

· 研究论文 ·

## 聚氨基酸基传递体系用于循环恶性细胞的基因编辑及疗效评估

漆李矜<sup>1</sup> 韩笛<sup>1</sup> 任肖荷<sup>2</sup> 何晓燕<sup>2</sup> 郭涛<sup>3</sup> 张先正<sup>1</sup> 程巳雪<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>生物医用高分子材料教育部重点实验室 武汉大学化学与分子科学学院 武汉 430072)

(<sup>2</sup>安徽医科大学生命科学院 合肥 230011)

(<sup>3</sup>安徽医科大学第一附属医院 合肥 230011)

**摘要** 肿瘤异质化和每位患者的特异性是肿瘤研究和治疗中的重要挑战,而个性化精准诊疗是解决这一挑战的关键途径之一.本研究中,设计制备了基于聚氨基酸的肿瘤靶向传递体系,利用 $\epsilon$ -聚-L-赖氨酸负载敲除促进肿瘤发展的黏蛋白1(MUC1)的CRISPR-Cas9质粒,外层修饰链接了AS1411适配子的透明质酸,通过靶向肿瘤细胞表面过表达的核仁素(nucleolin)和CD44实现对肿瘤细胞的特异性高效传递和基因编辑.进一步,利用这一靶向传递载体负载检测MUC1、肺转移标志物组织蛋白酶C(CTSC)、骨转移标志物锯齿状典型Notch配体1(JAG1)的mRNA的3种分子信标,对基因编辑效果进行检测.针对肿瘤细胞系BT549及乳腺癌患者外周血中的循环恶性细胞开展了基因编辑及疗效评估研究,结果表明,基因编辑传递体系可以有效靶向恶性细胞,敲除MUC1基因,抑制MUC1的表达,显著下调肺转移和骨转移标志物.本研究利用少量全血进行个性化体外研究,可便捷高效地评估特定治疗措施的疗效,为肿瘤个性化精准治疗提供依据和参考.

**关键词** 聚氨基酸, 肿瘤靶向, 传递载体, 基因治疗, mRNA检测

**引用:** 漆李矜, 韩笛, 任肖荷, 何晓燕, 郭涛, 张先正, 程巳雪. 聚氨基酸基传递体系用于循环恶性细胞的基因编辑及疗效评估. 高分子学报, 2025, 56(2), 253–265

**Citation:** Qi, L. J.; Han, D.; Ren, X. H.; He, X. Y.; Guo, T.; Zhang, X. Z.; Cheng, S. X. Poly(amino acid)-based delivery systems for genome editing and therapeutic efficacy evaluation in circulating malignant cells. *Acta Polymerica Sinica*, 2025, 56(2), 253–265

癌症的发生和发展与基因的正常变化密切相关<sup>[1]</sup>,基因突变和肿瘤微环境等因素的作用,使肿瘤细胞表现出异质性,为肿瘤治疗带来挑战.由于肿瘤异质性的存在,同一种肿瘤类型在不同患者中可能表现出不同的基因变异、表型特征以及对治疗的敏感性<sup>[2]</sup>.肿瘤的个性化治疗能够充分考虑每位患者肿瘤的特异性,根据患者的具体情况精确选择并调整治疗方案,探索新的治疗策略,显著改善疗效和预后<sup>[3]</sup>.

肿瘤的异质化及患者的个性化差异也为肿瘤

的基础研究带来系列难点,基于动物肿瘤细胞的动物实验难以反映人源肿瘤的情况,而反映肿瘤异质性的患者源异种移植(PDX)动物模型又受到种间差异的限制<sup>[4]</sup>.

针对这一问题,本研究设计制备了基于聚氨基酸的肿瘤靶向传递载体,分别负载基因编辑质粒和分子信标,将其传递到患者血液样本中的循环恶性细胞(circulating malignant cells, CMCs)内,实现了单细胞层面的体外个性化精确疗效研究.

在肿瘤治疗方面,基因治疗是一种非常具有

资源生态高分子专题; 2024-07-14收稿, 2024-09-06录用, 2024-11-22网络出版; 国家自然科学基金基础科学中心项目(基金号 51988102)资助.

\* 通信联系人, E-mail: chengsixue@whu.edu.cn

doi: 10.11777/j.issn1000-3304.2024.24196; CSTR: 32057.14.GFZXB.2024.7292

潜力的治疗方法,特别适用于个体化精准治疗<sup>[5]</sup>.基因治疗中,核酸治疗剂需要用载体传递到靶细胞内,才能发挥作用<sup>[4,6]</sup>.基因递送载体主要包括病毒和非病毒载体.病毒载体虽然传递效率高<sup>[7]</sup>,但可能引发较强的免疫反应<sup>[7,8]</sup>,有些还会影响细胞的基因组<sup>[9]</sup>,且缺乏肿瘤靶向性,这些都极大限制了其实际应用.非病毒载体虽然传递效率不如病毒载体,但安全性高.基于蛋白质、聚氨基酸及其衍生物的基因递送系统具有良好的生物相容性和生物降解性,可被代谢成无害的降解产物,是一种理想的传递载体材料<sup>[10,11]</sup>.其中, $\epsilon$ -聚-L-赖氨酸( $\epsilon$ -PL)是一种结构确定、可由微生物发酵或聚合反应制备的阳离子均聚物,具有良好的生物安全性、生物可降解性和抗菌能力<sup>[12-14]</sup>,可作为基因及药物载体<sup>[15-17]</sup>.

本研究中采用 $\epsilon$ -PL结合CRISPR-Cas9质粒,表面修饰链接了AS1411的透明质酸,其中,AS1411可与肿瘤细胞表面过表达的核仁素特异性作用<sup>[18]</sup>,透明质酸链可与肿瘤细胞表面高表达的CD44作用<sup>[19]</sup>,因此传递体系可将质粒靶向传递到肿瘤患者全血样本中的循环恶性细胞内进行基因编辑,敲除与肿瘤发展密切相关的黏蛋白1(MUC1).利用这一载体还制备了负载3种分子信标的传递体系,用于检测恶性细胞中MUC1 mRNA、肺转移标志物CTSC mRNA、骨转移标志物JAG1 mRNA.检测发现编辑后的循环恶性细胞中3种mRNA均显著降低,表明传递体系能有效介导基因编辑,通过下调MUC1逆转肿瘤恶性化、抑制肿瘤转移.

## 1 实验部分

### 1.1 材料与试剂

$\epsilon$ -聚-L-赖氨酸( $M_w=1.01\times 10^4$  Da)购于上海源叶生物科技有限公司,透明质酸钠盐( $M_w=5.0\times 10^4$  Da)购于山东福瑞达生物技术有限公司,*N*-(3-二甲基氨基丙基)-*N'*-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)和1-羟基苯并三唑(HOBT)购于Sigma Aldrich,氨基化的AS1411(5'-NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG-3')购于上海生工生物技术有限公司,YOYO-1购于Invitrogen,DAPI购于北京索莱宝科技有限公司.

敲除MUC1的CRISPR-Cas9质粒(简称“P”)购于吉满生物科技,其sgRNA序列为5'-

TTCACCACCACCATGACACC-3'.

检测MUC1 mRNA的分子信标(MB1)序列为5'-Cy3-CACGTGGTAGGTGGGGTACTCGCTCATAGGATACGTG-Dabcyl-3',检测CTSC mRNA的分子信标(MB2)序列为5'-Alexa Fluor 488-CAGCGGGCGGCGAGCAGCAAGGCGCTG-Dabcyl-3',检测JAG1 mRNA的分子信标(MB3)的序列为5'-Cy5-CAGCGCGTGGACCCTGAGCCGAACGCTG-Dabcyl-3',均购于上海闪晶分子生物技术有限公司.

BT549和HEK293T细胞购于中国武汉普诺赛生命科技有限公司.BT549细胞在含10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素的RPMI 1640培养基中培养,HEK293T细胞在含10%胎牛血清、0.01 mg/mL胰岛素和1%青霉素-链霉素的DMEM培养基中培养.所有细胞在含5% CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中恒温37 °C培养.

### 1.2 链接AS1411的透明质酸的合成和表征

将透明质酸钠盐用阳离子交换树脂处理72 h后得到透明质酸(HA).将HA(303.25  $\mu$ g)用EDC·HCl(8.98  $\mu$ g)和NHS(6.33  $\mu$ g)在1 mL PBS(pH=6.0)中活化1 h,然后加入330  $\mu$ g氨基化的AS1411,室温下反应24 h后,将所得产品在去离子水中透析(MWCO=15000)72 h,去除未反应的适配子和杂质后,留取5  $\mu$ L以计算接枝率,其余冷冻干燥得到链接AS1411的透明质酸(简称“AHA”).

接枝率检测:用Quant-iT OliGreen ssDNA检测试剂盒测定反应链接的AS1411的量,与AS1411的投料量进行比较,得出60%的AS1411链接到透明质酸链上.

### 1.3 用于基因编辑的质粒传递体系的制备

将10  $\mu$ g的 $\epsilon$ -PL溶于40  $\mu$ L超纯水中,将2  $\mu$ g CRISPR-Cas9质粒(P)分散在30  $\mu$ L超纯水中,将以上二者混合、震荡15 min,形成P@ $\epsilon$ -PL纳米复合物(简称为“P@P”).

将5  $\mu$ g HA溶于30  $\mu$ L超纯水中,并逐滴加入含P@ $\epsilon$ -PL纳米复合物的70  $\mu$ L超纯水中,混合、震荡15 min得到P@ $\epsilon$ -PL/HA纳米粒子(简称为“P@PH”).

将5  $\mu$ g AHA溶于30  $\mu$ L超纯水中,并逐滴加入含P@ $\epsilon$ -PL纳米复合物的70  $\mu$ L超纯水中,混合、震荡15 min得到P@ $\epsilon$ -PL/AHA纳米粒子(简

称为“P@PAH”).

作为对照, 在不加质粒的条件制备了空白载体纳米粒子(简称为“PAH”), 其粒径为 206 nm (PDI=0.24).

#### 1.4 负载分子信标的纳米探针的制备

首先将分子信标溶解在超纯水中, 将 MB1 (7  $\mu$ L, 0.07 nmol)、MB2 (7  $\mu$ L, 0.07 nmol)、MB3 (7  $\mu$ L, 0.07 nmol) 混合均匀, 加入 49  $\mu$ L 含  $\epsilon$ -PL (10  $\mu$ g)的超纯水中, 混合、震荡 15 min 后, 形成 MB1/MB2/MB3@ $\epsilon$ -PL 纳米复合物, 随后, 将 5  $\mu$ g AHA 溶于 30  $\mu$ L 超纯水中, 并逐滴加入含 MB1/MB2/MB3@ $\epsilon$ -PL 纳米复合物的 70  $\mu$ L 超纯水中, 混合、震荡 15 min, 得到同时负载 3 种分子信标的纳米探针(MB1/MB2/MB3@ $\epsilon$ -PL/AHA, 简称为“MBs@PAH”).

#### 1.5 质粒传递体系和纳米探针的表征

质粒传递体系和纳米探针的水合粒径和 Zeta 电位由粒径电位仪(Nano ZS, Malvern Instruments)测量. 测量 3 次, 结果以平均值 $\pm$ 标准差(SD)表示.

形貌表征: 样品在铜网格上用磷钨酸染色并风干, 然后用透射电镜(JEM-2100 Plus)观察.

#### 1.6 细胞表面蛋白的检测

将 BT549 细胞及 HEK293T 细胞分别种于 6 孔板中(每孔  $2 \times 10^5$  个细胞), 24 h 后将细胞用胰蛋白酶消化, PBS 洗涤离心后重悬于 100  $\mu$ L 细胞染色缓冲液中, 分别与 APC anti-human CD227 (MUC-1) Antibody (200  $\mu$ g/mL, 5  $\mu$ L) (Biolegend), PE anti-mouse/human CD44 Antibody (200  $\mu$ g/mL, 5  $\mu$ L) (Biolegend), Nucleolin antibody (FITC) (1000  $\mu$ g/mL, 2  $\mu$ L) (Biorbyt) 在 4  $^{\circ}$ C 下避光孵育 30 min 后, 用 PBS 洗涤重悬 3 次后用流式细胞仪(Dakewe EXFLOW-206)进行分析.

#### 1.7 细胞摄取研究

将  $1 \times 10^5$  个细胞(悬浮在 1 mL 培养基中)接种在 35 mm 培养皿(MatTek)中, 在 37  $^{\circ}$ C 下培养 24 h 后, 去除培养基, 加入 1 mL 含有负载 YOYO-1 标记质粒的纳米粒子(含有 2  $\mu$ g 质粒)的新鲜培养基. 细胞与纳米粒子在 37  $^{\circ}$ C 共孵育 4 h 后, 用 PBS 洗涤 3 次, 随后加入 4% 的多聚甲醛处理 15 min 以固定细胞, 用 DAPI 染料对细胞核染色 10 min, BT549 细胞用激光共聚焦扫描显微镜(Zeiss LSM980)进行观察, HEK293T 细胞用激光共聚焦扫描显微镜(Leica SP8)进行观察.

将细胞接种在 6 孔板中(每孔  $2 \times 10^5$  个细胞在 2 mL 培养基中), 在 37  $^{\circ}$ C 下培养 24 h 后, 将培养基换成含有负载 YOYO-1 标记质粒的纳米粒子的新鲜培养基(质粒浓度 2  $\mu$ g/mL). 细胞与纳米粒子在 37  $^{\circ}$ C 共孵育 4 h 后, 细胞用 PBS 洗涤 3 次, 加入胰蛋白酶消化, 离心收集后用 PBS 洗涤重悬, 经多聚甲醛固定后用流式细胞仪(Dakewe EXFLOW-206)进行分析.

#### 1.8 肿瘤细胞系的基因编辑

将 BT549 肿瘤细胞接种在 6 孔板中, 密度为每孔  $2 \times 10^5$  个细胞(2 mL 培养基中), 在 37  $^{\circ}$ C 下培养 24 h 后, 将培养基替换为含有 P@PAH (质粒浓度 2  $\mu$ g/mL)或空白载体 PAH 的新鲜培养基, 共孵育 48 h, 分别得到编辑及未编辑的肿瘤细胞.

DNA 测序检测基因突变: 分别从编辑及未编辑的肿瘤细胞中提取基因组 DNA 并进行聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增, 对 PCR 产物进行 TA 克隆后用 3730XL DNA 分析仪(Applied Biosystems)进行测序.

T7 核酸内切酶 I (T7E1)酶切检测基因敲除效率: 用 QuickExtract DNA 提取液(Epicentre)分别从编辑及未编辑的肿瘤细胞中提取基因组 DNA, 通过 PCR 扩增 MUC1 基因组区域, 然后对扩增的 DNA 进行变性、退火、重新杂交, 用 T7E1 (NEB)处理、切割错配的双链 DNA, 之后, 将产物在 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳.

定量聚合酶链反应(qPCR)分析 MUC1 mRNA 的水平: 分别收集未经处理的、编辑的及未编辑的肿瘤细胞, 使用高纯 RNA 分离试剂盒(Invitrogen)提取总 RNA. 用 EntiLink™ 1st Strand cDNA Synthesis Super Mix (ELK Biotech)合成第一条 cDNA 链, 然后在 QuantStudio 6 Flex System PCR 仪(Life Technologies)上使用 EnTurbo™ SYBR Green PCR SuperMix (ELK Biotech)进行定量 qPCR 检测, 通过  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法分析 mRNA 的相对水平.

流式细胞仪检测抗体标记的 MUC1 蛋白: 分别将编辑及未编辑的肿瘤细胞用胰蛋白酶消化, PBS 洗涤离心后重悬于 100  $\mu$ L 细胞染色缓冲液中, 用 APC anti-human CD227 (MUC-1) Antibody (200  $\mu$ g/mL, 5  $\mu$ L) (Biolegend) 标记 MUC1, 在 4  $^{\circ}$ C 下避光孵育 30 min 后, 用 PBS 洗涤重悬 3 次, 用流式细胞仪(Dakewe EXFLOW-

206)进行分析。

蛋白质免疫印迹(Western blot)检测 MUC1、CTSC、JAG1 蛋白的表达: 分别将编辑及未编辑的肿瘤细胞用 PBS 洗涤细胞 3 次, 裂解并重悬于含有 1%  $\beta$ -巯基乙醇的十二烷基硫酸钠(SDS)样品缓冲液中, 对总蛋白提取物进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)后, 将蛋白质转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜(Millipore)上。为了阻断非特异性结合位点, 用含有 5% 牛奶的 TBST (含 Tween-20 的 Tris 缓冲液)处理膜 1 h, 随后, 将膜与一抗在 4 °C 下孵育过夜, 洗涤后, 将膜与二抗一起孵育 1 h, 然后使用增强型化学发光系统(Aspen)来检测信号。

### 1.9 肿瘤细胞系的 mRNA 标志物检测

将 BT549 肿瘤细胞 ( $5 \times 10^4$  个细胞悬浮在 1 mL 培养基中)接种在 35 mm 培养皿中, 在 37 °C 下培养 24 h, 随后, 将培养基替换为含有 P@PAH (质粒浓度 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )或空载体 PAH 的新鲜培养基继续培养 48 h, 分别得到编辑及未编辑的肿瘤细胞。将培养基替换为含有纳米探针 MBs@PAH 的新鲜培养基, 其中 MB1、MB2、MB3 浓度均为 0.07 nmol/mL, 继续孵育 4 h, PBS 清洗后用 4% 的多聚甲醛固定 15 min, 随后用 DAPI 染料处理 10 min, 用激光共聚焦扫描显微镜(Zeiss LSM980)观察探针检测的细胞。

将 BT549 肿瘤细胞接种在 6 孔板中(每孔  $2 \times 10^5$  个细胞在 2 mL 培养基中), 在 37 °C 下培养 24 h 后, 将培养基替换为含有 P@PAH (质粒浓度 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )或空载体 PAH 的新鲜培养基, 共孵育 48 h, 分别得到编辑及未编辑的肿瘤细胞。将培养基替换为含有负载分子信标的纳米探针 MBs@PAH 的新鲜培养基, 其中 MB1、MB2、MB3 浓度均为 0.07 nmol/mL, 继续孵育 4 h, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 经胰蛋白酶消化后离心收集, PBS 洗涤重悬后用多聚甲醛固定, 通过流式细胞仪(Dakewe EXFLOW-206)进行分析。

### 1.10 循环恶性细胞的基因编辑

乳腺癌患者(患者 1: 女, 53 岁; 患者 2: 女, 51 岁)的外周血样本由安徽医科大学第一附属医院提供, 本研究通过了安徽医科大学伦理委员会批准(批准号 82230001)。外周血采用 EDTA 抗凝管收集, 之后, 将外周血转移到 24 孔板中(每孔 1 mL 全血), 分别将 200  $\mu\text{L}$  含 P@PAH (负载 2  $\mu\text{g}$

质粒)或空载体 PAH 的超纯水, 加入 1 mL 全血中, 在 37 °C 孵育 6 h, 随后, 将全血用密度梯度离心管(STEMCELL)离心(2230 r/min, 30 min)分离出含 CMCs 的外周血单个核细胞(PBMCs), 用 7  $\mu\text{m}$  孔径的滤膜过滤, 分离出 CMCs, 将膜上的 CMCs 反复用 PBS 清洗, 之后, 将 CMCs 连同滤膜一起放入 24 孔板的孔中, 加入 1 mL DMEM 培养基继续培养 42 h, 得到经 P@PAH 处理的编辑的 CMCs, 以及经 PAH 处理的未编辑的 CMCs。

### 1.11 循环恶性细胞的 mRNA 标志物检测

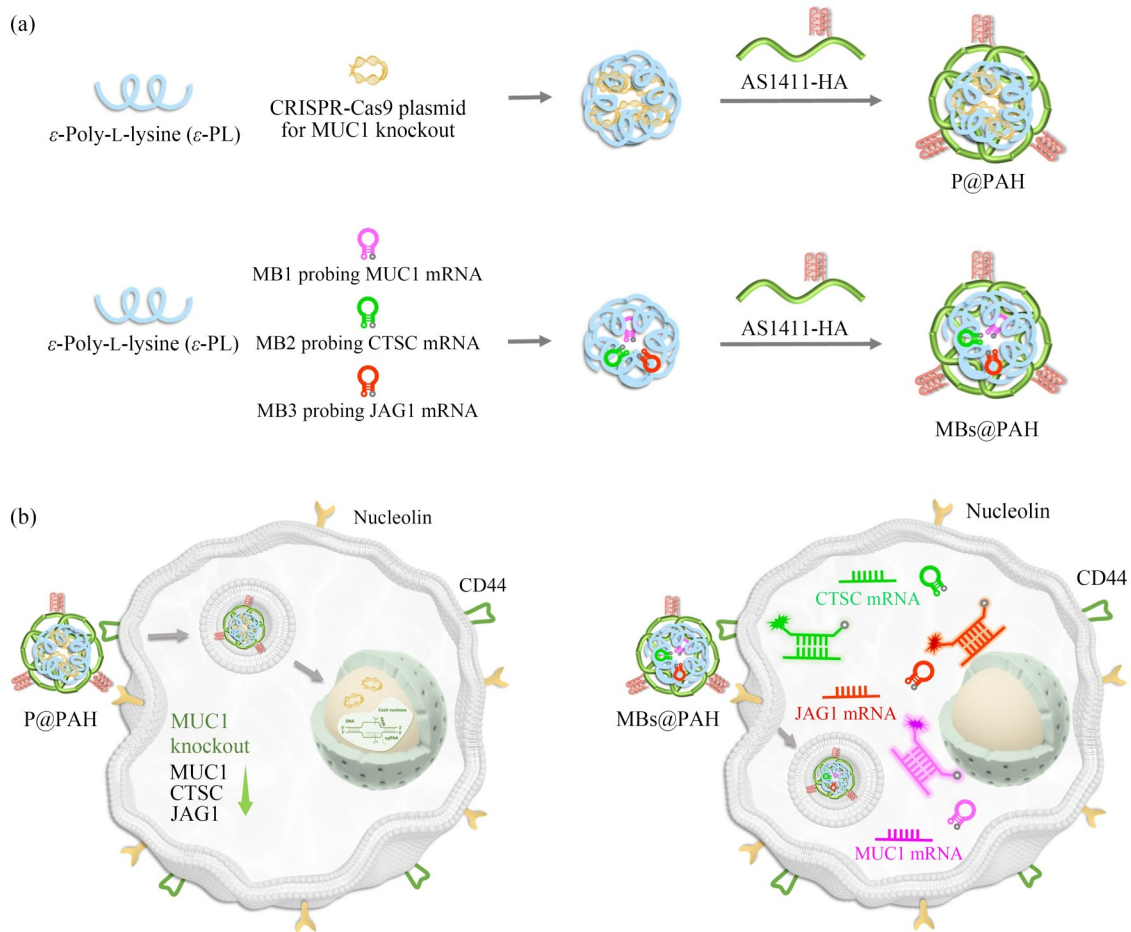
分别将编辑及未编辑的 CMCs 的培养基替换成含纳米探针 MBs@PAH (负载 0.07 nmol MB1、0.07 nmol MB2、0.07 nmol MB3)的 1 mL 新鲜培养基, 孵育 4 h, 移除培养基, CMCs 用 4% 的多聚甲醛固定后, 用 PBS 清洗, 加入 DAPI 避光染色 10 min, 最后转移到 35 mm 培养皿, 用激光共聚焦扫描显微镜(Zeiss LSM980)观察探针检测的编辑及未编辑的 CMCs。

## 2 结果与讨论

### 2.1 基因编辑传递体系及纳米探针的制备和表征

如示意图 1(a)所示, 通过自组装分别制备了负载 CRISPR-Cas9 质粒的基因编辑传递体系及负载分子信标的传递体系(即纳米探针)。制备负载 CRISPR-Cas9 质粒的基因编辑传递体系时, 先用具有较强正电性的  $\epsilon$ -PL 与带负电的质粒复合形成直径在 150 nm 左右的复合物纳米粒子 P@P (表 1), 其 Zeta 电势为 17.2 mV。进一步, 在 P@P 表面通过静电作用引入带负电的 AHA, 得到负载质粒的肿瘤靶向基因编辑传递体系 P@PAH。如示意图 1(b)所示, AHA 上链接的 AS1411 可结合肿瘤细胞过表达的核仁素, 而 HA 链可与肿瘤细胞表面的 CD44 特异性作用, 从而达到双重肿瘤细胞靶向的效果, P@PAH 靶向进入肿瘤细胞后, CRISPR-Cas9 质粒最终进入细胞核, 表达出 Cas9 蛋白, 进行基因编辑, 敲除 MUC1 基因, 下调相关的蛋白。

负载分子信标的肿瘤靶向纳米探针 MBs@PAH 的制备过程与质粒传递体系类似, 用正电性的  $\epsilon$ -PL 与带负电的检测 MUC1 mRNA、CTSC mRNA、JAG1 mRNA 的 3 种分子信标复合, 之后在复合物表面通过静电作用引入 AHA, 赋予纳米探针双重肿瘤靶向性能。MBs@PAH 进



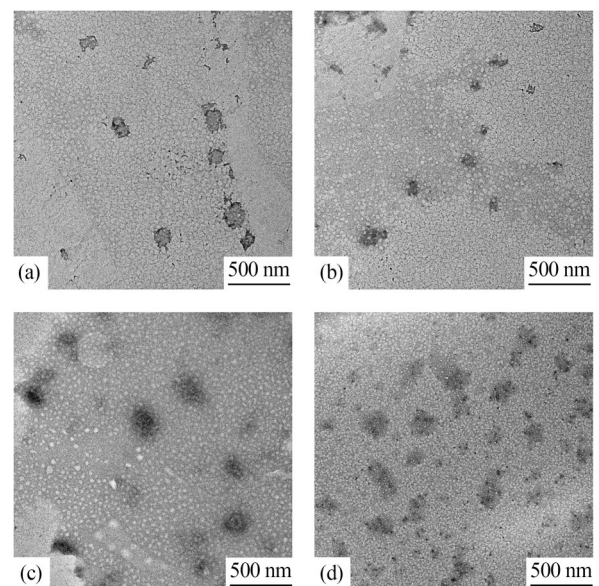
**Scheme 1** (a) Schematic diagram showing the preparation procedure of the genome editing plasmid delivery system and the molecular beacon delivery system. (b) Schematic diagram illustrating genome editing mediated by the plasmid delivery system and detection of mRNA biomarkers associated with cancer metastasis using the molecular beacon delivery system to assess therapeutic efficacy.

入肿瘤细胞后，释放出3种分子信标，在细胞内存在MUC1 mRNA、CTSC mRNA、JAG1 mRNA的情况下，3种分子信标分别与相应的mRNA发生杂化，发出不同颜色的荧光。

如表1所示，粒径、电位分析表明负载质粒的基因编辑传递体系及负载分子信标的纳米探针的平均粒径均在200 nm以内，Zeta电势均为正值。图1中的TEM图片与粒径分析结果一致。

**Table 1** The size, size distribution and Zeta potential of plasmid delivery systems and the molecular beacon delivery system.

| Sample  | Size (nm)  | PDI  | Zeta potential (mV) |
|---------|------------|------|---------------------|
| P@P     | 150.2±62.3 | 0.23 | 17.2±3.1            |
| P@PH    | 123.8±4.4  | 0.20 | 15.9±0.4            |
| P@PAH   | 165.2±33.5 | 0.29 | 14.2±2.4            |
| MBs@PAH | 160.9±7.5  | 0.27 | 17.3±1.8            |



**Fig. 1** TEM images of genome editing plasmid delivery systems and the molecular beacon delivery system: (a) P@P, (b) P@PH, (c) P@PAH and (d) MBs@PAH.

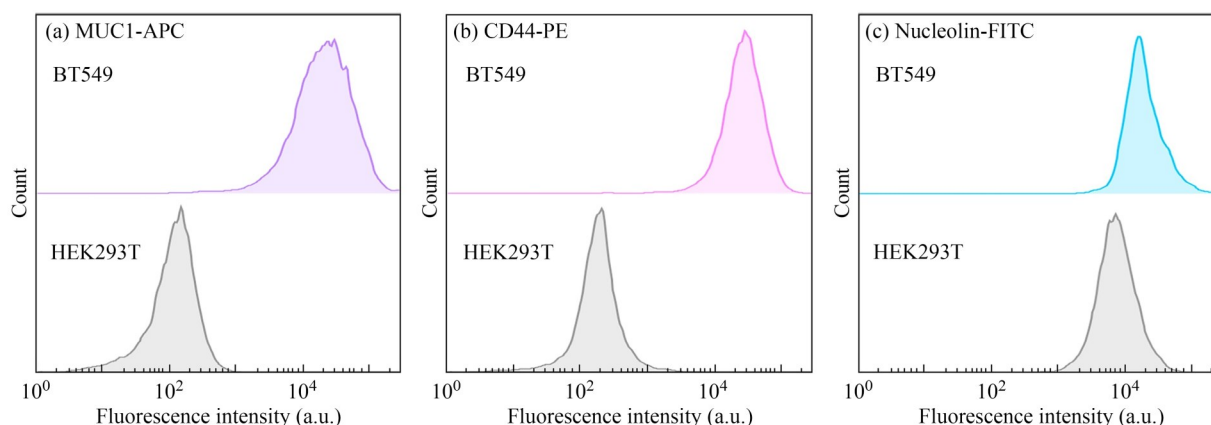
## 2.2 传递体系的肿瘤细胞靶向性能

为了研究在传递载体中引入透明质酸(HA)以及 AS1411 适配子对肿瘤细胞的传递效率的影响,用 YOYO-1 标记质粒,制备了系列负载 YOYO-1 标记质粒的传递体系,将所制备的不同组成的传递体系与细胞共孵育 4 h,通过激光共聚焦扫描显微镜(CLSM)和流式细胞仪检测传递

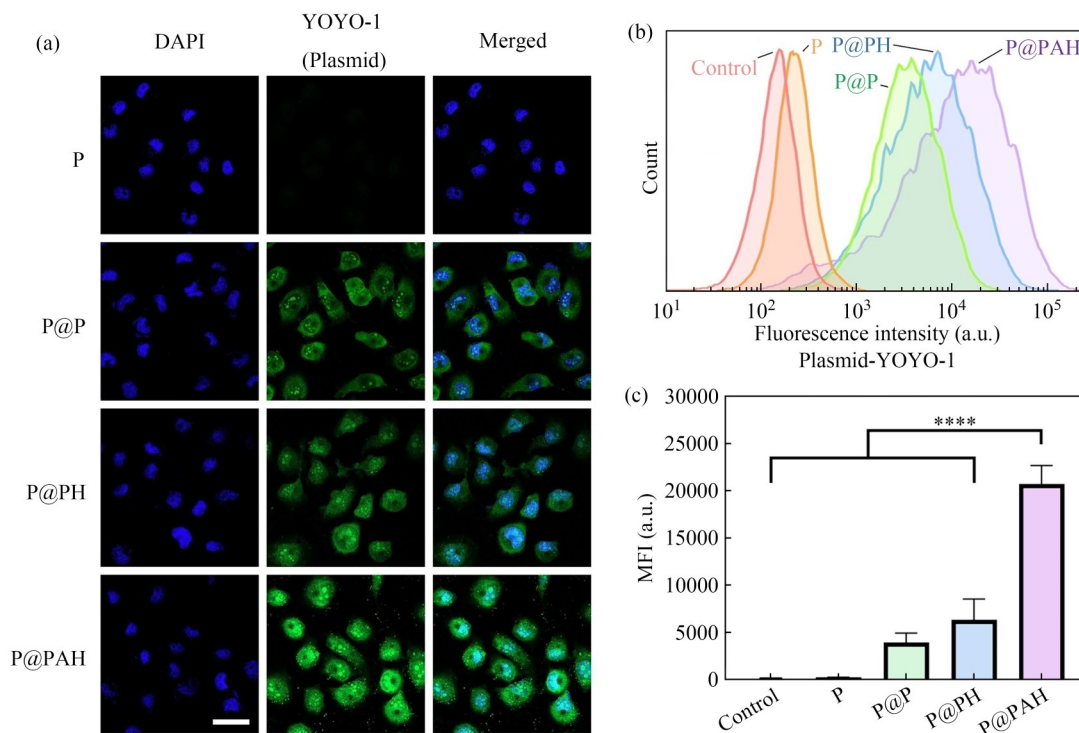
体系对肿瘤细胞系和正常细胞系的传递效果.

如图2所示,流式抗体检测确认了肿瘤细胞 BT549 表面过表达 MUC1、CD44 和核仁素,而正常细胞 HEK293T 中 MUC1 和 CD44 表达极低,核仁素的水平明显低于肿瘤细胞.

如图3(a)的 CLSM 图片及图3(b)和3(c)的流式细胞分析所示,在乳腺癌细胞系 BT549 中,裸



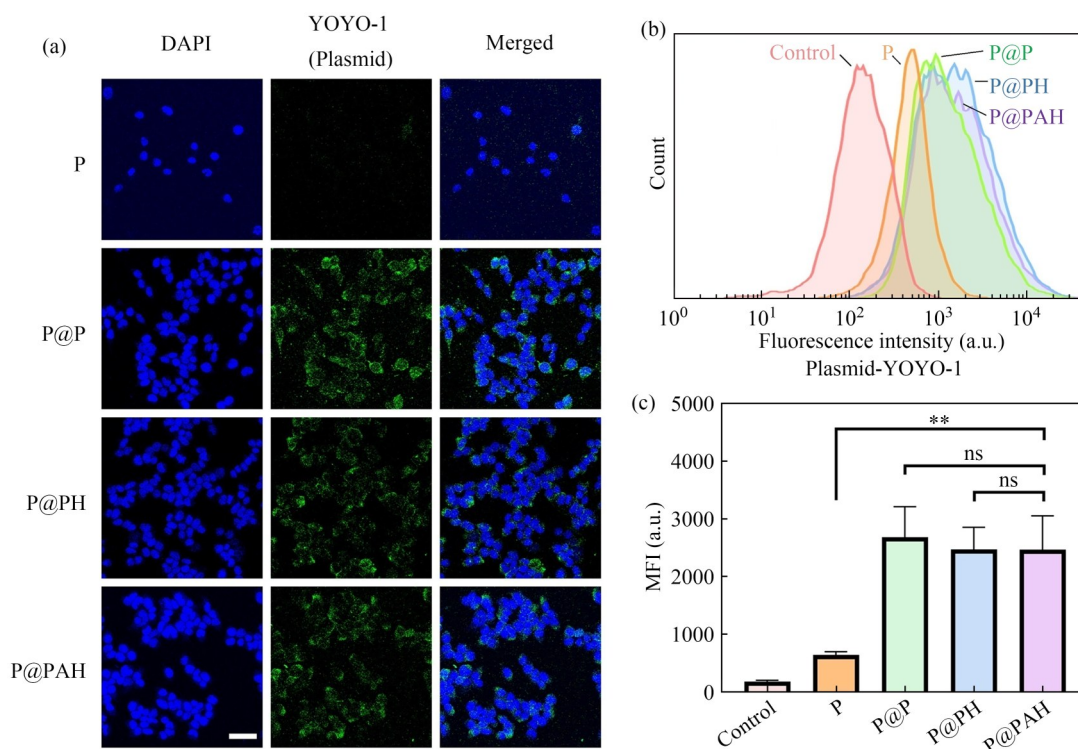
**Fig. 2** Flow cytometry analysis of antibody labeled (a) MUC1, (b) CD44 and (c) nucleolin in untreated BT549 cells and HEK293T cells.



**Fig. 3** Cellular delivery efficacy of various plasmid delivery systems in BT549 cells. (a) Confocal laser scanning microscopy (CLSM) observation; (b) Flow cytometry analysis, and (c) mean fluorescence intensity (MFI) as analyzed by flow cytometry of BT549 cells after incubation with different plasmid delivery systems. Cells were treated with naked plasmid (P) or a plasmid delivery system for 4 h. The plasmid was YOYO-1 labeled. Cell nuclei were DAPI stained. Scale bar, 50  $\mu$ m. Untreated cells were served as a control in flow cytometry. Data are shown as mean  $\pm$ SD,  $n=3$ . The results were statistically analyzed using one-way ANOVA. \*\*\*\* $p<0.0001$ .

质粒P很难进入细胞, 表面未修饰的P@P纳米粒子进入细胞的量也较有限, 表面修饰了单靶向组分HA的传递体系P@PH的质粒传递能力有所提高, 而修饰了双靶向组分AHA的质粒传递体系P@PAH表现出最高的传递效率, 这是由于AHA的AS1411及HA链对BT549细胞过表达的核仁素及CD44的特异性亲和力显著提高了P@PAH的质粒传递效率.

如图4(a)的CLSM图片及图4(b)和4(c)的流式细胞分析所示, 引入HA和AHA对于正常细胞的传递效率没有显著影响, 这是因为正常细胞HEK293T的CD44表达量极低、核仁素的表达也很有限. 由于正常细胞对P@PAH的摄取显著低于肿瘤细胞, 因此P@PAH可实现针对肿瘤细胞的靶向传递.



**Fig. 4** Cellular delivery efficacy of various plasmid delivery systems in HEK293T cells. (a) CLSM observation; (b) Flow cytometry analysis, and (c) mean fluorescence intensity (MFI) as analyzed by flow cytometry of HEK293T cells after incubation with different plasmid delivery systems. Cells were treated with naked plasmid (P) or a plasmid delivery system for 4 h. The plasmid was YOYO-1 labeled. Cell nuclei were DAPI stained. Scale bar, 50  $\mu$ m. Untreated cells were served as a control in flow cytometry. Data are shown as mean  $\pm$ SD,  $n=3$ . The results were statistically analyzed using one-way ANOVA. \*\* $p<0.01$ ; ns, not significant.

### 2.3 肿瘤细胞系中的基因编辑及 mRNA 的检测

利用负载 CRISPR-Cas9 质粒的传递体系在肿瘤细胞系 BT549 中开展了基因编辑研究, 分别将质粒传递体系 P@PAH 及不含质粒的空载体 PAH 与 BT549 细胞共孵育 48 h, 得到编辑的肿瘤细胞及未编辑的肿瘤细胞.

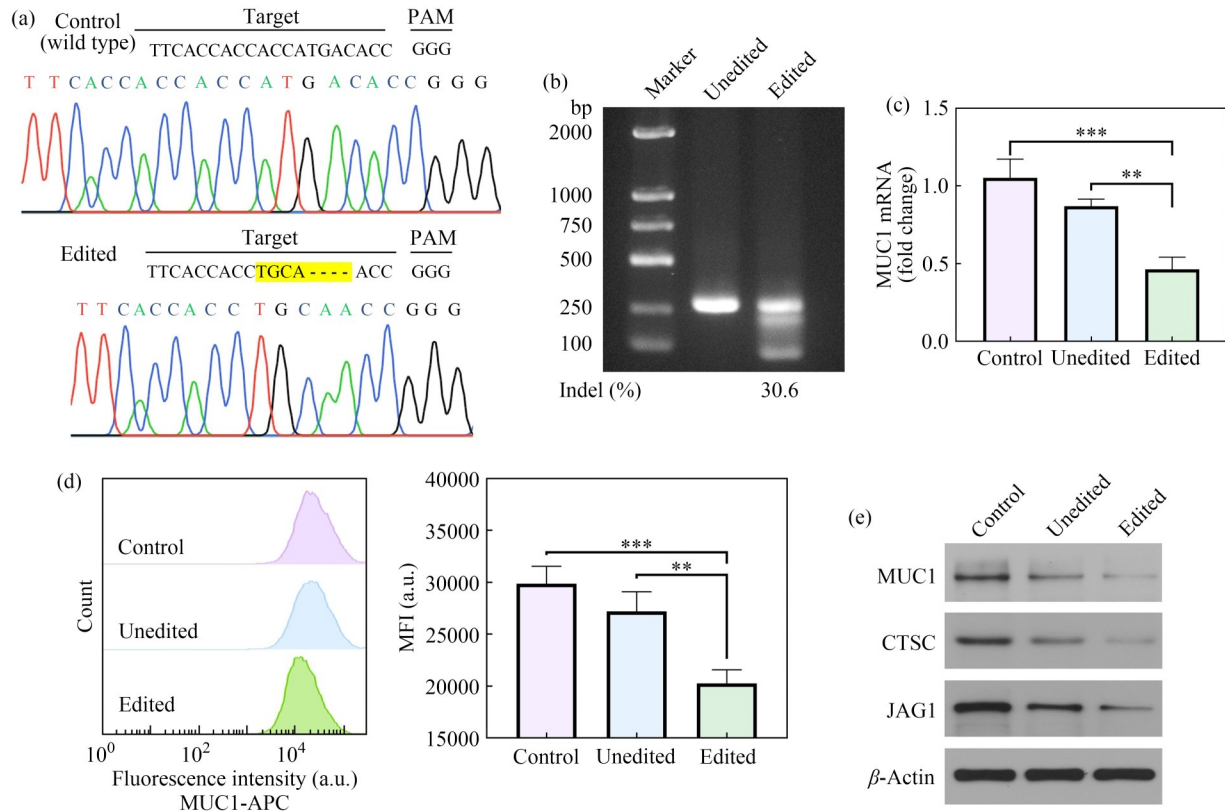
如图 5(a)所示, BT549 细胞的基因测序结果表明, 与野生型细胞相比编辑后的细胞 MUC1 基因发生突变, 确认了负载 CRISPR-Cas9 质粒的传递体系 P@PAH 成功敲除了肿瘤细胞的 MUC1 基因. 由图 5(b)可见, 经 P@PAH 基因编辑后,

30.6% 的 MUC1 基因发生了突变. 图 5(c) 的 qPCR 结果表明编辑的细胞中 MUC1 mRNA 水平显著下降. 图 5(d) 的流式细胞检测结果显示, 基因编辑后肿瘤细胞上结合的抗体荧光值显著下降, 表明编辑后, 细胞中 MUC1 蛋白的表达明显下降, 图 5(e) 的蛋白质免疫印迹结果表明基因编辑后, BT549 细胞中 MUC1 蛋白的表达显著降低, 同时, 肺转移标志物 CTSC 和骨转移标志物 JAG1 也明显下调.

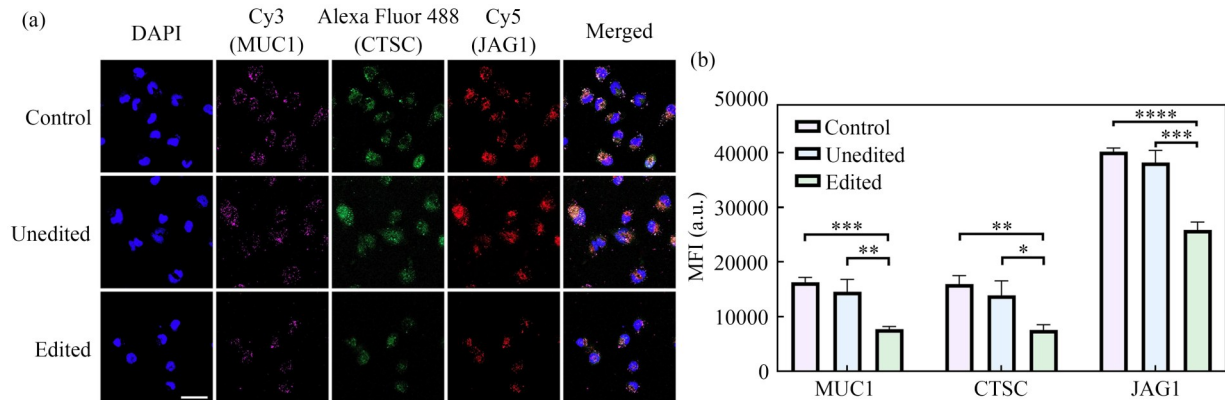
为了进一步评估 MUC1 下调对于癌细胞转移标志物 CTSC、JAG1 的影响, 用负载 3 种分子

信标的纳米探针 MBs@PAH 检测 BT549 细胞中 mRNA 的水平, 如图 6(a) 的 CLSM 图片及图 6(b) 的

流式细胞分析所示, 基因编辑后 3 种分子信标的荧光值均明显下降, 表明 MUC1 mRNA、



**Fig. 5** Evaluation of genome editing efficiency in a cancer cell line. (a) The DNA sequencing result of untreated BT549 cells and edited BT549 cells. (b) Surveyor assay on the genomic DNA extracted from unedited and edited BT549 cells. (c) qPCR analysis of MUC1 mRNA in unedited and edited BT549 cells. (d) Flow cytometry analysis of antibody labeled MUC1 protein in unedited and edited BT549 cells. Data are shown as mean  $\pm$ SD,  $n=3$ . The results were statistically analyzed using one-way ANOVA. \*\* $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$ . (e) Western blot analysis of MUC1, CTSC and JAG1 expression in unedited and edited BT549 cells. Unedited BT549 cells were treated with the blank vector PAH and edited BT549 cells were treated with P@PAH. Untreated BT549 cells were served as a control.



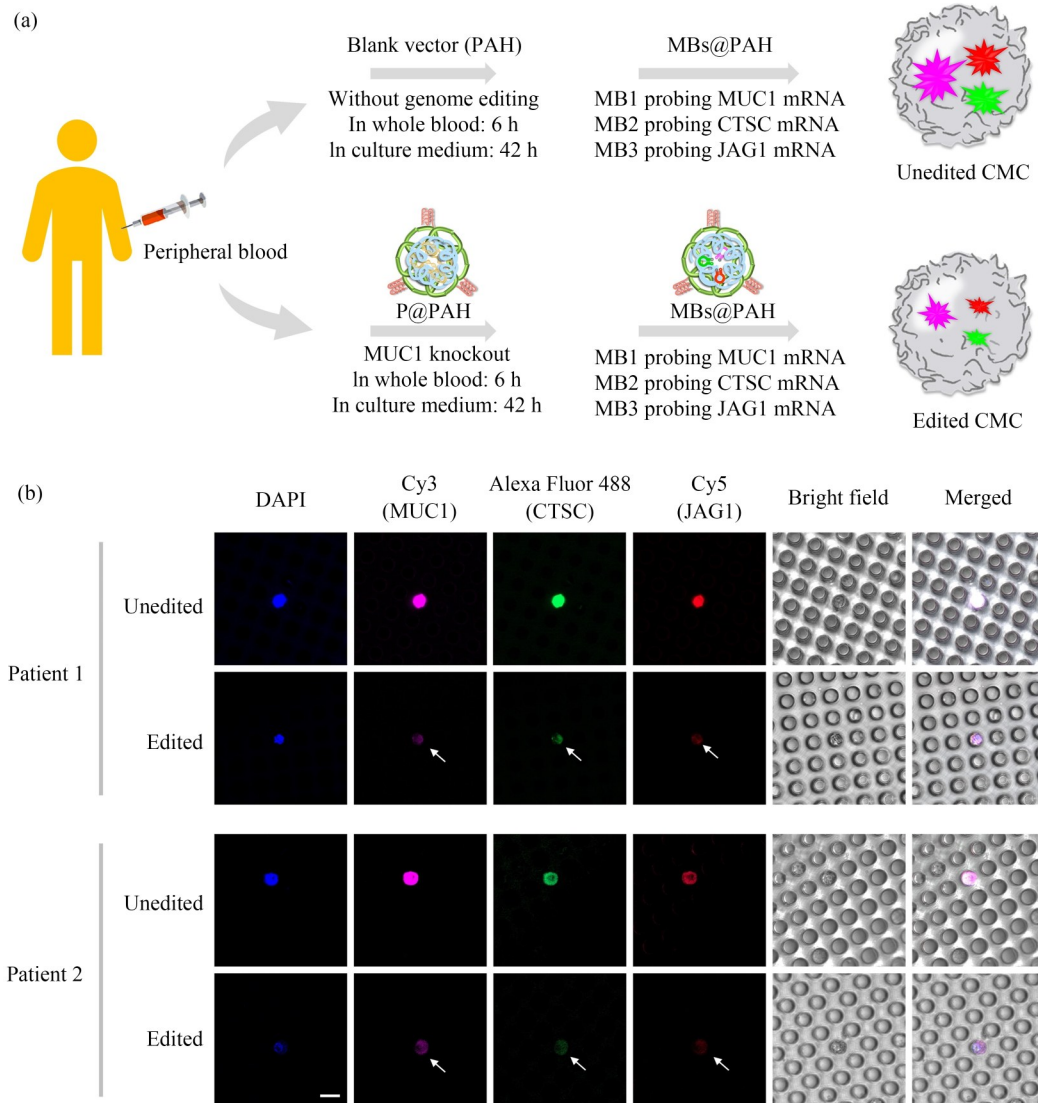
**Fig. 6** Effects of genome editing on mRNA levels of MUC1, CTSC and JAG1. (a) CLSM images of unedited and edited BT549 cells with MUC1 mRNA, CTSC mRNA and JAG1 mRNA probed by MBs@PAH. Scale bar, 50  $\mu$ m. (b) Flow cytometry analysis of unedited and edited BT549 cells with MUC1 mRNA, CTSC mRNA and JAG1 mRNA probed by MBs@PAH. Data are shown as mean  $\pm$ SD,  $n=3$ . The results were statistically analyzed using one-way ANOVA. \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$ ; \*\*\*\* $p<0.0001$ . Unedited BT549 cells were treated with the blank vector PAH and edited BT549 cells were treated with P@PAH. Untreated BT549 cells were served as a control.

CTSC mRNA、JAG1 mRNA 在编辑后的肿瘤细胞中均明显减少, 这与发现 3 种相应的蛋白表达下降的蛋白质免疫印迹结果一致. 与未处理的对照组比较, 空载体处理细胞后, 其 MUC1、CTSC、JAG1 略有下降, 这主要是因为载体中的  $\epsilon$ -聚-L-赖氨酸也有促进细胞凋亡等抗肿瘤效果<sup>[20]</sup>.

#### 2.4 循环恶性细胞中的基因编辑及 mRNA 的检测

在乳腺癌细胞系中验证了靶向基因编辑传递体系对 MUC1 的有效下调后, 进一步用质粒传递体系 P@PAH 对乳腺癌患者全血中的循环恶性细胞 (CMCs) 进行基因编辑. 如图 7(a) 所示, 将

P@PAH 纳米粒子加入病人的全血样本中, 孵育 6 h 后, 质粒传递体系被 CMCs 摄取, 此时将血液进行密度梯度离心, 分离出 CMCs 和 PBMCs, 随后用 7  $\mu\text{m}$  孔径的滤膜过滤, 由于 CMCs 的体积较大, 会被截留在滤膜上, 再将截留有 CMCs 的滤膜转移至培养基中继续孵育 42 h, 以完成基因编辑. 之后, 将培养基换成加入了纳米探针 MBs@PAH 的新鲜培养基孵育 4 h 进行 mRNA 检测. 图 7(b) 的 CLSM 结果表明, 与用空白载体处理的未编辑 CMCs 相比, 经 P@PAH 处理的, 编辑后的 CMCs 中 3 种荧光均有明显下调. MUC1 mRNA 的下调说明 P@PAH 能成功进入全血中的



**Fig. 7** (a) Schematic diagram showing the procedure of genome editing and detection of mRNA biomarkers associated with cancer metastasis to assess therapeutic efficacy in circulating malignant cells (CMCs) from a cancer patient. (b) CLSM images of typical unedited and edited CMCs with MUC1 mRNA, CTSC mRNA and JAG1 mRNA probed by MBs@PAH. Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ . Unedited CMCs were treated with PAH and edited CMCs were treated with P@PAH.

CMCs, 并对其进行MUC1的敲除. 相应地, 肺转移标志物CTSC和骨转移标志物JAG1的mRNA水平也显著下调, 说明敲除MUC1能阻止恶性细胞的转移趋势. 需要指出的是, 肿瘤患者的CMCs具有高度异质性, 图中显示的是该患者同时检测到3种荧光信号的典型恶性细胞的例子, 并非所有的CMCs中都能检测到肺转移标志物及骨转移标志物.

肿瘤患者血液中存在循环恶性细胞, 包括循环肿瘤细胞(CTCs)<sup>[21]</sup>、肿瘤杂化细胞<sup>[22]</sup>及肿瘤相关细胞如肿瘤内皮细胞等<sup>[23]</sup>, 这些细胞能够通过血液循环传播到其他部位, 在肿瘤的发展转移中起关键作用. 此外, 循环恶性细胞能够有效地反映肿瘤的异质性<sup>[24-26]</sup>. 通过分析这些细胞的基因组变异及表观遗传学的变化, 可以为肿瘤的诊断、治疗和预后评估提供重要信息<sup>[27]</sup>.

本研究中, 通过双靶向传递体系可将基因编辑质粒特异性传递到全血中的CMCs中. 此外, 采用双靶向载体将3种分子信标传递到恶性细胞中, 能同时检测3种mRNA标志物. 与其他检测mRNA的方法如Northern blotting、PCR比较, 基于分子信标的检测具有独特优势, 可在活细胞中实现原位实时mRNA监测<sup>[28]</sup>.

MUC1在大多数肿瘤细胞过表达, 在肿瘤发展中起着重要作用<sup>[29,30]</sup>, 包括促进肿瘤细胞增殖和生存<sup>[30]</sup>、抑制抗肿瘤免疫<sup>[31]</sup>、促进肿瘤细胞侵袭和转移<sup>[32-34]</sup>等. MUC1的表达水平与患者的预后密切相关, 高表达的MUC1常常与肿瘤的恶化和预后不佳关联, 因此MUC1是一种很有潜力的肿瘤治疗靶点. 研究表明, 敲除MUC1基因可有效抑制肿瘤细胞增殖、减小侵袭、并下调程序性死亡配体1(PD-L1)<sup>[35]</sup>.

CTSC在肿瘤肺转移中起重要作用<sup>[36]</sup>, JAG1

则促进肿瘤骨转移<sup>[37,38]</sup>. 通过检测CTSC mRNA、JAG1 mRNA, 可以发现或预测肿瘤转移的器官, 为优化治疗方案提供重要信息.

我们发现敲除MUC1基因, 下调MUC1的表达能进一步抑制CTSC、JAG1的表达. 这主要是由于肿瘤细胞中过表达的MUC1会激活PI3K/Akt等信号通路<sup>[29]</sup>, 从而促进CTSC、JAG1的表达. 此外, MUC1还会通过影响转录因子的活性来影响相关蛋白的表达<sup>[30]</sup>. 通过基因编辑敲除MUC1基因不仅能下调MUC1的表达, 而且还能抑制系列促进肿瘤发展转移的蛋白表达, 从而达到有效抗肿瘤的目的.

本研究利用数毫升血液即可进行个性化体外疗效研究, 不仅避免了人体实验的风险, 而且还能根据病情发展及治疗的需要, 随时跟踪研究, 具有便捷、安全的优势. 本研究以敲除MUC1的基因治疗作为一个典型的治疗方案示例, 并以检测转移相关标志物为例展示了这一体外研究策略的有效性和便捷性, 这一研究策略也适用于评估其他治疗方法及检测其它核酸标志物, 可为个性化治疗提供准确的信息.

### 3 结论

通过构建的肿瘤靶向传递载体负载基因编辑质粒实现了对肿瘤患者外周血中的循环恶性细胞的有效基因编辑, 敲除了促进肿瘤发展的MUC1. 用该载体负载3种信标能够原位检测基因编辑效果. 敲除MUC1后, 循环恶性细胞中与肿瘤发展相关的肺转移标志物CTSC和骨转移标志物JAG1均有效下调, 表明通过传递体系介导的基因治疗能抑制肿瘤转移. 本研究针对血样中的循环恶性细胞开展单细胞水平的精准疗效评估, 这一方法可为肿瘤个性化治疗提供依据和参考.

### REFERENCES

- 1 Martínez-Jiménez, F.; Muiños, F.; Sentís, I.; Deu-Pons, J.; Reyes-Salazar, I.; Arnedo-Pac, C.; Mularoni, L.; Pich, O.; Bonet, J.; Kranas, H.; Gonzalez-Perez, A.; Lopez-Bigas, N. A compendium of mutational cancer driver genes. *Nat. Rev. Cancer*, **2020**, 20(10), 555–572.
- 2 Hausser, J.; Alon, U. Tumour heterogeneity and the evolutionary trade-offs of cancer. *Nat. Rev. Cancer*, **2020**, 20(4), 247–257.
- 3 Dagogo-Jack, I.; Shaw, A. T. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **2018**, 15(2), 81–94.
- 4 Abdolahi, S.; Ghazvinian, Z.; Muhammadnejad, S.; Saleh, M.; Asadzadeh Aghdaei, H.; Baghaei, K. Patient-derived xenograft (PDX) models, applications and challenges in cancer research. *J. Transl. Med.*, **2022**, 20(1), 206.

- 5 Schambach, A.; Buchholz, C. J.; Torres-Ruiz, R.; Cichutek, K.; Morgan, M.; Trapani, I.; Büning, H. A new age of precision gene therapy. *Lancet*, **2024**, 403(10426), 568–582.
- 6 Mohammadinejad, R.; Dehshahri, A.; Sagar Madamsetty, V.; Zahmatkeshan, M.; Tavakol, S.; Makvandi, P.; Khorsandi, D.; Pardakhty, A.; Ashrafizadeh, M.; Ghasemipour Afshar, E.; Zarrabi, A. *In vivo* gene delivery mediated by non-viral vectors for cancer therapy. *J. Control. Release*, **2020**, 325, 249–275.
- 7 Wang, J. H.; Gessler, D. J.; Zhan, W.; Gallagher, T. L.; Gao, G. P. Adeno-associated virus as a delivery vector for gene therapy of human diseases. *Signal Transduct. Target. Ther.*, **2024**, 9(1), 78.
- 8 Shirley, J. L.; de Jong, Y. P.; Terhorst, C.; Herzog, R. W. Immune responses to viral gene therapy vectors. *Mol. Ther.*, **2020**, 28(3), 709–722.
- 9 Thomas, C. E.; Ehrhardt, A.; Kay, M. A. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat. Rev. Genet.*, **2003**, 4(5), 346–358.
- 10 Elzoghby, A. O.; Samy, W. M.; Elgindy, N. A. Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems. *J. Control. Release*, **2012**, 161(1), 38–49.
- 11 Hu, W. K.; Ying, M.; Zhang, S. M.; Wang, J. L. Poly(amino acid)-based carrier for drug delivery systems. *J. Biomed. Nanotechnol.*, **2018**, 14(8), 1359–1374.
- 12 Wang, L.; Zhang, C. Y.; Zhang, J. H.; Rao, Z. M.; Xu, X. M.; Mao, Z. G.; Chen, X. S. Epsilon-poly-L-lysine: recent advances in biomanufacturing and applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **2021**, 9, 748976.
- 13 Zhu, H. F.; Liu, R.; Shang, Y. X.; Sun, L. Y. Polylysine complexes and their biomedical applications. *Eng. Regen.*, **2023**, 4(1), 20–27.
- 14 Patil, N. A.; Kandasubramanian, B. Functionalized polylysine biomaterials for advanced medical applications: a review. *Eur. Polym. J.*, **2021**, 146, 110248.
- 15 Lv, P.; Zhou, C.; Zhao, Y. L.; Liao, X. L.; Yang, B. Modified-epsilon-polylysine-grafted-PEI- $\beta$ -cyclodextrin supramolecular carrier for gene delivery. *Carbohydr. Polym.*, **2017**, 168, 103–111.
- 16 Urello, M. A.; Xiang, L.; Colombo, R.; Ma, A.; Joseph, A.; Boyd, J.; Peterson, N.; Gao, C. S.; Wu, H.; Christie, R. J. Metabolite-based modification of poly(L-lysine) for improved gene delivery. *Biomacromolecules*, **2020**, 21(9), 3596–3607.
- 17 Hong, C. A.; Son, H. Y.; Nam, Y. S. Layer-by-layer siRNA/poly(L-lysine) multilayers on polydopamine-coated surface for efficient cell adhesion and gene silencing. *Sci. Rep.*, **2018**, 8(1), 7738.
- 18 Qiu, L. P.; Wu, C. C.; You, M. X.; Han, D.; Chen, T.; Zhu, G. Z.; Jiang, J. H.; Yu, R. Q.; Tan, W. H. A targeted, self-delivered, and photocontrolled molecular beacon for mRNA detection in living cells. *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135(35), 12952–12955.
- 19 Mattheolabakis, G.; Milane, L.; Singh, A.; Amiji, M. M. Hyaluronic acid targeting of CD44 for cancer therapy: from receptor biology to nanomedicine. *J. Drug Target.*, **2015**, 23(7-8), 605–618.
- 20 Hu, H. H.; Zhang, Z.; Fang, Y. F.; Chen, L.; Wu, J. Therapeutic poly(amino acid)s as drug carriers for cancer therapy. *Chin. Chem. Lett.*, **2023**, 34(6), 107953.
- 21 Ring, A.; Nguyen-Sträuli, B. D.; Wicki, A.; Aceto, N. Biology, vulnerabilities and clinical applications of circulating tumour cells. *Nat. Rev. Cancer*, **2023**, 23(2), 95–111.
- 22 Tretyakova, M. S.; Subbalakshmi, A. R.; Menyailo, M. E.; Jolly, M. K.; Denisov, E. V. Tumor hybrid cells: nature and biological significance. *Front. Cell Dev. Biol.*, **2022**, 10, 814714.
- 23 Lin, A. Y.; Wang, D. D.; Li, L. D.; Lin, P. P. Identification and comprehensive co-detection of necrotic and viable aneuploid cancer cells in peripheral blood. *Cancers*, **2021**, 13(20), 5108.
- 24 Han, D.; Ren, X. H.; He, X. Y.; Chen, X. S.; Pang, X.; Cheng, S. X. Aptamer/peptide-functionalized nanoprobe for detecting multiple miRNAs in circulating malignant cells to study tumor heterogeneity. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **2023**, 9(10), 5832–5842.
- 25 Han, D.; He, X. Y.; Huang, Y.; Gao, M.; Guo, T.; Ren, X. H.; Liao, X. R.; Chen, X. S.; Pang, X.; Cheng, S. X. A multifunctional delivery system for remodulating cell behaviors of circulating malignant cells to prevent cell fusion. *Adv. Sci.*, **2023**, 10(29), e2303309.
- 26 Han, D.; Ren, X. H.; Liao, X. R.; He, X. Y.; Guo, T.; Chen, X. S.; Pang, X.; Cheng, S. X. A multiple targeting nanoprobe for identifying cancer metastatic sites based on detection of various mRNAs in circulating tumor cells. *Nano Lett.*, **2023**, 23(9), 3678–3686.
- 27 Krebs, M. G.; Metcalf, R. L.; Carter, L.; Brady, G.; Blackhall, F. H.; Dive, C. Molecular analysis of circulating tumour cells-biology and biomarkers. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **2014**, 11(3), 129–144.

- 28 Yang, G.; Song, T.; Wang, M.; Li, M. Y.; Su, Q. Q.; Xie, Z. X.; Xie, X. X.; Zhang, H. X.; Feng, Y.; Wu, C. H.; Liu, Y. Y.; Yang, H. Recent advancements in nanosystem-based molecular beacons for RNA detection and imaging. *ACS Appl. Nano Mater.*, **2022**, 5(3), 3065–3086.
- 29 Jin, C.; Rajabi, H.; Rodrigo, C. M.; Porco, J. A. Jr, Kufe, D. Targeting the eIF4A RNA helicase blocks translation of the MUC1-C oncoprotein. *Oncogene*, **2013**, 32(17), 2179–2188.
- 30 Kufe, D. W. MUC1-C oncoprotein as a target in breast cancer: activation of signaling pathways and therapeutic approaches. *Oncogene*, **2013**, 32(9), 1073–1081.
- 31 Chen, X. Y.; Sandrine, I. K.; Yang, M.; Tu, J. Y.; Yuan, X. L. MUC1 and MUC16: critical for immune modulation in cancer therapeutics. *Front. Immunol.*, **2024**, 15, 1356913.
- 32 Mori, Y.; Akita, K.; Tanida, S.; Ishida, A.; Toda, M.; Inoue, M.; Yashiro, M.; Sawada, T.; Hirakawa, K.; Nakada, H. MUC1 protein induces urokinase-type plasminogen activator (uPA) by forming a complex with NF- $\kappa$ B p65 transcription factor and binding to the uPA promoter, leading to enhanced invasiveness of cancer cells. *J. Biol. Chem.*, **2014**, 289(51), 35193–35204.
- 33 Khodabakhsh, F.; Merikhian, P.; Eisavand, M. R.; Farahmand, L. Crosstalk between MUC1 and VEGF in angiogenesis and metastasis: a review highlighting roles of the MUC1 with an emphasis on metastatic and angiogenic signaling. *Cancer Cell Int.*, **2021**, 21(1), 200.
- 34 Rajabi, H.; Kufe, D. MUC1-C oncoprotein integrates a program of EMT, epigenetic reprogramming and immune evasion in human carcinomas. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*, **2017**, 1868(1), 117–122.
- 35 Ren, X. H.; Han, D.; He, X. Y.; Guo, T.; Chen, X. S.; Pang, X.; Cheng, S. X. Multi-targeting nano-systems targeting heterogeneous cancer cells for therapeutics and biomarker detection. *Adv. Healthcare Mater.*, **2023**, 12(4), 2202155.
- 36 Xiao, Y. S.; Cong, M.; Li, J. T.; He, D. S.; Wu, Q. Y.; Tian, P.; Wang, Y.; Yang, S. X.; Liang, C. X.; Liang, Y. J.; Wen, J. L.; Liu, Y. J.; Luo, W. Q.; Lv, X. Z.; He, Y. F.; Cheng, D. D.; Zhou, T. H.; Zhao, W. J.; Zhang, P. Y.; Zhang, X.; Xiao, Y. C.; Qian, Y. C.; Wang, H. X.; Gao, Q.; Yang, Q. C.; Yang, Q. F.; Hu, G. H. Cathepsin C promotes breast cancer lung metastasis by modulating neutrophil infiltration and neutrophil extracellular trap formation. *Cancer Cell*, **2021**, 39(3), 423–437.
- 37 Sethi, N.; Dai, X. D.; Winter, C. G.; Kang, Y. B. Tumor-derived jagged1 promotes osteolytic bone metastasis of breast cancer by engaging notch signaling in bone cells. *Cancer Cell*, **2011**, 19(2), 192–205.
- 38 Tao, J.; Erez, A.; Lee, B. One notch further: jagged 1 in bone metastasis. *Cancer Cell*, **2011**, 19(2), 159–161.

## Research Article

## Poly(amino acid)-based Delivery Systems for Genome Editing and Therapeutic Efficacy Evaluation in Circulating Malignant Cells

Li-jin Qi<sup>1</sup>, Di Han<sup>1</sup>, Xiao-he Ren<sup>2</sup>, Xiao-yan He<sup>2</sup>, Tao Guo<sup>3</sup>, Xian-zheng Zhang<sup>1</sup>, Si-xue Cheng<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of Biomedical Polymers of Ministry of Education, Department of Chemistry,

Wuhan University, Wuhan 430072)

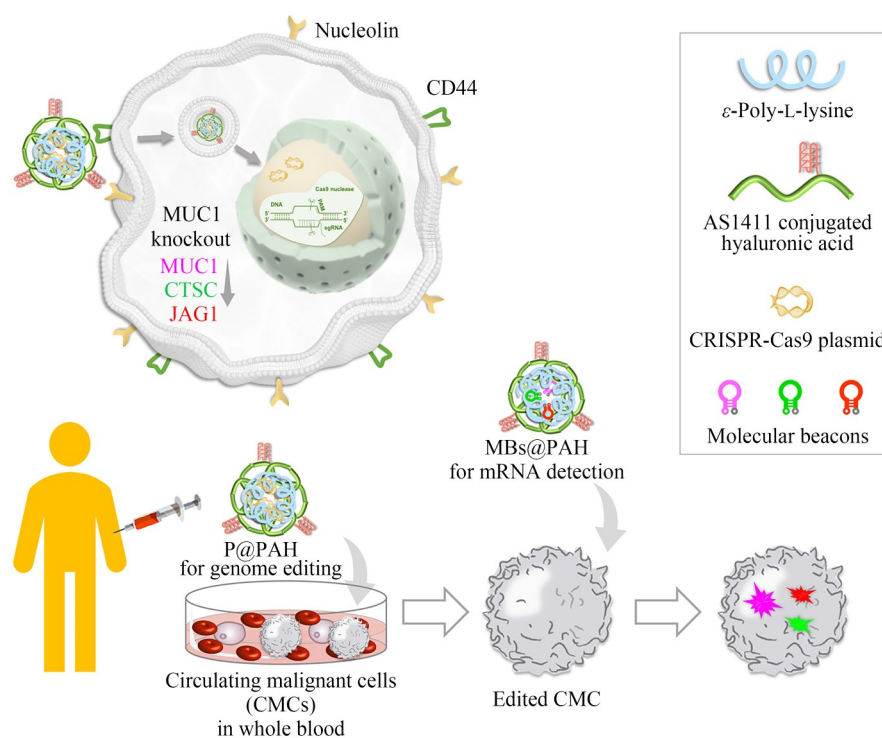
(<sup>2</sup>School of Life Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230011)

(<sup>3</sup>The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230011)

**Abstract** Tumor heterogeneity and the individual specificity of each patient pose a significant challenge in tumor research and treatment. Personalized precision therapy is one of the key approaches to address this challenge. In this study, tumor targeting delivery systems based on  $\epsilon$ -poly-L-lysine ( $\epsilon$ -PL) for tumor therapy and diagnosis were designed and prepared. In the therapeutic system,  $\epsilon$ -PL was used to complex with the CRISPR-Cas9 plasmid for knocking out mucin 1 (MUC1), a protein promotes tumor development, and then the complexes were decorated with AS1411 conjugated hyaluronic acid. The presence of AS1411 and hyaluronic acid chain facilitated the tumor targeting delivery of the genome editing plasmid into nucleolin and/or CD44 overexpressed tumor cells.

\* Corresponding author: Si-xue Cheng, E-mail: chengsixue@whu.edu.cn

Moreover, this targeted delivery vector was loaded with three types of molecular beacons to detect mRNAs of MUC1, cathepsin C (CTSC, a lung metastasis biomarker), and Notch ligand Jagged1 (JAG1, a bone metastasis biomarker), thereby evaluating the therapeutic effects of gene editing. *In vitro* and *ex vivo* studies were conducted in the BT549 tumor cell line and circulating malignant cells from breast cancer patients. The results demonstrate that the gene editing delivery system effectively targets malignant cells, leading to knockout of MUC1 gene and downregulation of MUC1 expression. Furthermore, the genome edited malignant cells show markedly reduced mRNA biomarkers associated with lung and bone metastasis, suggesting MUC1 knockout is a promising strategy for inhibiting tumor progression and metastasis. By employing a small volume of whole blood for personalized *ex vivo* studies, this research offers a safe and convenient method for effectively evaluating the therapeutic efficacy of a specific intervention. This approach is also applicable for evaluating other treatment modalities as well as detecting various nucleic acid biomarkers, thereby offering precise information for personalized therapy.



**Keywords** Poly(amino acid), Tumor targeting, Delivery vector, Gene therapy, mRNA detection