲基化 sgRNA3(act-sgRNA3)组调控最显著, 其 *PAX1* 基因的甲基化水平在 CaSki 和 SiHa 细胞系中分别下降了 22.21%($t=6.65$, $P<0.05$)、19.62%($t=17.00$, $P<0.05$), 其 mRNA 表达水平均显著上调($P<0.05$)。且该系统脱靶效应基因的表达差异均小于 2 倍。结论: 本研究成功建立了 *PAX1* 基因甲基化的 CRISPR 靶向调控系统, 可有效的降低其甲基化水平, 增强其内源性的表达水平。

关键词 宫颈癌; *PAX1*; DNA 甲基化; CRISPR 调控

中图分类号 R737.3

文献标志码 A

Construction of CRISPR-mediated targeted regulation system for *PAX1* methylation in cervical cancer cell

ZHANG Wen-fan¹, YANG Jin-hao¹, CHEN-Shuang¹, SHI Shu-juan², WANG Rong¹

(1.Department of Laboratory Medicine, Tianjin Medical University, Tianjin 300203, China; 2.Department of Human Anatomy and Histology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract **Objective:** To establish a CRISPR-mediated targeted regulation system for *PAX1* methylation. **Methods:** Firstly, methylation-specific PCR(MSP) was performed to examine the DNA methylation level of *PAX1* promoter in cervical cancer cells(CaSki, SiHa) and normal cells(human embryonic kidney cell, HEK293T). The mRNA and protein expression of these cell lines was detected by real time quantitative PCR(RT-PCR) and Western blotting. Secondly, single guide RNA(sgRNA) and dCas9-Tet1 plasmid were co-transfected into *PAX1* hypermethylated cells, and the changes in methylation and expression were detected via Pyrosequencing and RT-PCR, respectively. Finally, the off-target effect of the CRISPR system was evaluated by bioinformatics prediction and RT-PCR. **Results:** Compared with HEK293T cells, the methylation level of *PAX1* promoter was hypermethylated in cervical cancer cells, and the expression levels of mRNA(CaSki: $t=9.13$, SiHa: $t=12.31$, $P<0.05$) and protein(CaSki: $t=16.72$, SiHa: $t=11.81$, $P<0.05$) was decreased. In CaSki and SiHa cell lines, demethylated sgRNA3(act-sgRNA3) group had the most significant regulation. The methylation level of *PAX1* promoter in the sgRNA3 group(act-sgRNA3) was decreased by 22.21% ($t=6.65$, $P<0.05$) and 19.62% ($t=17.00$, $P<0.05$) in CaSki and SiHa cell lines, respectively, and the mRNA expression levels were significantly up-regulates ($P<0.05$). The difference of off-target effect on gene expression was less than 2-fold. **Conclusion:** Our study successfully establishes CRISPR-mediated targeted regulation system for *PAX1* methylation, which effectively downregulates the methylation level by increasing the endogenous expression level.

Key words cervical cancer; *PAX1*; DNA methylation; CRISPR regulation

配对基因盒 1(paired box1, *PAX1*)基因属于 Pax 家族, 是一种重要的转录因子^[1], 参与骨骼的发育形成^[2]。早期研究表明, *PAX1* 基因在脊柱畸形^[3]的发

生、胸腺及甲状旁腺器官发育中上皮细胞的死亡及增殖^[4-5]中发挥重要作用。近来, 随着对 DNA 甲基化的深入研究, *PAX1* 基因高甲基化与宫颈癌发生的相关性被广为报道^[6]。此外, *PAX1* 基因甲基化与卵巢癌^[7]、甲状旁腺癌^[8]、口腔鳞癌^[9]、头颈癌^[10]、食管鳞癌^[11]等的关系亦有报道。

DNA 甲基化引起的基因异常表达是一个可逆

基金项目 国家自然科学基金青年基金(81601836); 天津市科技计划项目技术创新引导专项基金(21YDTPJC00720)

作者简介 张文帆(1998-), 女, 硕士在读, 妇科肿瘤的表现遗传; 通信作者: 王蓉, E-mail: wangrong825@tmu.edu.cn。

的过程,这为肿瘤的治疗提供了希望。但由于缺乏特异性干扰基因甲基化的靶向调控工具,限制了其药物的临床应用和甲基化基因标志物功能的深入研究。而 CRISPR(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)技术的诞生则为解决以上这些研究难点带来了曙光。此外,CRISPR 系统里具有“剪刀”功能的 Cas9 蛋白可被改造成 dCas9(dead Cas9),既保留了与靶位点结合的功能,还可以附加激活^[12]、抑制^[13]、加甲基化和去甲基化^[14]等效应分子,变成具有调控基因表达功能的工具,这为靶向甲基化基因的功能研究及药物开发开辟了道路。因此,本研究旨在采用最新的 CRISPR 技术构建靶向宫颈癌 *PAX1* 基因甲基化的调控系统,为后续的靶向治疗和基因功能的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 细胞培养 人宫颈癌细胞 CaSki(HPV18+)及 SiHa(HPV16+)细胞系,正常细胞(人胚肾细胞 HEK293T)(购自中舟新乔,上海),在含有 10%胎牛血清(BI,美国)、100 U/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素(索莱宝,北京)的 RPMI 1640、MEM、DMEM (HyClone,美国)培养基中分别进行培养。

1.2 单导向 RNA(single guide RNA,sgRNA)设计、合成及质粒转染 经 CRISPR-EAR 在线网站(<http://crispr-era.stanford.edu/>)^[15]设计靶向 *PAX1* 基因启动子区域的 sgRNA,选取评分较高的 4 个用于激活基因表达的 sgRNA(act-sgRNA)(表 1),通过 Q5 超保真聚合酶(NEB,美国)进行体外两步 PCR 法合成,纯化后存于-20℃。质粒 Fuw-dCas9-Tet1CD(dCas9-Tet1, #84475),Fuw-dCas9-Tet1CD_IM(dCas9-Tet1^m, Tet1 突变体, #84479)均来自于 Addgene^[14]。将每孔 5×10⁵ 个的细胞接种到 6 孔板,24 h 后在 6 孔板中共转染 dCas9-Tet1CD(实验组)或 dCas9-Tet1^m(对照组)和单独或组合的 act-sgRNA,48 h 后加入含有 zeocin(Invitrogen,美国)的培养基进行筛选。3 d 后收集细胞,分别提取 DNA 和 RNA。

表 1 用于靶向激活 *PAX1* 基因表达的 sgRNA 序列

Tab 1 The sgRNA sequences for targeted activation of *PAX1* expression

sgRNA 名称	序列(5'→3')	TSS	+/-
act-sgRNA1	GTCAATCTCGGCAGTCACGC	-34	+
act-sgRNA2	GATCCCGATCTGCTGCTAAG	-780	+
act-sgRNA3	GGTCCGAGATTCCACCGCCA	-900	-
act-sgRNA4	GGTGGGATCACTACCCACGC	-493	+

注:*PAX1*:配对基因盒;TSS:距离转录起始位置;+:正义链;-:反义链

1.3 RNA 提取及荧光定量 PCR(Real time PCR,RT-PCR) 用 Trizol 试剂(Invitrogen,美国)提取细胞的总 RNA,并使用 Nano Drop2000c 检测 RNA 的浓度和质量,取 1 800 ng RNA 根据 FastQuant RT 试剂盒(天根,中国)说明书进行逆转,以 cDNA 为模板,采用 SYBR green 试剂盒检测 mRNA 的表达(GADPH 为内参),引物序列见表 2。

表 2 RT-PCR 引物

Tab 2 The primers for RT-PCR

引物	序列(5'→3')
PAX1-mRNA-F	GCTCGTATGGAGCAGACG
PAX1-mRNA-R	AGCTGCCGACTGATGTCAC
GAPDH-mRNA-F	GAAATCCCATCACCATCTTCCAGG
GAPDH-mRNA-R	GAGCCCCAGCCTTCTCCATG
脱靶效应预测基因	
FNTA-mRNA-F	TGGACGACGGGTTTGTGAG
FNTA-mRNA-R	ACCGGATCTATATCAGCCCAT
ARAP1-mRNA-F	AGGATGACCACGCCTATGAG
ARAP1-mRNA-R	CCTGCGGTGGCTTCTTGTGTC
NEDD4-mRNA-F	TCCAATGATCTAGGCCCTTTACC
NEDD4-mRNA-R	TCCAACCGAGGATCTTCCCAT
ILDR2-mRNA-F	AGTGCCCGACAAGAAGAAGG
ILDR2-mRNA-R	CGATCCTGGCAGTAGGACT
KHK-mRNA-F	CTAAGGAGGACTCGGAGATAAGG
KHK-mRNA-R	CATTGAGCCCATGAAGGCAC

1.4 DNA 的亚硫酸处理(BS)和甲基化特异性 PCR(MSP) DNA 提取同前所述采用氯酚法^[16]。将抽提的 DNA 通过 Nano Drop2000c 进行浓度和质量检测后,健康女性的白细胞 DNA 作为阴性对照(Leu),健康女性白细胞 DNA 进行体外加甲基后作为阳性对照(IV)。参照 EZ DNA Methylation Kit(Zymo Research)试剂盒说明书进行重亚硫酸氢盐处理。上述 BS 后的 DNA 为模板,使用 Methyl primer express 软件进行引物合成,序列见表 3。采用 Amplitaqgold 酶(ABI,美国)进行 PCR 反应,反应条件为:95℃预变性,5 min;94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 40 s,共 40 个循环,72℃延伸 10 min。反应产物用 2%的琼脂糖凝胶电泳,Bio-Rad 成像分析仪观察结果。

1.5 焦磷酸测序(Pyrosequencing) 用 PyroMark Assay Design 2.0 软件进行引物设计(表 3),对下游引物 5'端进行生物素标记,以 BS 后的 DNA 为模板优化条件并进行 PCR 扩增。按照 PyroMark Q24 焦磷酸测序仪中甲基化分析要求对 PCR 产物进行测序。

1.6 脱靶效应检测 通过在线工具 COSMID(<https://crispr.bme.gatech.edu/>)^[17]对 *PAX1*-act-sgRNA3 的脱靶基因进行预测,选取具有脱靶可能的 Top5 个基因,通过 RT-PCR 检测 5 个基因在实验组

及对对照组的表达差异,引物见表4。

表3 MSP 及焦磷酸测序所用引物

Tab 3 The primers for MSP and Pyro sequences

用途	引物名称	序列(5'→3')
MSP	PAX1-M-F	TATTTTGGGTTTGGGTCGC
	PAX1-M-R	CCCGAAAACCGAAAACCG
	PAX1-U-F	GTTTATTTTGGGTTTGGGTTGT
	PAX1-U-R	CACCCAAAAACCAAAAACAC
焦磷酸测序	sgRNA3pyro-F	AGGTTAGGTTATTGGGATAGAGT
	sgRNA3pyro-R	ACCCAACCAACCAAACTCA
	sgRNA3pyro-S	GGTTATTTGGGATAGAGTG

表4 脱靶效应评分较高的前5个基因

Tab 4 The top 5 genes with high off-target effect score

靶向序列(act-sgRNA3)	基因名称	评分
GCTGGAGACTCCACCGCCAGGG	FNTA	1.33
GCTGGAGAGGCCACCGCCAGGG	ARAP1	1.90
TGTGCAGATTCCACAGCCAAGG	NEDD4	3.14
GCTGCCAGATTCCACCCCAAGG	ILDR2	3.34
GGTGGTAGATTCCACCCCAAGG	KHK	3.91

1.7 免疫印迹(Western blotting) 细胞经 RIPA 裂解液裂解后分离并提取蛋白,利用 BCA 法定量检测蛋白含量,配置浓度为 10%的 SDS-PAGE 凝胶,每个加样孔均加入等质量的蛋白,电泳后转印至硝酸纤维素膜上,并置于 5%的脱脂牛奶内封闭 1.5 h,分别加入稀释的一抗:GAPDH(Bioss),PAX1(Abcam)过夜孵育,第2天加入对应种属性的二抗,漂洗后加入 ECL 发光试剂,置于 Bio-Rad 凝胶成像仪成像,并通 Image J 进行灰度值分析。

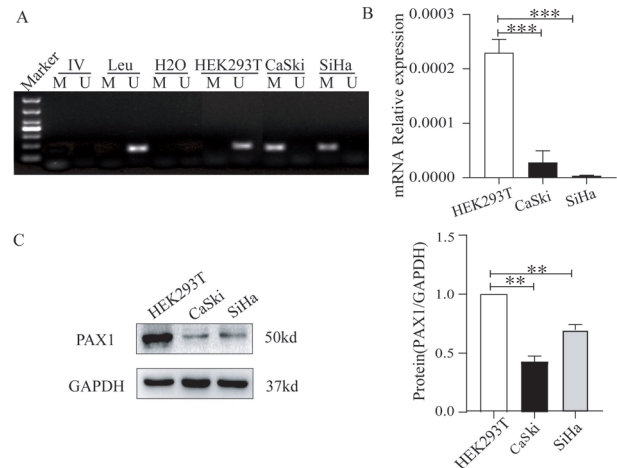
1.8 统计学处理 采用 Graphpad Prism8.0 统计软件对数据进行统计分析。计量资料经正态性检验,符合正态分布的用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间表达差异比较采用 *t* 检验,不符合正态分布的采用 Mann-Whitney *U* 检验进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *PAX1* 基因的启动子甲基化及表达水平验证 MSP 结果表明 *PAX1* 基因启动子在宫颈癌细胞 CaSki 和 SiHa 中呈现高甲基化,而在正常细胞 HEK293T 细胞中呈现未甲基化(图 1A)。在转录水平,*PAX1* 在宫颈癌细胞的表达显著低于 HEK293T 细胞(CaSki: $t=9.13$,SiHa: $t=12.31$, $P < 0.05$)(图 1B),同样,*PAX1* 在宫颈癌细胞的蛋白表达水平亦低于 HEK293T 细胞(CaSki: $t=16.72$,SiHa: $t=11.81$, $P < 0.05$)(图 1C)。

2.2 靶向激活 *PAX1* 基因表达,降低其启动子的甲基化水平 将 dCas9-Tet1 与 4 个 act-sgRNA 单独

或联合共转染后,CaSki 细胞系中,相对于对照组,实验组 act-sgRNA2、sgRNA3、sgRNA4 及 sgRNA1+2+3+4 共转染组的 *PAX1* 表达分别增加了 3.49、35.95、33.63 及 6.50 倍($t=5.84$ 、11.16、9.79、8.72,均 $P < 0.05$),其中 act-sgRNA3 组的上调作用最显著(图 2A)。Pyrosequencing 结果表明相对于对照组,实验组的甲基化水平平均下降了 22.21%($t=6.65$, $P < 0.05$)(图 2B、2C)。



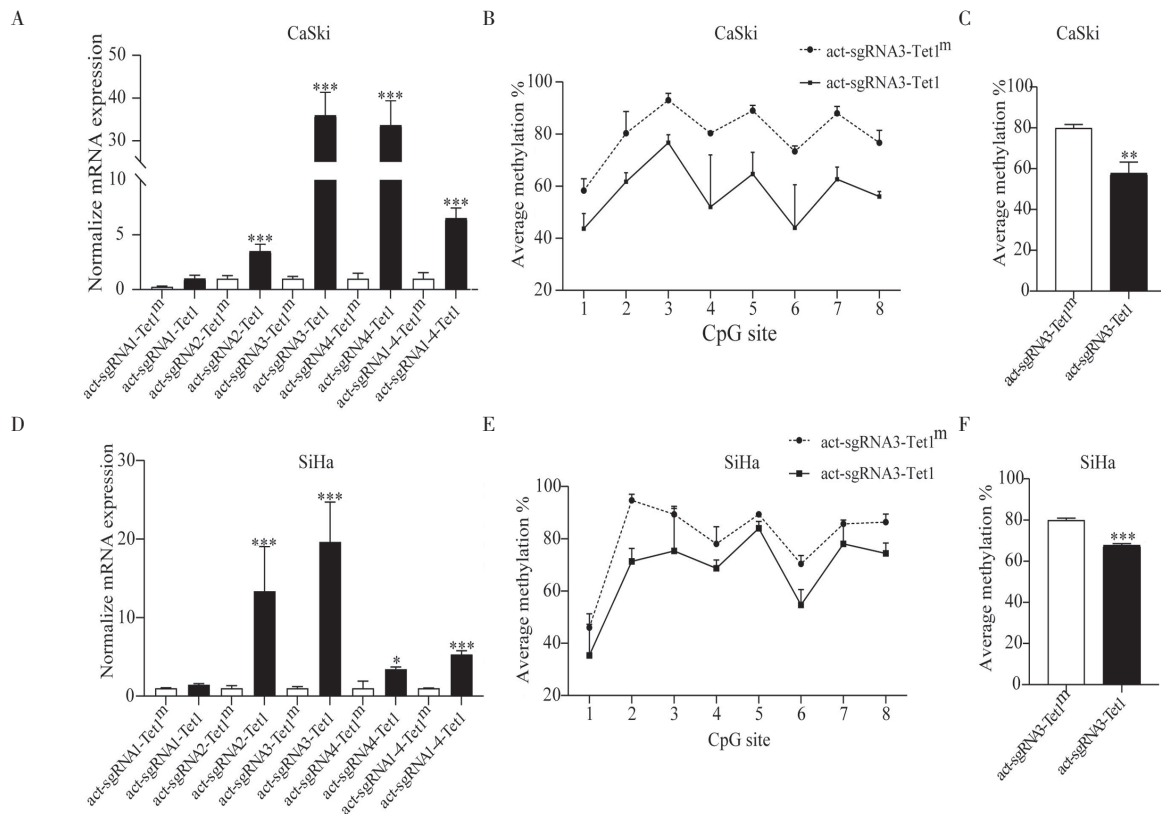
注:A:通过 MSP 检测宫颈癌细胞系 CaSki 及 SiHa 细胞系 *PAX1* 基因启动子呈高甲基化而 HEK293T 细胞呈现未甲基化;M:甲基化;U:未甲基化;Leu:健康女性的白细胞 DNA 作为阴性对照;IV:健康女性白细胞 DNA 进行体外加甲基后作为阳性对照。B:RT-PCR 检测相对于 HEK293T 细胞,宫颈癌细胞中 *PAX1* 基因的 mRNA 表达显著下降($t=9.13$ 、12.31,均 $P < 0.05$);C:Western 印迹结果表明宫颈癌细胞中 *PAX1* 蛋白水平的表达低于 HEK293T 细胞($t=16.72$ 、11.81,均 $P < 0.05$)

图1 细胞系中 *PAX1* 基因甲基化及表达水平验证

Fig 1 Validation the methylation and expression level of *PAX1* in cells

在 SiHa 细胞中 act-sgRNA2、sgRNA3、sgRNA4 及 sgRNA 共转染(sgRNA1+2+3+4)组的 *PAX1* 表达相对于对照组分别增加了 13.35、19.62、3.43 及 5.29 倍($t=3.76$ 、6.34、4.53、14.96,均 $P < 0.05$)(图 2D),其中 act-sgRNA3 组上调最明显。定量检测 *PAX1* 基因甲基化水平后,其甲基化水平平均下降了 19.62%($t=17.00$, $P < 0.05$)(图 2E、2F)。

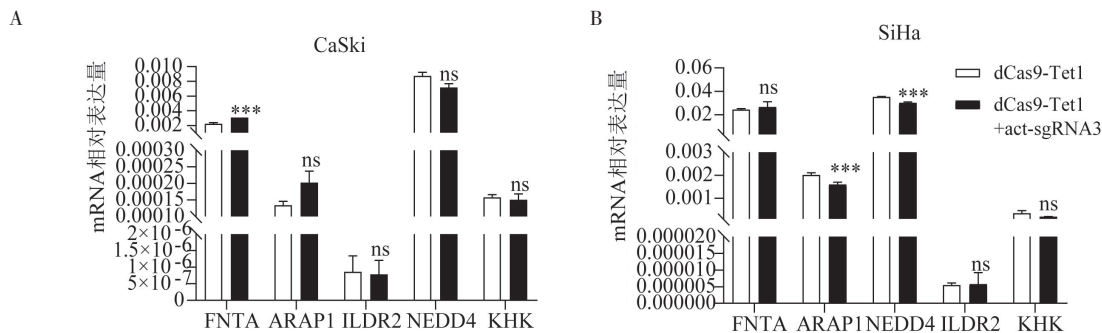
2.3 脱靶效应验证 通过在线工具 COSMID 预测调控效果最为明显的 act-sgRNA3 实验组存在的脱靶基因,并选择 Top 5 基因:*FNTA*、*ARAP1*、*NEDD4*、*ILDR2* 和 *KHK*。其 RT-PCR 结果表明,相对于对照组,CaSki 细胞中 *FNTA* 基因表达上调了 1.38 倍($t=8.68$, $P < 0.05$),SiHa 细胞中 *APAR1*、*NEDD4* 基因分别是对照组的 0.79、0.85 倍($t=5.00$ 、9.41, $P < 0.05$),其他未见显著变化,见图 3。



注:与对照组(Tet1^m, Tet1 突变)相比, dCas9-Tet1 联合 sgRNA 可显著上调 CaSki(A)和 SiHa(D)中 PAX1 的表达水平;焦磷酸测序结果表明 CaSki(B)和 SiHa(E)细胞系中 act-sgRNA3 组 PAX1 启动子中的甲基化低于对照组;与对照组相比, act-sgRNA3 组 PAX1 启动子区平均甲基化水平在 CaSki(C)和 SiHa(F)中分别下降了 22.21%($t=6.65, P<0.05$)、19.62%($t=17.00, P<0.05$)

图 2 基于 dCas9-Tet1 靶向降低 PAX1 基因启动子甲基化水平

Fig 2 Targeted downregulation of the promoter of PAX1 methylation based on dCas9-Tet1



注:RT-PCR 检测 CaSki(A)及 SiHa(B)细胞中实验组(dCas9-Tet1+act-sgRNA3)及对照组(dCas9-Tet1)的 5 个脱靶基因(FNTA、ARAP1、NEDD4、ILDR2 和 KHK)的 mRNA 表达差异

图 3 对 dCas9-Tet1+act-sgRNA3 组合的脱靶效应检测

Fig 3 Detection of off-target effect of dCas9-Tet1 and act-sgRNA3

3 讨论

宫颈癌是最常见的女性癌症之一,我国宫颈癌发病率占全球发病率的 20.2%,并以每年 10.5% 的速率增长,而且逐步年轻化,严重威胁我国女性的健康^[18]。既往研究表明, PAX1 基因高甲基化与宫颈癌之间存在密切的联系^[19]。其甲基化程度在宫颈癌不同病变时期中存在差异,在早期对指导宫颈癌患者进行特异性治疗有一定临床作用。靶向调控

PAX1 基因甲基化水平为后期宫颈癌的精准治疗提供了思路。目前,美国食品与药品监督管理局(FDA)已批准了 DNA 甲基化抑制剂如 5-Aza-2'-deoxycytidine(5'-Aza)等药物应用于败血病和淋巴瘤患者的治疗^[20],但该类药物存在易获得耐药,在实体瘤中疗效较差,且缺乏特异性等诸多缺陷^[21]。Zhang 等^[22]亦发现在宫颈癌细胞中敲低 DNA 甲基化转移酶 DNMT1,虽可降低 PAX1 基因的甲基化水平,增加

其表达,但其特异性较差,其他基因亦被调控。

近来,有研究尝试利用 CRISPR-dCas9-Tet1/DN-MT3a 工具特异性调控 *Tau*、*TRIM58* 基因的甲基化水平,从而为阿尔兹海默病^[23]、肾透明细胞癌^[24]等疾病的靶向治疗提供了新的思路。然而,在宫颈癌领域还未见报道,因此,本研究首次采用 CRISPR 技术成功构建了激活 *PAX1* 内源性表达的靶向基因甲基化的调控系统,为后续研究奠定了理论和实验基础。

DNA 甲基化主要发生在碱基胞嘧啶第 5 位碳原子上,称为 5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, 5-mC)^[25]。研究发现,DNA 甲基化是可逆且呈动态变化的,主要由 DNA 甲基化转移酶(DNMTs)和羟甲基化酶(Tets)动态调节^[26]。DNMT1 和 DNMT3A/3B 分别负责 DNA 甲基化的建立和维持,而 Tet 蛋白通过连续氧化将 5-mC 转化为 5-羟甲基胞嘧啶进而 5-甲酰基胞嘧啶再而 5-羧基胞嘧啶,然后被胸腺嘧啶 DNA 糖基化酶(TDG)识别并消化,从而实现 DNA 去甲基化^[27]。Zhang 等^[22]发现在宫颈癌细胞系 HeLa 及 SiHa 细胞中直接敲除 DNMT1 后 *PAX1* 的基因表达则分别是对照组的 4.98、2.88 倍。而本研究将具有催化活性的 Tet1 融合到 dCas9 上,在特异性 sgRNA 指导下,靶向 *PAX1* 基因启动子区域进行去甲基化调控。结果表明,在 CaSki 及 SiHa 细胞中,单一 act-sgRNA3 组有效的降低了 *PAX1* 基因的甲基化水平,在 CaSki 及 SiHa 细胞中甲基化平均水平降低。由此可见,本研究构建的 CRISPR 系统的基因靶向干扰技术具有较高的调控效能。

此外,由于 CRISPR 的脱靶效应一直是人们关注的问题,脱靶效应在治疗时可能对非靶向基因造成影响,带来不可预控的严重后果。既往研究表明提高 sgRNA 的特异性可有效降低 CRISPR 的脱靶效应^[28-29]。Liu 等^[30]发现,靶向启动子可设计特异性更高的 sgRNA 并减少 dCas9-Tet1 的潜在脱靶结合。因此,本研究通过 CRISPR-ERA 在线工具,选择靶向于 *PAX1* 基因启动子区域且特异性评分较高的 sgRNA,最大程度减少 CRISPR 系统的脱靶效应。目前检测 CRISPR 脱靶效应的方法主要有模拟计算预测和基础研究实验方法^[31]。本研究则结合计算预测和实验验证,通过 COMSIS 工具预测了 act-sgRNA3 的脱靶基因,并对 act-sgRNA3 的脱靶效应进行了实验验证。结果表明,与对照组相比,实验组中脱靶基因的表达差异均小于 2 倍,明显低于靶基因 *PAX1* 上调的倍数,证明了本研究所用系统的脱靶效应较小。

CRISPR 甲基化调控系统在特异性的降低基因

启动子甲基化水平的同时,可激活靶基因内源性的表达。既往研究发现,内源性基因表达具有独特的转录组和内源性表达水平^[32]。根据 UCSC(<https://genome.ucsc.edu/>),*PAX1* 基因具有 3 种异构体和各种单核苷酸多态性(SNPs)。不同的 SNPs 在神经嵴发育和青少年特发性脊柱侧凸中发挥不同的作用^[33]。因此,激活内源性 *PAX1* 表达对于观察细胞内部的真实情况是必要的。通过 CRISPR 基因编辑技术内源性调控靶基因的表达,在精确治疗方面有很大的潜力。

综上所述,对宫颈癌中 *PAX1* 基因的甲基化进行调控可有效地改变其表达水平。本研究建立的靶向 *PAX1* 基因甲基化调控的工具对今后宫颈癌的靶向治疗具有重要的意义和价值。本课题组也将基于上述甲基化调控系统对 *PAX1* 基因甲基化机制继续开展实验研究,为后续 *PAX1* 甲基化对宫颈癌治疗潜力的挖掘奠定基础。

参考文献:

- [1] LAMBERT S A, JOLMA A, CAMPITELLI L F, et al. The human transcription factors[J]. *Cell*, 2018, 172(4): 650-665.
- [2] BALLING R, HELWIG U, NADEAU J, et al. Pax genes and skeletal development[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1996, 785: 27-33.
- [3] CHALEPAKIS G, FRITSCH R, FICKENSCHER H, et al. The molecular basis of the undulated/Pax-1 mutation[J]. *Cell*, 1991, 66(5): 873-884.
- [4] WALLIN J, EIBEL H, NEUBÜSER A, et al. Pax1 is expressed during development of the thymus epithelium and is required for normal T-cell maturation[J]. *Development*, 1996, 122(1): 23-30.
- [5] SU D, ELLIS S, NAPIER A, et al. Hoxa3 and pax1 regulate epithelial cell death and proliferation during thymus and parathyroid organogenesis[J]. *Dev Biol*, 2001, 236(2): 316-329.
- [6] LAI H C, LIN Y W, HUANG T H, et al. Identification of novel DNA methylation markers in cervical cancer[J]. *Int J Cancer*, 2008, 123(1): 161-167.
- [7] SU H Y, LAI H C, LIN Y W, et al. An epigenetic marker panel for screening and prognostic prediction of ovarian cancer[J]. *Int J Cancer*, 2009, 124(2): 387-393.
- [8] SULAIMAN L, JUHLIN C C, NILSSON I L, et al. Global and gene-specific promoter methylation analysis in primary hyperparathyroidism[J]. *Epigenetics*, 2013, 8(6): 646-655.
- [9] SUN R, JUAN Y C, SU Y F, et al. Hypermethylated PAX1 and ZNF582 genes in the tissue sample are associated with aggressive progression of oral squamous cell carcinoma[J]. *J Oral Pathol Med*, 2020, 49(8): 751-760.
- [10] GUERRERO-PRESTON R, MICHAELIDI C, MARCHIONNI L, et al. Key tumor suppressor genes inactivated by "greater promoter" methylation and somatic mutations in head and neck cancer[J]. *Epigenetics*, 2014, 9(7): 1031-1046.
- [11] TANG L, LIOU Y L, WAN Z R, et al. Aberrant DNA methylation of PAX1, SOX1 and ZNF582 genes as potential biomarkers for esophageal

- squamous cell carcinoma[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 120: 109488.
- [12] CHAVEZ A, SCHEIMAN J, VORA S, et al. Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming[J]. Nat Methods, 2015, 12(4): 326-328.
- [13] THAKORE P I, D'IPPOLITO A M, SONG L, et al. Highly specific epigenome editing by CRISPR-Cas9 repressors for silencing of distal regulatory elements[J]. Nat Methods, 2015, 12(12): 1143-1149.
- [14] LIU X S, WU H, JI X, et al. Editing DNA methylation in the mammalian genome[J]. Cell, 2016, 167(1): 233-247.e17.
- [15] LIU H, WEI Z, DOMINGUEZ A, et al. CRISPR-ERA: a comprehensive design tool for CRISPR-mediated gene editing, repression and activation[J]. Bioinformatics, 2015, 31(22): 3676-3678.
- [16] ZHAO J, CAO H, ZHANG W, et al. SOX14 hypermethylation as a tumour biomarker in cervical cancer[J]. BMC Cancer, 2021, 21(1): 675.
- [17] CRADICK T J, QIU P, LEE C M, et al. COSMID: a web-based tool for identifying and validating CRISPR/Cas off-target sites[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2014, 3(12): e214.
- [18] XIA C, XU X, ZHAO X, et al. Effectiveness and cost-effectiveness of eliminating cervical cancer through a tailored optimal pathway: a modeling study[J]. BMC Med, 2021, 19(1): 62.
- [19] LUAN T, HUA Q, LIU X, et al. PAX1 Methylation as a potential biomarker to predict the progression of cervical intraepithelial neoplasia: a meta-analysis of related studies[J]. Int J Gynecol Cancer, 2017, 27(7): 1480-1488.
- [20] JONES P A, ISSA J P, BAYLIN S. Targeting the cancer epigenome for therapy[J]. Nat Rev Genet, 2016, 17(10): 630-641.
- [21] KARDOONI H, GONZALEZ-GUALDA E, STYLIANAKIS E, et al. CRISPR-mediated reactivation of DKK3 expression attenuates TGF-beta signaling in prostate cancer[J]. Cancers (Basel), 2018, 10(6): 165.
- [22] ZHANG Y, CHEN F Q, SUN Y H, et al. Effects of DNMT1 silencing on malignant phenotype and methylated gene expression in cervical cancer cells [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2011, 30(1): 98.
- [23] NUNEZ J K, CHEN J, POMMIER G C, et al. Genome-wide programmable transcriptional memory by CRISPR-based epigenome editing [J]. Cell, 2021, 184(9): 2503-2519.e17.
- [24] GAN Y, CAO C, LI A, et al. Silencing of the TRIM58 gene by aberrant promoter methylation is associated with a poor patient outcome and promotes cell proliferation and migration in clear cell renal cell carcinoma[J]. Front Mol Biosci, 2021, 8: 655126.
- [25] YANG T, LIU X, KUMAR S K, et al. Decoding DNA methylation in epigenetics of multiple myeloma[J]. Blood Rev, 2022, 51: 100872.
- [26] LIU C, LI H, LIN J, et al. Genome-wide characterization of DNA demethylase genes and their association with salt response in pyrus [J]. Genes (Basel), 2018, 9(8): 135-138.
- [27] MAROUFI F, MAALI A, ABDOLLAHPOUR-ALITAPPEH M, et al. CRISPR-mediated modification of DNA methylation pattern in the new era of cancer therapy[J]. Epigenomics, 2020, 12(20): 1845-1859.
- [28] PATTANAYAK V, LIN S, GUILINGER J P, et al. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity[J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(9): 839-843.
- [29] LIU X S, WU H, KRZISCH M, et al. Rescue of fragile X syndrome neurons by DNA methylation editing of the FMR1 gene[J]. Cell, 2018, 172(5): 979-992.e6.
- [30] FU Y, FODEN J A, KHAYTER C, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells[J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(9): 822-826.
- [31] NAEEM M, MAJEED S, HOQUE M Z, et al. Latest developed strategies to minimize the off-target effects in CRISPR-Cas-mediated genome editing [J]. Cells, 2020, 9(7): 1608.
- [32] RICKARD A M, PETEK L M, MILLER D G. Endogenous DUX4 expression in FSHD myotubes is sufficient to cause cell death and disrupts RNA splicing and cell migration pathways[J]. Hum Mol Genet, 2015, 24(20): 5901-5914.
- [33] LIU G, LIU S, LI X, et al. Genetic polymorphisms of PAX1 are functionally associated with different PUMC types of adolescent idiopathic scoliosis in a northern Chinese Han population[J]. Gene, 2019, 688: 215-220.

(2022-01-24 收稿)

新理念 新定位 新内涵 新医科