[文章编号] 1003－4684(2026)02-0105-07

STING 基因敲除 HCT116 细胞系构建及其对 oHSV2 复制的影响

陈明鑫，钟 莉，王润杨，胡 翰，汪 洋，刘滨磊

（湖北工业大学生命科学与健康工程学院，湖北 武汉 430068）

[摘 要] 为探究 *STING* 基因对溶瘤Ⅱ型单纯疱疹病毒(oHSV2)在结肠癌细胞中复制的调控作用，利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术，针对人 *STING* 基因外显子设计 2 条特异性 sgRNA，构建至 pX459 载体并共转染结肠癌 HCT116 细胞，经嘌呤霉素筛选与有限稀释法获得单克隆细胞株。通过 Sanger 测序及 Western-blot 验证，成功构建 HCT116$^{STING-/-}$敲除细胞系。CCK-8 法检测结果显示，*STING* 敲除不影响 HCT116 细胞的基础活力。以 oHSV2 分别感染野生型与 *STING* 敲除细胞，采用 CCK-8 法、RT-qPCR(实时荧光定量 PCR)及 $CCID_{50}$(半数细胞感染剂量)检测病毒的溶瘤效果和复制水平。结果表明：*STING* 敲除可显著提高细胞内 oHSV2 基因拷贝数与病毒滴度，增强 HCT116 细胞对溶瘤病毒的敏感性。本研究成功构建 *STING* 基因敲除的 HCT116 细胞系，证实 *STING* 可抑制 oHSV2 在结肠癌细胞中的复制，为筛选溶瘤病毒宿主限制因子及优化溶瘤病毒治疗策略提供实验依据。

[关键词] *STING*；CRISPR/Cas9；HCT116 细胞；oHSV2；病毒复制

[中图分类号] R735.3 [文献标识码] A

结肠癌发生和发展的过程十分复杂，治疗结肠癌的方法主要是外科治疗，放射治疗以及使用奥沙利铂、5-FU 等化疗药物的内科治疗[1]。随着基因治疗与免疫疗法的发展，溶瘤病毒在结肠癌治疗中展现出显著效果。然而，由于组织和细胞的异质性，某些宿主因子的突变可能导致病毒无法有效感染肿瘤细胞，进而造成溶瘤病毒治疗失败。因此，检测宿主因子对实现溶瘤病毒的精准治疗具有重要意义[2]。CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/ CRISPR-associated protein 9)作为新一代基因编辑工具，可在引导 RNA (sgRNA)介导下识别并结合靶基因互补 DNA 片段，通过 Cas9 蛋白切割 DNA 双链使得基因断裂，从而实现基因敲除。该技术在寻找溶瘤病毒宿主依赖因子或限制因子方面也发挥着重要作用。多项研究报道，*HS* 在 HSV-1/2 病毒进入细胞过程中起重要作用，缺乏 EXT1 的细胞可免受 HSV-1 感染[3]。此外，在 *STING* 缺失的卵巢癌和黑色素瘤细胞中，T-VEC 能有效诱导免疫原性细胞死亡[4]。

病毒入侵机体后，除触发特异性体液免疫与细胞免疫应答外，还可激活细胞内固有抗病毒信号通路，构建多层次抗病毒免疫防御网络。其中，*MAVS* 与 *STING* 介导的胞质免疫通路在抗病毒免疫调控中发挥关键作用。模式识别受体 RIG-I 特异性识别病毒 RNA 后，可诱导下游接头蛋白 MAVS 聚集成活化复合物，进而启动级联信号转导，介导机体抗病毒免疫反应[5]；而胞质 DNA 受体 cGAS 可精准识别病毒 DNA 并激活 *STING* 通路，调控下游干扰素刺激基因(ISGs)的转录与翻译，最终发挥抗病毒感染效应[6]。现有研究证实，干扰素刺激基因的表达水平可直接调控溶瘤病毒的增殖进程与抗肿瘤效能，敲除关键干扰素诱导基因可显著提升溶瘤病毒的溶瘤活性，其中 *IRF1*[7]、*CH25H*[8]、*OAS*[9]、*MX*[10]、*IFIT1*[11]等 ISGs 均被证实参与溶瘤病毒复制的调控过程。

"CRISPR/Cas9 基因编辑技术凭借其精准高效的基因靶向修饰优势，已成为筛选溶瘤病毒宿主依赖因子与限制因子的核心手段，为优化溶瘤病毒抗肿瘤策略提供了重要技术支撑。目前，学界虽已针对 *HS*、EXT1、*STING* 等基因开展溶瘤病毒相关调控研究，但 *STING* 在溶瘤单纯疱疹病毒Ⅱ型(oHSV2)感染结肠癌 HCT116 细胞过程中的调控

[收稿日期] 2024－02－29

[第一作者] 陈明鑫(1999—)，男，湖北十堰人，湖北工业大学硕士研究生，研究方向为微生物与生化药学、溶瘤病毒。

[通信作者] 刘滨磊(1962—)，男，湖北武汉人，湖北工业大学教授，研究方向为生物制药、溶瘤病毒。

作用及其对病毒复制的具体影响尚未阐明，相关研究仍处于空白状态。鉴于此，为明确 *STING* 通路对 oHSV2 复制的调控机制，填补该领域研究空白，本研究采用 CRISPR/Cas9 技术构建 *STING* 基因敲除的 HCT116 细胞模型，系统探究 *STING* 缺失对 oHSV2 复制能力的影响，旨在为优化 oHSV2 溶瘤方案、提升结肠癌溶瘤病毒治疗效果提供实验依据与理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

人结肠癌细胞 HCT116，购于中国科学院细胞库；pX459V2.0＋K848A 质粒，购于淼灵生物公司；TOP10 甘油菌、DL2000、DL15000 DNA marker，PEI_{max}(1 mg/mL)转染试剂、质粒提取试剂盒和 pHG52-d34.5-CMV-gD 质粒，购于武汉滨会生物科技股份有限公司；BbsI(5000 U/mL)，购于 NEB 公司；T4 DNA 连接酶(400 U/μL)、基因组提取试剂盒、胶回收试剂盒，购于诺维赞公司；胎牛血清，购于 Biochannel 公司；DMEM 培养基，购于 Gibco 公司；嘌呤霉素(10 mg/mL)、青链霉素混合液、胰蛋白酶消化液，购于索莱宝公司；兔抗 *STING* 抗体，购于 Abcam 公司；鼠抗 GAPDH 抗体、抗兔二抗、抗鼠二抗，购于武汉三鹰公司；ECL 显影液，购于 Biosharp 公司；实验相关引物合成、测序及 2×T5 Fast qPCR Mix(Probe)，购于擎科生物公司。

生物安全柜(北京东联)；CO_2 细胞培养箱(Panasonic 公司)；PCR 仪(朗基科学仪器有限公司)；倒置荧光显微镜(Nikon 公司)；多功能酶标仪(Thermo Fisher Scientific 公司)；化学发光仪(伯兰特公司)；实时荧光定量 PCR 仪(Archimed 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将复苏成功的 HCT116 细胞，使用含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基进行培养。

1.2.2 *STING* 生物信息学分析 通过 NCBI 数据库获取人 *STING* 基因的氨基酸序列及相关信息，并利用 CD-search 工具对 *STING* 蛋白的主要结构域进行生物信息学分析与鉴定。

1.2.3 sgRNA 设计与寡核苷酸双链的合成 从 NCBI 网站获取人 *STING* 基因序列(GeneID：340061)，利用 sgRNA 设计网站(http://crispor.tefor.net)设计两对靶向 1.2.2 中鉴定的主要结构域的 sgRNA。选择脱靶率最低的两对 sgRNA，在其两端添加 BbsI 酶切位点后，交由武汉擎科生物公司合成。将合成的 sgRNA 进行退火处理(37℃，30 min；95℃，5 min；以 0.1℃/min 降温至 25℃)，获得双链寡核苷酸片段，稀释 200 倍后备用。

1.2.4 重组表达载体质粒 pX459-*STING* 的构建 将经 BbsI 酶切(酶切体系：1 μg pX459 质粒＋1 μg BbsI；酶切温度，37℃；酶切时间，2 h)并纯化的线性化 pX459 质粒与退火形成的 sgRNA，在 T4 DNA 连接酶作用下于 4℃过夜连接，然后将重组好的产物转化到感受态细胞中；使用含氨苄青霉素的平板筛选出阳性菌落，每种质粒从平板中挑取 6 个克隆，进行摇菌、保菌、提质粒，剩余菌液取 500 μL 送去测序。

1.2.5 *STING* 基因敲除的 HCT116 细胞的制备及单克隆筛选 转染前 12 h，将 HCT116 细胞以 2.5×10^5 个/mL 的密度接种于 6 孔板中，每孔 2 mL 细胞悬液，转染前 2 h 更换新鲜的培养基，放回培养箱继续培养。取两个无菌的 1.5 mL EP 管，分别标记为 A 管和 B 管。A 管加入 50 μL DMEM/F12 培养基、1 μg pX459-sgRNA1 和 1 μg pX459-sgRNA2；B 管加入 50 μL DMEM/F12 培养基和 7.5 μL PEI_{max} 转染试剂。对照组则按照相同条件加入 PEI_{max} 和 pX459 空载体质粒。将 B 管溶液加入 A 管中，轻轻吹打混匀，室温静置孵育 15 min。孵育完成后，将混合液加入细胞中进行转染，随后置于 37℃、5% CO_2 培养箱中继续培养。转染 48 h 后，换用含 2 μg/mL 嘌呤霉素的完全培养基进行筛选，持续 7 d，直至空白对照组细胞完全死亡。随后撤去嘌呤霉素，换用普通培养基继续培养，待细胞状态恢复。胰酶消化细胞后，以 5 个/mL 的密度将细胞悬液接种于 96 孔板中，每孔 100 μL。继续培养 2 周后，对出现单细胞克隆的孔进行标记。待密度长至 70%左右时，依次扩大培养至 24 孔板、12 孔板、6 孔板，继续培养。

1.2.6 单克隆细胞株的鉴定 等待细胞长满 24 孔板后，提取细胞基因组 DNA，用设计的基因敲除验证引物 seq-F 和 seq-R(表 1)扩增目的片段。将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳，筛选出疑似基因敲除的片段，送武汉擎科生物公司进行 Sanger 测序。对 PCR 验证有敲除效果的细胞株，进一步采用 Western Blot 检测目的蛋白的表达水平。取相同细胞密度的基因编辑细胞和野生型细胞铺于 6 孔板中，待细胞贴壁、生长稳定后，按照细胞蛋白裂解液说明书提取细胞总蛋白。取适量蛋白裂解上清液，与 5× Loading Buffer 混合，进行 SDS-PAGE 电泳。用 1×转膜液，于 15 V 恒压条件下转膜 30 min，再用 5%脱脂奶粉封闭 1 h。用 1×PBST 洗涤 3 次，每次 10 min；将 NC 膜与一抗孵育，4℃过夜(兔抗 *STING*，1∶1000；鼠抗 GAPDH，1∶2000)。次日

回收一抗，用 1×PBST 洗涤 3 次，每次 10 min；然后与二抗室温孵育 1 h(抗兔二抗，1∶5000；抗鼠二抗，1∶10000)。再用 1×PBST 洗涤 3 次，每次 10 min，最后采用 ECL 化学发光法显色。

表 1　扩增 pX459-sgRNA1/2 质粒包含 sgRNA1/2 的测序引物序列信息

引物名称	引物序列 5'-3'
pX459-sgRNAseq-F	GAGGGCCTATTTCCCATGATTCC
pX459-sgRNAseq-R	TGGGCGGGGGTCGTTG

1.2.7　细胞活力检测　将 $HCT116^{WT}$ 和 $HCT116^{STING-/-}$ 单克隆细胞株(E8，C12，A9，G3)以每孔 2×10^4 个细胞量接种于 96 孔板，每组设置 3 个复孔，分别在培养 24、48、72、96 h 后，每孔加入 10 μL CCK-8 试剂，在 37℃、5% CO_2 培养箱中孵育 1 h，然后用酶标仪测定 450 nm 波长处的吸光度(OD)值。

1.2.8　oHSV2 感染后细胞存活率检测(CCK-8 法)　采用 oHSV2 病毒分别感染 HCT116 野生型细胞与 *STING* 敲除细胞，通过 CCK-8 法检测细胞存活率，以明确 *STING* 基因缺失对 oHSV2 杀伤效果的影响。将 $HCT116^{WT}$/和 $HCT116^{STING-/-}$ 细胞分别计数，按 2×10^5 个/mL 密度接种于 96 孔板，每孔 100 μL。待细胞贴壁后，按 MOI=0.02、0.2、2 加入 oHSV2 病毒，于 37℃、5%CO_2 培养箱中继续培养。感染 24 h 后，在避光条件下每孔加入 10 μL CCK-8 工作液，继续避光孵育 1 h。用酶标仪检测 450 nm 波长处的吸光度，并按公式计算：

$$细胞存活率=\frac{实验组\ OD_{450}值-空白组\ OD_{450}值}{对照组\ OD_{450}值-空白组\ OD_{450}值}\times100\%$$

OD_{450} 为 450nm 波长下的吸光度值。

1.2.9　实时定量 PCR 测定 oHSV2 病毒的拷贝数　将 pHG52d34.5CMVgD 质粒进行 5 个梯度稀释，通过 qPCR 构建用于检测 oHSV2 拷贝数的标准曲线。将 $HCT116^{WT}$ 与 $HCT116^{STING-/-}$ 细胞以 2×10^5 个/mL 的密度接种于 6 孔板，待细胞完全贴壁后，分别以 MOI=0.02、0.2、2 的 oHSV2 病毒感染细胞。感染 24 h 后提取细胞基因组 DNA，将 DNA 浓度定量至 100 ng/μL，采用表 4 引物进行 qPCR 检测。

1.2.10　oHSV2 病毒滴度测定($CCID_{50}$ 法)　将 $HCT116^{WT}$ 与 $HCT116^{STING-/-}$ 细胞以 2×10^5 个/mL 的密度接种于 6 孔板，待细胞贴壁后，以 MOI=0.02、0.2、2 的 oHSV2 病毒感染细胞。感染 24 h 后收集病毒上清，置于低温备用。将 Vero 细胞以 2×10^5 个/mL 的密度、每孔 100 μL 接种于 96 孔板，待细胞贴壁后，将各组病毒上清进行 10 倍梯度稀释(共 8 个稀释梯度)，每个稀释梯度设置 5 个复孔，接种至 96 孔板中。培养 72 h 后观察细胞病变效应(cytopathic effect，CPE)，并计算病毒的半数细胞感染剂量($CCID_{50}$)

1.2.11　统计学分析　采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，每组实验独立重复 3 次($n=3$)。两组间比较采用两独立样本 t 检验，以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。显著性标注：$P<0.05$，$^*P<0.01$，$^{**}P<0.001$，$^{***}P<0.0001$。

2　结果

2.1　*STING* 敲除区域的确定以及 sgRNA 设计

通过 NCBI 数据库鉴定到人源 *STING* 基因存在 3 个转录本，且有 2 个公共外显子区域(图 1a)；CD-search 分析显示，*STING* 主要结构域位于 44～337 位氨基酸，其中 153～340 位氨基酸存在 CBD 位点(参与病原 DNA 识别及下游信号通路激活，图 1b)，因此选择基因组的第 5、第 6 外显子设计能够破坏所有转录本和大多数结构域的 sgRNA1 和 sgRNA2(表 2)。

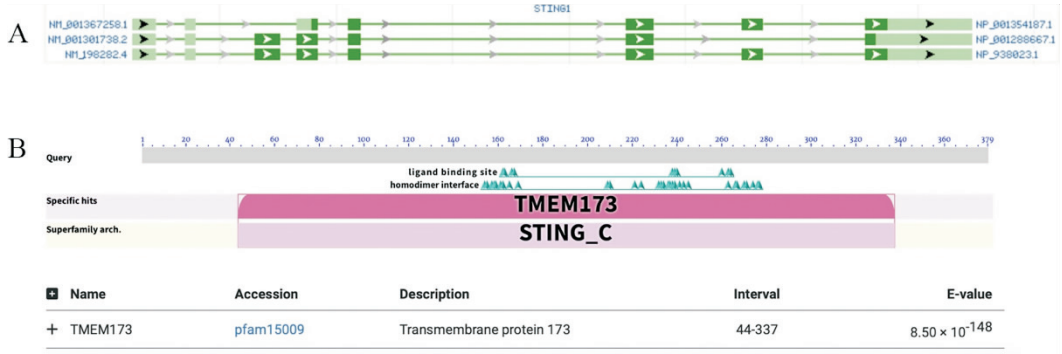


图 1　人 *STING* 基因及蛋白生物信息学分析

A：NCBI 数据库中人 *STING* 基因转录本信息；B：*STING* 蛋白保守结构域 CD-search 分析结果

表 2 靶向 *STING* 基因第 5/6 外显子 sgRNA 序列信息

名称	引物序列 5'-3'
STING-sg-1	F：CACCGCTGATTGTAAGTTCGAATC
	R：AAACGATTCGAACTTACAATCAGC
STING-sg-2	F：CACCGGAATTTCAACGTGGCCCAT
	R：AAACATGGGCCACGTTGAAATTCC

表 3 扩增 *STING* 基因第 5-6 号外显子验证引物序列信息

引物名称	引物序列 5'-3'
STING-ko-seq-F	TCTCTGGGTGTCCTTGATGGAGG
STING-ko-seq-R	TTCATCAGTGCTTGGCTAGGGC

表 4 实时荧光定量 PCR 引物

引物名称	引物序列 5'-3'
oHSV2-gD	F：CCGCTTTATCCCCGAAAAC
	R：TGCCACCCGGCGATT
oHSV2-gD probe	FAM-AGCGCACCGTCGCCCTATACAGC

2.2 重组表达载体 pX459-*STING*-sgRNA 的鉴定

对构建的重组质粒 pX459-*STING*-sgRNA1 和 pX459-*STING*-sgRNA2 进行测序，结果表明质粒构建成功(图 2)。

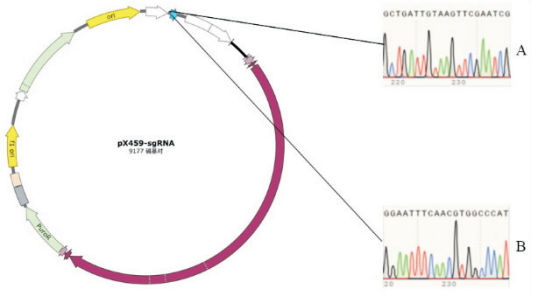


图 2 pX459-sgRNA1/2 重组质粒测序

A：sgRNA1 片段测序；B：sgRNA2 片段测序

2.3 PCR 及 Sanger 测序验证 *STING* 基因敲除效果

经理论预测，未发生基因编辑的细胞基因组 DNA 可扩增出 2759 bp 的目的片段，而成功编辑的细胞株应扩增出约 375 bp 的片段。随机挑取单克隆细胞提取基因组 DNA，1% 琼脂糖凝胶电泳结果显示(图 3a)：野生型 HCT116 细胞及 C3、E9、D5、G5 单克隆细胞株均扩增出 2759 bp 的特异性条带；E8、C12 单克隆细胞株扩增出约 473 bp 的条带，与预期片段大小相符；A4、A9 可见两条特异性条带，提示为杂合敲除；G3 条带大小略高于预期。上述结果表明，A4、A9、E8、G3、C12 细胞株均出现目的基因片段缺失。选取 E8、G3、C12 单克隆细胞株进行 Sanger 测序验证，结果显示 *STING* 敲除的 HCT116 细胞株在 29090～31425 bp 区域发生特异性片段缺失(图 3b)，证实两对 sgRNA 均成功实现 *STING* 基因敲除。

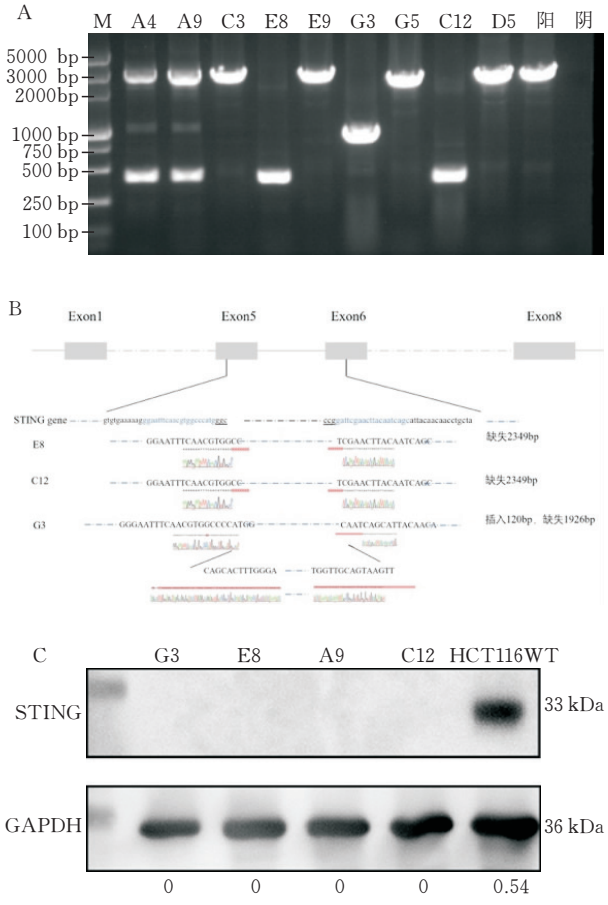


图 3 HCT116 $^{STING-/-}$ 敲除单克隆细胞株的鉴定

A. HCT116 $^{STING-/-}$ 单克隆细胞株 PCR 鉴定结果。M：DL5000 DNAmarker；A4、A9、C3、E8、E9、G3、G5、C12：单克隆细胞株 PCR 产物；WT：野生型 HCT116 细胞 PCR 产物；阴性对照：无模板 PCR 产物。B. E8、C12、G3 单克隆细胞株 *STING* 基因测序示意图(29090～31425 bp 片段缺失)。C. G3、E8、A9、C12 及野生型 HCT116 细胞 *STING* 蛋白表达的 Western Blot 检测

2.4 Western Blot 验证单克隆细胞蛋白表达水平

鉴于 G3、E8、A9、C12 单克隆细胞株生长状态、

形态良好，进一步对上述单克隆及野生型 HCT116 细胞进行 *STING* 蛋白表达水平检测。结果显示（图 3c），与野生型 HCT116 细胞相比，G3、E8、A9、C12 细胞株的 *STING* 蛋白表达水平均显著降低，差异具有统计学意义。

2.5　*STING* 基因敲除的 HCT116 细胞生长活性

CCK8 细胞活力检测结果显示，野生型 HCT116 细胞 OD_{450} 值为 1.24±0.86，*STING* 敲除单克隆细胞 E8、A9、C12、G3 分别为 1.27±0.91、1.25±0.91、1.26±0.89、1.17±0.89。4 株 *STING* 敲除细胞系的增殖趋势与细胞活力均与野生型细胞无显著性差异（$P > 0.05$，$n=3$）（图 4），提示敲除 *STING* 对 HCT116 细胞的正常增殖无明显影响。综合基因敲除效率与细胞稳定性，本研究选取 E8 单克隆细胞株进行后续实验。

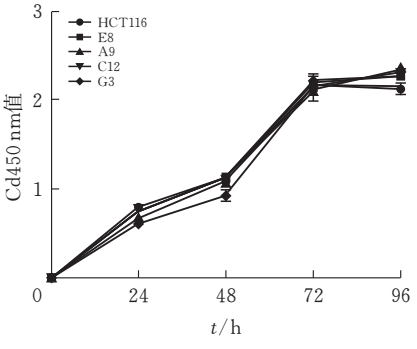


图 4　*STING* 敲除对 HCT116 细胞活力的影响

2.6　oHSV2 对 *STING* 缺失的 HCT116 细胞杀伤效果

以 MOI＝0.02、0.2、2 的 oHSV2 分别感染 $HCT116^{WT}$ 与 $HCT116^{STING-/-}$ 细胞，24 h 后采用 CCK-8 法检测细胞存活率。

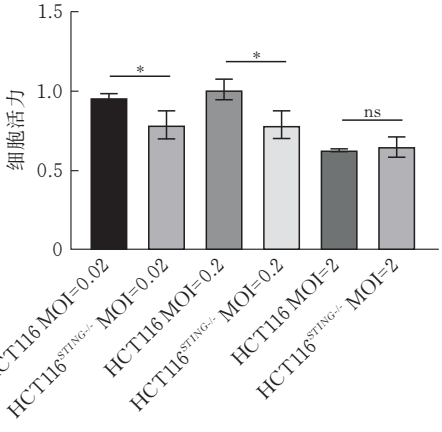
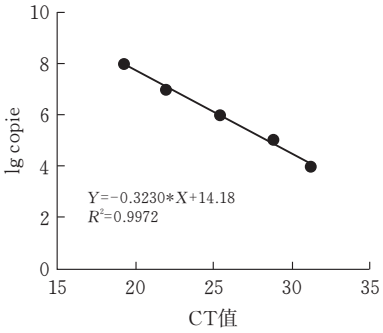


图 5　$HCT116^{WT}$ 和 $HCT116^{STING-/-}$ 细胞以不同 MOI 感染 24 h 后的细胞活率

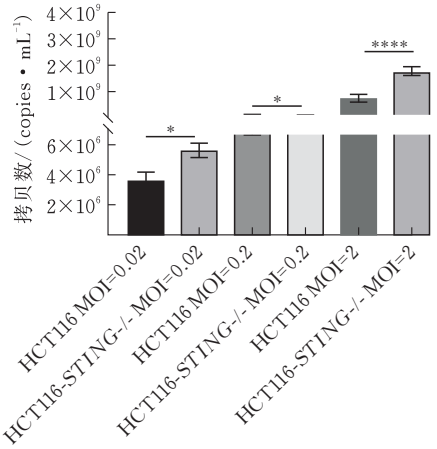
结果显示：MOI＝0.02 时，$HCT116^{WT}$ 和 $HCT116^{STING-/-}$ 细胞的存活率分别为 94.53%±2.61% 和 78.84%±8.89%（$P<0.05$，$n=3$）；MOI＝0.2 时，分别为 98.24%±1.25% 和 78.95%±8.87%（$P<0.05$，$n=3$）；MOI＝2 时，分别为 63.19%±0.51% 和 64.67%±6.37%（$P>0.05$，$n=3$）。以上结果表明，在低感染复数条件下，*STING* 敲除可显著增强 oHSV2 对 HCT116 细胞的杀伤效果。

2.7　实时定量 PCR 测定 oHSV2 病毒的拷贝数

以 MOI＝0.02、0.2、2 的 oHSV2 分别感染 $HCT116^{WT}$ 与 $HCT116^{STING-/-}$ 细胞，24 h 后提取基因组 DNA，采用 qPCR 检测病毒拷贝数。结果显示：MOI＝0.02 时，$HCT116^{WT}$ 和 $HCT116^{STING-/-}$ 细胞的病毒拷贝数分别为 $3.5\times10^6\pm6.27\times10^5$ 和 $5.6\times10^6\pm4.68\times10^5$（$P<0.05$，$n=3$）；MOI＝0.2 时，分别为 $5.0\times10^7\pm2.47\times10^6$ 和 $(7.97\pm1.50)\times10^7$（$P<0.05$，$n=3$）；MOI＝2 时，分别为 $(7.59\pm1.47)\times10^8$ 和 $1.77\times10^9\pm1.69\times10^8$（$P<0.0001$，$n=3$）。以上结果表明，*STING* 敲除后，oHSV2 在 HCT116 细胞中的基因拷贝数显著增加。



(a)oHSV2 拷贝数检测标准曲线



(b)以不同 MOI 感染 $HCT116^{WT}$ 和 $HCT116^{STING-/-}$ 细胞 24 h 后病毒拷贝数

图 6　24 h 时 oHSV2 病毒的拷贝数

2.8　oHSV2 病毒滴度测定

以 MOI＝0.02、0.2、2 的 oHSV2 分别感染 $HCT116^{WT}$ 与 $HCT116^{STING-/-}$ 细胞，24 h 后收集病毒上清，进行病毒滴度测定。结果显示：MOI＝0.02 时，$HCT116^{STING-/-}$ 和 $HCT116^{WT}$ 细胞的病毒滴度分别为 216.7±29.83 和 117.3±14.95 $CCID_{50}$/mL

($P<0.01$，$n=3$)；MOI＝0.2 时，分别为 3435±472.7和 1173±149.5 $CCID_{50}$/mL($P<0.01$，$n=3$)；MOI＝2 时，分别为(8.62±1.18)×10^6 $CCID_{50}$/mL 和(8.08±1.84)×10^4 $CCID_{50}$/mL($P<0.001$，$n=3$)。以上结果表明，*STING* 敲除可显著提高 oHSV2 在 HCT116 细胞中的病毒滴度。

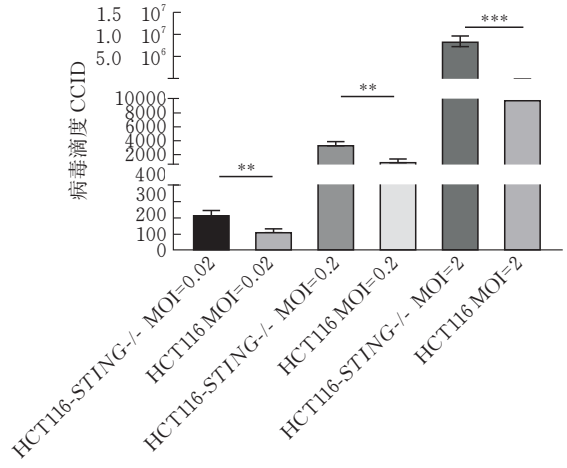


图 7 不同 MOI 感染 $HCT116^{WT}$ 和 $HCT116^{STING-/-}$ 细胞上清病毒滴度

3 讨论与结论

溶瘤病毒是一类具备靶向杀伤肿瘤潜能的生物制剂，其生命周期(包括基因组复制、蛋白合成、颗粒组装等)高度依赖宿主细胞的物质合成与胞内信号环境。宿主细胞可通过模式识别受体感知病毒入侵，启动干扰素应答通路，诱导干扰素刺激基因(ISGs)大量表达，构建抗病毒免疫屏障，从而抑制病毒扩散。这是病毒与宿主相互博弈的核心环节。相较于正常细胞，肿瘤细胞存在基因组不稳定、信号通路紊乱、抑癌基因缺失或原癌基因过表达等异质性特征，导致其对溶瘤病毒敏感性差异显著，单药治疗效果不一。近年来，溶瘤病毒与免疫检查点抑制剂、CAR-T 细胞疗法、宿主因子靶向抑制剂等联用策略，有效突破了单药治疗的瓶颈，显著提升了抗肿瘤疗效。因此，精准筛选并解析溶瘤病毒复制的关键宿主因子及作用机制，是实现其精准个体化治疗的核心前提，对推动临床转化具有重要理论与实践价值。

cGAS-*STING* 通路是宿主感知胞质 DNA、启动天然抗病毒免疫的关键信号通路，在溶瘤病毒感染中发挥重要调控作用。本研究以溶瘤病毒 oHSV2 和结肠癌细胞 HCT116 为研究对象，结果显示：oHSV2 感染野生型结肠癌细胞后，可快速激活 cGAS-*STING* 通路，启动下游 ISGs 的转录与翻译，发挥抗病毒效应并限制病毒复制。在临床肿瘤进展中，部分肿瘤细胞存在 cGAS-*STING* 通路关键蛋白缺失或功能失活，导致天然抗病毒免疫缺陷，这也是肿瘤细胞对溶瘤病毒敏感性差异的重要原因。为验证 *STING* 的调控作用，本研究通过 CRISPR/Cas9 技术构建 *STING* 基因敲除的 HCT116 稳转细胞株。体外感染实验表明：在低感染复数(MOI)条件下，*STING* 敲除细胞的病毒杀伤效果显著优于野生型细胞；高 MOI 条件下，两组细胞的杀伤效果无统计学差异。但在各 MOI 梯度感染中，*STING* 敲除细胞内 oHSV2 的复制水平均显著高于野生型细胞，直接证实 *STING* 缺失可促进 oHSV2 在 HCT116 细胞中的增殖。

结合宿主抗病毒通路机制与本研究结果，可将 *STING* 调控 oHSV2 复制的分子机制初步归纳如下：*STING* 作为 cGAS-*STING* 通路的核心接头蛋白，其正常表达是通路激活及下游 ISGs 转录翻译的关键；*STING* 基因敲除可直接阻断该通路的信号转导，抑制 ISGs 的活化，从而解除天然免疫对 oHSV2 复制的抑制作用，为病毒增殖创造有利的胞内环境。高 MOI 下两组杀伤效应无差异，推测原因：低 MOI 时病毒初始载量低，cGAS-*STING* 通路介导的抗病毒免疫占主导，*STING* 缺失的复制优势可直接转化为杀伤差异；高 MOI 时病毒初始载量高，快速大量复制可反向抑制通路激活，介导抗病毒宿主因子降解与转录抑制，叠加非 ISGs 类宿主因子的调控作用，掩盖了 *STING* 缺失的杀伤差异。这也提示 oHSV2 与宿主细胞的相互作用机制十分复杂，涉及多条信号通路和多种因子的协同调控。

组学技术与全基因组 CRISPR/Cas9 筛选是解析病毒-宿主互作的核心手段，已有多项研究借助该策略挖掘关键宿主因子：Han[12] 等证实唾液酸转运体 SLC35A1 是甲型流感病毒入侵关键因子；相关筛选确定 RACK1 为黄病毒复制核心宿主因子[13]；PAPSS1 参与调控 HSV-1 复制[14]；转录组测序揭示 HIF-1α[15] 参与 SARS-CoV-2 感染及促炎反应；蛋白质组学发现 ApoE 调控 HCMV 潜伏感染与再激活[16]。上述研究印证了该筛选策略的可靠性，也为本研究后续挖掘 oHSV2 相关宿主因子、完善互作调控网络提供了方法学参考。

本研究仍存在局限性：一是仅开展体外细胞实验，缺乏动物体内验证，无法模拟体内肿瘤微环境与免疫系统的影响，结果与临床实际存在差距；二是仅初步揭示 *STING* 对 oHSV2 的调控作用，未深入探究下游具体 ISGs、效应分子靶点，也未拓展至其他细胞株，结论普适性有待验证；三是未解析 oHSV2 对 cGAS-*STING* 通路的反向调控机制，病毒-宿主

动态互作网络仍需完善。

本研究通过 CRISPR/Cas9 技术成功构建 *STING* 基因敲除的 HCT116 细胞模型，明确了 *STING* 是抑制 oHSV2 在结肠癌细胞中复制的关键宿主限制因子。其核心机制在于，*STING* 通过介导 cGAS-*STING* 通路的激活、调控 ISGs 的表达，启动天然抗病毒免疫反应，从而限制 oHSV2 的增殖。同时，本研究证实 MOI 可影响 *STING* 的调控效果：仅在低 MOI 条件下，*STING* 缺失能显著提升病毒的杀伤效果。本研究首次证实 *STING* 在 oHSV2 感染结肠癌细胞中的负向调控作用，填补了单纯疱疹病毒类溶瘤病毒与宿主天然免疫互作的理论空白，为优化 oHSV2 溶瘤效果、筛选联合用药靶点提供实验依据。未来可开展体内动物实验验证，并结合全基因组筛选与多组学技术深挖宿主因子，解析互作机制，助推 oHSV2 临床精准转化。

[参 考 文 献]

[1] JONES E, DUAN Z, NGUYEN T T, et al. Adjuvant 5-Fluorouracil/leucovorin, capecitabine, and oxaliplatin-related regimens for stage Ⅱ/Ⅲ colon cancer patients 66years or older [J]. Cancer medicine, 2023, 12 (03): 2389-406.

[2] SANDER J D, JOUNG J K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes [J]. Nature biotechnology, 2014, 32(04): 347-55.

[3] TRYBALA E, LILJEQVIST J A, SVENNERHOLM B, et al. Herpes simplex virus types 1 and 2 differ in their interaction with heparan sulfate [J]. Journal of virology, 2000, 74(19): 9106-14.

[4] BOMMAREDDY P K, ZLOZA A, RABKIN S D, et al. Oncolytic virus immunotherapy induces immunogenic cell death and overcomes *STING* deficiency in melanoma [J]. Oncoimmunology, 2019, 8 (07): 1591875.

[5] CHAN Y K, GACK M U. RIG-I-like receptor regulation in virus infection and immunity [J]. Current opinion in virology, 2015, 12: 7-14.

[6] MA Z, DAMANIA B. The cGAS-*STING* defense pathway and its counteraction by viruses [J]. Cell host & microbe, 2016, 19(02): 150-158.

[7] LIU S Y, HUANG M, FUNG T S, et al. Characterization of the induction kinetics and antiviral functions of IRF1, ISG15 and ISG20 in cells infected with gammacoronavirus avian infectious bronchitis virus [J]. Virology, 2023, 582: 114-27.

[8] SERQUIñA A K P, TAGAWA T, OH D, et al. 25-Hydroxycholesterol inhibits kaposi's sarcoma herpesvirus and epstein-barr virus infections and activates inflammatory cytokine responses [J]. MBio, 2021, 12 (06): e0290721.

[9] SCHWARTZ S L, CONN G L. RNA regulation of the antiviral protein 2′-5′-oligoadenylate synthetase [J]. Wiley interdisciplinary reviews RNA, 2019, 10(04): e1534.

[10] HALLER O, KOCHS G. Mx genes: host determinants controlling influenza virus infection and trans-species transmission [J]. Human genetics, 2020, 139 (6-7): 695-705.

[11] DIAMOND M S. IFIT1: A dual sensor and effector molecule that detects non-2′-O methylated viral RNA and inhibits its translation [J]. Cytokine & growth factor reviews, 2014, 25(05): 543-550.

[12] HAN J, PEREZ J T, CHEN C, et al. Genome-wide CRISPR/Cas9 screen identifies host factors essential for influenza virus replication [J]. Cell reports, 2018, 23(02): 596-607.

[13] SHUE B, CHIRAMEL A I, CERIKAN B, et al. Genome-Wide CRISPR Screen Identifies RACK1 as a Critical Host Factor for Flavivirus Replication [J]. Journal of virology, 2021, 95(24): e0059621.

[14] SUZUKI T, SATO Y, OKUNO Y, et al. Genome-wide CRISPR screen for HSV-1 host factors reveals PAPSS1 contributes to heparan sulfate synthesis [J]. Communications biology, 2022, 5(01): 694.

[15] TIAN M, LIU W, LI X, et al. HIF-1α promotes SARS-CoV-2 infection and aggravates inflammatory responses to COVID-19 [J]. Signal transduction and targeted therapy, 2021, 6(01): 308.

[16] CHENG S, ZHAO F, WEN L, et al. iTRAQ-Based proteomics analysis of human cytomegalovirus latency and reactivation in T98G cells [J]. Journal of virology, 2022, 96(02): e0147621.

（下转第 138 页）