

• 综述 •

CRISPR-Cas9 基因编辑技术用于肿瘤细胞模型的研究进展*

陈燕, 刘芷兮 综述, 肖洪涛 审校[△]

610041 成都, 四川省肿瘤医院·研究所, 四川省癌症防治中心, 电子科技大学医学院 临床药理学部 (陈燕、刘芷兮、肖洪涛); 610072 成都, 个体化药物治疗四川省重点实验室 (肖洪涛)

[摘要] 成簇的规律间隔的短回文重复序列/相关核酸酶 9 (CRISPR-Cas9) 是存在于细菌和古生细菌中的一种抵御外源基因入侵的适应性免疫反应系统。与传统的锌指核酸酶和转录激活样因子效应物核酸酶基因编辑技术相比, CRISPR-Cas9 具有操作简便、高效且脱靶效率低的优点。近年来, 该项技术已在构建基因编辑肿瘤细胞模型、肿瘤治疗及治疗机制研究中得到广泛关注。本文就其在肿瘤细胞模型建立、肿瘤治疗及机制方面的研究应用进行综述, 旨在为 CRISPR/Cas9 的临床前研究提供一定的理论依据与参考, 为基因治疗提供基础。

[关键词] 成簇的规律间隔的短回文重复序列; 肿瘤治疗; 基因编辑细胞

[中图分类号] R73-35+4 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1674-0904.2020.06.015

引文格式: Chen Y, Liu ZX, Xiao HT. Advances in the application of CRISPR-Cas9 gene editing technology in tumor cell model [J]. J Cancer Control Treat, 2020, 33(6): 542-548. [陈燕, 刘芷兮, 肖洪涛. CRISPR-Cas9 基因编辑技术用于肿瘤细胞模型的研究进展 [J]. 肿瘤预防与治疗, 2020, 33(6): 542-548.]

Advances in the Application of CRISPR-Cas9 Gene Editing Technology in Tumor Cell Model

Chen Yan, Liu Zhixi, Xiao Hongtao

Department of Pharmacy, Sichuan Cancer Hospital & Institute, Sichuan Cancer Center, School of Medicine, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610041, Sichuan, China (Chen Yan, Liu Zhixi, Xiao Hongtao); Personalized Drug Therapy Key Laboratory of Sichuan Province, Chengdu 610072, Sichuan, China (Xiao Hongtao)

Corresponding author: Xiao Hongtao, E-mail: xht927@163.com

This study was supported by Science and Technology Program of Sichuan Province (NO. 2020JDTD0029, 2020YFS0412), Cadre Health Care Research Project of Sichuan (NO. 2019-801) and Zambon Pharmaceutical Scientific Research Foundation of Chengdu Pharmaceutical Association (NO. 201905).

[Abstract] CRISPR-Cas9 is an adaptive immune system of bacteria and archaea that resists the invasion of foreign genes. Compared with the traditional zincfinger nucleases and transcription activator-like effector nuclease gene editing technologies, CRISPR-Cas9 has the advantages of simple operation, high efficiency and low off-target efficiency. In recent years, this technique has been widely used in the construction of gene editing tumor cells. In this paper, the application of CRISPR-Cas9 in the construction of gene-editing tumor cells were reviewed, aiming to provide theoretical basis for the preclinical study of CRISPR-Cas9.

[Key words] CRISPR; Cancer therapy; Genome-editing cells

[收稿日期] 2019-04-23 **[修回日期]** 2019-10-31

[基金项目] * 四川省科技厅项目 (编号: 20CXTD0043, 2020JDTD0029); 四川省卫健委干部保健科研课题 (编号: 2019-018); 成都市药学会-赞邦药学科科研基金资助课题 (编号: 2019-05)

[通讯作者] [△] 肖洪涛, E-mail: xht927@163.com

成簇的规律间隔的短回文重复序列 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR) 由一系列短的高度保守的正向重复序列与

长度相似的间隔序列排列组成。相关核酸酶 9 (Cas9) 基因编码的蛋白质不仅具有与核酸结合的功能,还具有与核酸酶、聚合酶、解旋酶等酶结合的活性。基于 CRISPR-Cas9 系统的作用原理,研究人员通过体外人工合成引导 RNA (guide RNA, gRNA) 成功实现对特定基因片段的精确靶向与剪切,由此开创了一种由 gRNA 的指导、Cas9 定位于特定的基因序列上对 DNA 双链进行切割的新型基因编辑技术。该项技术与传统的锌指核酸酶 (zincfinger nucleases, ZFNs) 和转录激活样因子效应物核酸酶 (transcription activator-like effector nucleases, TALEN) 基因编辑技术相比,具有编辑效率更高、操作步骤更简单、价格更适宜以及编辑范围更为广泛等优势。

肿瘤的发生与发展是一个由多基因参与的、不同信号通路相互调控与作用的复杂过程。同一基因在不同肿瘤、不同阶段、不同患者中时常发挥着截然不同的生物信息学作用。过去肿瘤的基因组学研究多局限于全基因组关联分析等观察层面上,近年来随着 CRISPR-Cas9 基因编辑技术的深入研究,使得肿瘤治疗从基因治疗层面上取得了较多的应用成果。本文就 CRISPR-Cas9 基因编辑技术在构建肿瘤细胞模型研究与应用中的新进展进行综述,旨在为肿瘤临床前研究提供新的思路和策略。

1 CRISPR-Cas 9 基因编辑技术

1.1 技术简介

CRISPR-Cas 系统在自然界中分为 3 种类型^[1],在基因编辑技术中最常使用的是 II 型 CRISPR-Cas9 系统。该系统包含 3 个核心元件,CRISPR RNA (crRNA)、Cas9 蛋白、反式激活 RNA (trans-activating RNA, tracrRNA)。crRNA 和 tracrRNA 部分互补配对形成一股双链 RNA,再由发挥引导作用的 Cas9 靶向切割目标 DNA,因此该双链 RNA 通常又称为导向 RNA (gRNA)^[1]。Jinek 等^[2]将 CRISPR-Cas9 系统中的双链 gRNA 创造性的改造为单链 gRNA (single guide, sgRNA),极大方便了该技术的应用与拓展,使得该项技术具有同时编辑多个靶点基因的功能。其具体作用原理介绍如下^[3]:sgRNA 可与靶向序列互补配对形成杂交双链,Cas9 识别同时切割靶点的 DNA 双链,形成特异性 DNA 双链断裂。发生断裂的 DNA 双链主要有 2 种修复方式^[4]:一种是非同源末端连接 (non-homologous end joining,

NHEJ),修复不需要同源模板链,利用 NHEJ 修复中碱基的插入或删除可实现基因突变和基因敲除;另一种是同源直接修复,该种修复需同源模板链,可通过基因编辑提供外源性模板以实现基因突变、基因标记以及目的基因插入等。CRISPR-Cas9 系统识别靶位点的关键在于 sgRNA 中与 DNA 互补配对的约 20 个碱基的引导序列。因此针对不同靶向位点,仅需设计相应的引导序列。与 ZFN 和 TALEN 等传统的基因编辑技术相比^[5],该技术具有操作简单、快速且成本低的优点。不仅如此,通过同时设计多个 sgRNA,可靶向编辑全基因组序列多个位点,极大的提高了基因编辑效率。目前 CRISPR-Cas9 技术用于肿瘤细胞模型及动物模型构建,多采用 sgRNA 手段。

1.2 CRISPR-Cas 基因编辑过程

CRISPR-Cas 系统对于外源 DNA 的作用机制分为三个过程^[6](图 1):1)组织编码,即组织编码 Cas 蛋白的基因和 CRISPR 序列,包括重复序列和间隔序列;2)转录与表达,即将新的间隔序列插入 CRISPR 序列中,并由 crRNA 序列进行转录,Cas9 蛋白与加工成熟的 crRNA 进行组装并表达;3)靶向剪切,通过 Cas9 破坏和裂解目标 DNA 或 RNA。具体而言,当外源 DNA 入侵宿主细胞,Cas 蛋白识别并将外源 DNA 整合于宿主的 CRISPR 序列中,生成新的间隔序列,由此形成对外源 DNA 的第一次“记忆”(图 1A)。当该外源 DNA 再次入侵时,该外源 DNA 片段的 CRISPR 基因转录成前 crRNA (pre-crRNA),pre-crRNA 经转录 RNA、Cas 蛋白及 RNA 合成酶 III 的加工、剪切,转变为成熟的短链 crRNA (图 1B)。该成熟的 crRNA 与 tracrRNA 结合形成新的双链 RNA,即 gRNA。gRNA 引导复合体识别外源 DNA 中的前间隔序列临近基序 (protospacer adjacent motif, PAM)。PAM 通常由 NGG 三个碱基构成(N 为任意碱基),并由 Cas9 在 PAM 上游 3 个碱基处进行靶向切割,造成 DNA 或 RNA 的双链断裂(图 1C)。由此,将设计合成的序列通过碱基互补配对的方式,插入到原有的 DNA 或 RNA 中,形成新的 DNR 或 RNA。已有研究表明, tracrRNA 和 crRNA 已被简化成一段大小约 100 个核苷酸的 sgRNA。该 sgRNA 包含位于 5 端 20 个核苷酸的 DNA 互补区、crRNA 以及位于 3 端的 70~80 个核苷酸的 tracrRNA,且该 sgRNA 保留了 DNA 切割序列的特异性。

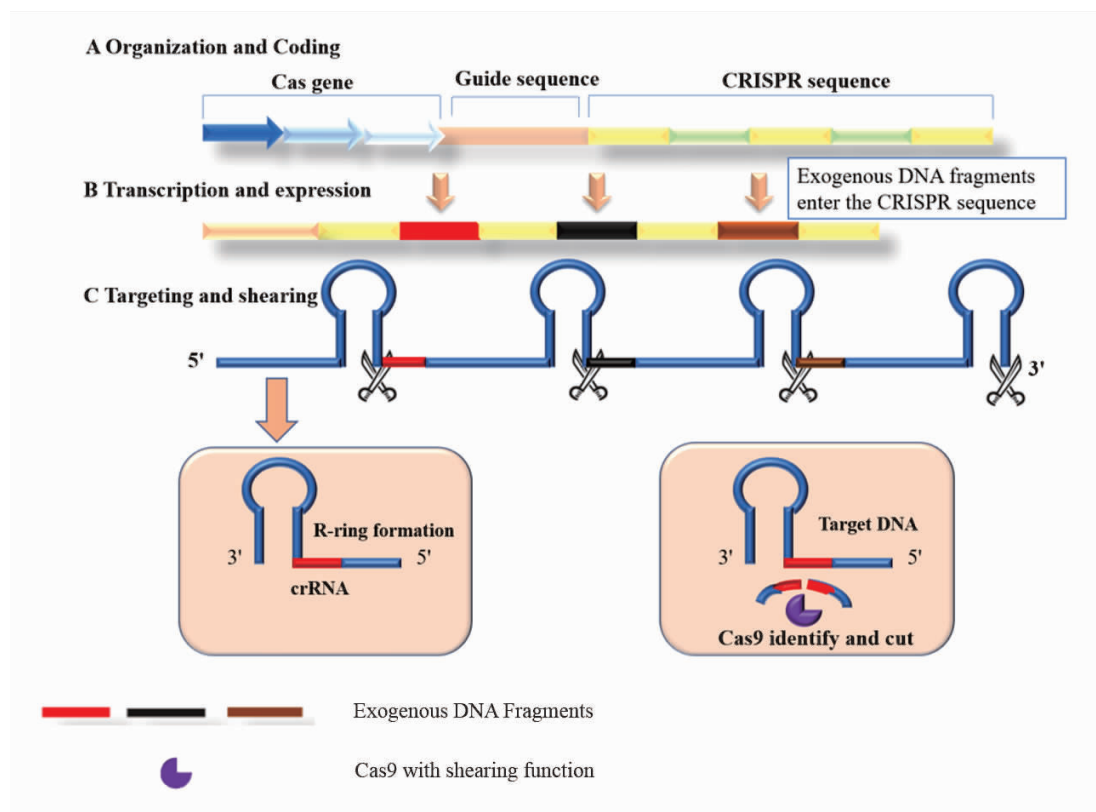


图 1 CRISPR-Cas9 作用机制图

Figure 1. Mechanism of CRISPR-Cas9

2 CRISPR-Cas9 技术在基因编辑肿瘤细胞模型上的应用

CRISPR-Cas9 技术在编辑肿瘤细胞模型上, 根据不同研究目的, 对肿瘤细胞所采取的编辑策略有所不同, 目前肿瘤细胞编辑主要有以下 3 种方式^[6]: 基因敲除、诱导突变和基因插入。通过编辑, 可以建立新的肿瘤细胞模型、检验体外治疗效果、探讨药物作用机制、阐明发病机制。本文将按照 2018 年度全球肿瘤数据中临床肿瘤疾病危害程度及 CRISPR 技术应用于相应肿瘤疾病的报道依次举例阐明^[7]。

2.1 基因编辑肺癌细胞模型

肺癌是我国常见的、发病率和致死率均居首位的恶性肿瘤^[7]。miR-362 是位于人基因组 Xp11.23 位点且在乳腺癌、胃癌、神经母细胞瘤等肿瘤发挥着重要的促癌因子^[8]。罗丹等^[9]为探讨 miR-362 在非小细胞肺癌发生、增殖、转移中的作用机制, 以 pre-miR-362 作为模板设计建立 CRISPR-Cas9 系统, DNA 测序结果表明 CRISPR-Cas9 系统作用后, 在 pre-miR-362 第 53 位和第 54 位核苷酸间插入了长为 161bp 的碱基。插入的碱基对可能对 pre-miRNA 的二级结构产生影响, 进而影响 miR-362 成熟的生

物加工过程, 最终结果导致 miR-362 表达的显著下调。研究以脂质体为质粒递送载体, 将含目标基因的 PX330-MIR362-sgRNA7 质粒和 DONOR-362 质粒共转染至 95-D 细胞, 通过细胞侵袭实验初步证明 miR-362 基因可促进非小细胞肺癌的迁移和侵袭。该研究利用 CRISPR-Cas9 技术验证 miR-362 基因在肺癌细胞模型上的作用机制, 为肺癌的治疗提供一个新的治疗靶点。

2.2 基因编辑乳腺癌细胞模型

乳腺癌是发生在乳腺上皮组织的恶性肿瘤。BECN1 基因被报道是乳腺癌治疗中单倍体不足模型的癌基因^[10-11]。Wu 等^[12]选择 BECN1 TSS 下游的 3 个 G (N19) NGG 序列 (B432, GTCCAACAA-CAGCACCATGCAGG; B497, GGACACGAGTTTCAA GATCCTGG; B525, GTCACCATCCAGGAACCTCACAG G) 作为潜在靶位点, 以 CRISPR-Cas9 同源重组途径将 BECN1 基因外显子 2 在三阴性乳腺癌细胞株 (MDA-MB-231) 进行敲除。同时构建 B432、B497 和 B525 sgRNA 慢病毒质粒, 分别以引物对为模板, 分别进行 PCR 扩增。以 CRISPR-Cas9 从人源上皮乳腺癌细胞株 BT-474、人源胚胎肾细胞 239T 和 293A 3 株细胞株筛选出 BECN1 基因敲除稳定表达型细胞株。通过体外细胞药理学考察敲除 BECN1 基因

的 MDA-MB-231 细胞在体外细胞增殖、菌落形成能力上与野生型细胞相比显著降低($P < 0.05$),且其作用机理为通过部分影响上皮间充质转化信号通路,从而降低 MDA-MB-231 细胞增殖与侵袭功能。在 *BECN1* 基因敲除 BT-474、239T、293A 稳定表达细胞株中发现,敲除细胞株在 G_0/G_1 期积累较多,而在细胞周期 S 期和 G_2/M 期细胞比例降低。研究者 Wu 的结果与 Li 报道^[13]的在宫颈癌 Hela 细胞株上敲除 *BECN1* 的结果相反;Li 等研究结果表明 *BECN1* 敲除后,大部分 Hela 细胞积累在细胞周期 G_1/S 期。因 *BECN1* 是染色体的聚集和外着丝点的聚集是必不可少的重要因素,其缺失通常将导致细胞分裂异常和基因组不稳定。因此,在不同细胞株上进行 *BECN1* 基因的敲除,将对细胞周期产生不同的影响。以上研究提示,CRISPR-Cas9 技术靶向敲除高危性乳腺癌相关癌基因,可为乳腺癌发病机理及治疗方案提供技术支持。

2.3 基因编辑肝癌细胞模型

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是目前世界范围内第三大癌症相关死亡原因^[13]。由于大多数 HCC 被诊断出来已是晚期,因此包括手术在内的传统治疗策略在控制或延长 HCC 生存期方面通常无效^[14]。目前,基因治疗和免疫治疗^[15]成为 HCC 治疗的前沿并取得了一定的进展。Liu 等^[16]利用 CRISPR-Cas9 基因组编辑技术在人肝癌 SMMC-7721 细胞上进行低氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor 1-alpha, HIF-1 α) 外显子 1 的敲除,结果显示, *HIF-1 α* 基因敲除的 SMMC-7721 细胞其侵袭性和迁移性显著降低,且以 $CoCl_2$ 模拟缺氧条件下可增加诱导细胞凋亡率。以上发现证实 CRISPR-Cas9 介导的 *HIF-1 α* 基因敲除可能是一种有效的治疗肝癌的手段。

2.4 基因编辑宫颈癌细胞模型

最新研究表明,全球每年报告的新发宫颈癌病例超过 5 000 万例,且宫颈癌的发病率有年轻化趋势^[17]。人乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 是宫颈癌高危致病因素, HPV16 型 HPV 能将其自身的 DNA 传递到宿主细胞染色体中,这使得该型 HPV 病毒在宫颈癌患者中更难以清除^[18]。在 HPV 基因中, *E6* 和 *E7* 基因可以整合到宿主细胞染色体中,因此具有重要的研究意义^[19]。Cheng 等^[20]通过 CRISPR-Cas9 系统定位 HPV16 型 *E6* 基因中 T1 位点,在其启动子上设计替换以实现敲除 *E6* 基因,以考察 *E6* 基因在宫颈癌 SiHa 细胞中的作用。

同时构建 HPV16 型假病毒质粒、Cas9 质粒、*E6-gRNA* 质粒并将其分别转入 293TF 细胞,确定表达后,将 HPV16-*E6gRNA*-RFP (含红色荧光的携带 HPV16 假病毒- *E6gRNA* 质粒)、Cas9-EGFP (含绿色荧光的-Cas9 质粒) 及 p16sheLL (HPV16 L1/L2 结构蛋白表达质粒) 以慢病毒为载体分别转入 SiHa 细胞,结果显示, HPV16-*E6gRNA*-RFP 的 mRNA 和蛋白表达水平均下调,提示 HPV16 假病毒确实具有递送 CRISPR-Cas9 质粒以及 CRISPR-Cas9 系统可准确定位敲除 *E6* 基因的作用。该研究后期,将野生型 SiHa 细胞接种于裸鼠皮下,并以 HPV16 假病毒为载体将 Cas9 + *E6-gRNA* 质粒、Cas9 质粒、*E6-gRNA* 质粒注入小鼠体内,结果表明以 HPV 伪型病毒介导的 CRISPR-Cas9 系统在抑制人乳头状瘤病毒 *E6* 基因和治疗子宫颈癌的具有显著作用。

2.5 基因编辑胰腺癌细胞模型

胰腺导管腺癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) 是一种恶性程度较高的肿瘤^[21],统计数据表明,到 2030 年它将成为癌症相关死亡的第二大原因^[22]。基因突变和黏液型 O-糖基化 (O-glycosylation) 模式的异常变化是 PDAC 诊断与治疗的重要指征之一,而糖蛋白 N-乙酰半乳糖胺 3-半乳糖基转移酶 1 (glycoprotein-N-acetylgalactosamine 3-beta-galactosyltransferase 1, C1GALT1) 抑癌基因失活将导致 O-glycosylation 的过表达^[23]。因此为考察 O-glycosylation 与 PDAC 的发展和进展的内在机制, Chugh 等^[24]通过 CRISPR-Cas9 靶向 C1GALT1 抑癌基因启动子,对启动子进行敲除,以构建 C1GALT1 敲除型胰腺导管腺癌细胞株 (T3M4 和 CD18/HPAF)。通过体外细胞试验证实, C1GALT1 敲除将导致 PDAC 的发生和转移的基因表达量增加。由此,以 CRISPR-Cas9 构建癌基因敲除型 PDAC 细胞,并结合基因编辑小鼠融合试验可为 PDAC 的治疗提供一个全新的治疗思路。

2.6 基因编辑甲状腺癌细胞模型

甲状腺再分化癌 (anaplastic carcinoma of the thyroid, ATC), 又称未分化甲状腺癌,是所有甲状腺肿瘤中最不常见但最具侵袭性和致死性的甲状腺恶性肿瘤^[25]。研究表明,对放射性碘有耐药性的 ATC 患者目前没有有效的治疗方案^[26]。Huang 等^[27]从肿瘤细胞库 [Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE-<https://cancergenome.nih.gov/>)] 中筛选出 1 036 例肿瘤患者,并从癌症基因组图谱 [Cancer Genome Atlas (TCGA-<https://cancergenome.nih.gov/>)] 中收

集 8 215 个肿瘤基因,经筛选比较发现,表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)在甲状腺癌中的表达量明显高于其他类型的癌症。课题组利用 CRISPR-Cas9 靶向 EGFR 外显子 9,将携带有编码 EGFR 的 sgRNA 慢病毒转染进甲状腺癌 SW579 细胞株中。通过基因插入的方式,编辑成具有高表达 EGFR 能力的 SW579 细胞株。以美国食品药品监督管理局批准的用于靶向 EGFR 的阿法替尼作为阳性药物,考察其对 EGFR 阳性的 SW579 细胞生长情况的影响,结果表明 EGFR 阳性的 SW579 对阿法替尼的治疗更加灵敏。且该研究证实使用 CRISPR-Cas9 系统编辑的 EGFR sgRNA 无脱靶效应。该研究以 CRISPR-Cas9 基因组编辑术,将 EGFR 基因插入 ATC 细胞株,提高靶向 EGFR 小分子靶向药物治疗敏感性,并阐释药物作用机制。

2.7 基因编辑髓系肿瘤细胞模型

髓系恶性肿瘤包括骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndrome, MDS)、急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)、骨髓纤维化和慢性髓单胞白血病^[28]。ASXL1 癌基因参与细胞的表观遗传和调控^[29],且该基因的突变在 MDS、AML、骨髓纤维化和慢性髓单胞白血病中较为常见^[30]。鉴于此, Wu 等^[31]利用 CRISPR-Cas9 基因组编辑技术,靶向癌基因 ASXL1 外显子 5-10,构建 ASXL1 基因突变型 U937 细胞系。通过与野生型 U937 细胞相比, ASXL1 突变型细胞在细胞生长和细胞周期中并无明显差异,但在单核细胞/巨噬细胞分化中表现出明显缺陷,其分化缺陷机制与细胞色素 b-245 β 链和 c 型凝集素家族 5 成员 A 的改变有关。以上研究提示以 CRISPR-Cas9 构建的突变型白血病细胞,可为阐明诱导白血病发生的潜在分子机制研究提供一定的支持。

2.8 基因编辑恶性胸膜间皮瘤(malignant pleural mesothelioma, MPM)细胞模型

MPM 是一种起源于胸膜间皮细胞的侵袭性肿瘤,其发生于与石棉接触有关^[32]。由于缺乏早期诊断方法和药物治疗,目前临床上罹患 MPM 的患者

急需找到一种有效的治疗手段^[33]。NF2 是一种抑癌基因,其在 MPM 中被证实突变发生率较高^[34]。Wahiduzzaman 课题组^[35]利用 CRISPR-Cas9 系统,构建了敲除 NF2 外显子 8 的人内皮细胞 MeT-5A 细胞模型。在 NF2 敲除细胞系中,细胞生长、克隆、迁移活性与野生型(NF2-WT)细胞株相比,其侵袭活性明显降低。且在 NF2-敲除细胞系中成纤维细胞生长上调因子受体 2(fibroblast growth factor receptor2, FGFR2)随 JNK、c-Jun 和视网膜母细胞瘤中磷酸化水平增加而增加;而以上水平的增加可随外源性增加 NF2 表达而降低。由此提示 NF2 基因缺失可能通过介导 FGFR2 表达缺失,从而在人胸膜内皮中肿瘤的发生中发挥作用。以上研究表明,通过 CRISPR-Cas9 系统设计靶向 FGFR2 的 sgRNA 可作为治疗 NF2 抑癌基因缺失型 MPM 的一个候选治疗方案。

2.9 基因编辑骨肉瘤细胞模型

骨肉瘤是最常见的原发性骨恶性肿瘤,其在青春期的发病率较高^[36]。骨肉瘤的标准治疗方案包括手术切除原发性病灶及肺损害联合多药化疗方案,其中多药化疗耐药率较高^[37]。分化簇 44(cluster of differentiation 44, CD44)癌基因是透明质酸(hyaluronic acid, HA)的受体,通过与 HA 结合参与骨肉瘤的进展、转移^[38]。Zheng 等^[39]通过收集 56 例骨肉瘤患者的 96 份骨肉瘤组织,对其进行 CD44 表达的检测,以评价骨肉瘤组织的 CD44 平均表达水平。以 CRISPR-Cas9 系统特异性敲除骨肉瘤耐药细胞系(KHOSR2 和 U-2OSR2)中的 CD44 外显子 1。通过与非敲除型耐药株相比,敲除 CD44 基因后,耐药株的迁移和侵袭活性受到了显著抑制,且敲除该基因可提高化疗药物治疗敏感性。该发现证实 CRISPR-Cas9 系统敲除 CD44 基因的策略,可为改善骨肉瘤耐药提供一种新的治疗策略。

利用 CRISPR-Cas9 技术在前列腺癌^[40]、鼻咽癌^[41]、结直肠癌^[42]、肾癌^[43]等肿瘤中构建基因编辑细胞均有所报道。本文将 CRISPR-Cas9 在不同肿瘤细胞模型中的研究归纳见表 1。

Table 1. Research and Application of CRISPR-Cas9 in Different Tumor Cell Models

Tumor cell model			Application and research of CRISPR in tumor cells
Lung	cancer	cell model	Inserting a base between the 53th and 54th nucleotides of miR-362 down-regulates miR-362 expression. Invasion experiments preliminarily prove that <i>miR-362</i> gene can promote the migration and invasion of non-small cell lung cancer.
Breast	cancer	cell model	CRISPR-Cas9 targeted knockout of <i>BECN1</i> gene of MDA-MB-231 high-risk breast cancer cells. MDA-MB-231 cells have significantly lower cell proliferation and colony forming ability in vitro than wild-type cells.

(Table 1 continues on next page)

(Continued from previous page)

Tumor cell model	Application and research of CRISPR in tumor cells
Liver cancer cell model	CRISPR-Cas9 technology knocks out exon 1 of hypoxia inducible factor -1 α on human liver cancer SMMC-7721 cells. the knocked-out SMMC-7721 cells have significantly reduced invasiveness and mobility, and CoCl ₂ can increase the rate of induced cell apoptosis under simulated hypoxia conditions.
Cervical cancer cell model	The T1 site in HPV16 <i>E6</i> gene was located by CRISPR-Cas9 system, and the replacement was designed on its promoter to knock out <i>E6</i> gene. The results show that CRISPR-Cas9 system mediated by HPV pseudotype virus has significant effect on inhibiting human papillomavirus <i>E6</i> gene and treating cervical cancer.
Pancreatic cancer cell model	The promoter of C1GALT1 tumor suppressor gene was targeted by CRISPR-Cas9 and knocked out to construct C1GALT1 knocked-out pancreatic ductal adenocarcinoma cell lines (T3M4 and CD18/HPAF). In vitro cell tests confirmed that C1GALT1 knockout will lead to increased gene expression of PDAC generation and transfer.
Thyroid cancer cell model	By using CRISPR-Cas9 genome editing, <i>EGFR</i> gene is inserted into ATC cell line to improve the sensitivity of targeted EGFR small molecule targeted drug therapy and explain the mechanism of drug action.
Myeloid tumor cell model	By using CRISPR-Cas9 genome editing technology, the <i>ASXL1</i> gene mutant U937 cell line was constructed by targeting exon 5-10 of <i>ASXL1</i> oncogene. Compared with wild-type U937 cells, it shows obvious defects in monocyte/macrophage differentiation. The mechanism of differentiation defects is related to the changes of cytochrome b-245 β chain and C-type lectin domain family 5 member A.
Malignant Mesothelioma Cell Model	By using CRISPR-Cas9 system, a MeT-5A cell model of human endothelial cells with <i>NF2</i> exon 8 knocked out was constructed. In NF2 knockout cell lines, their invasive activity is significantly lower than that of wild-type cell lines. In NF2- knockout cell lines, fibroblast growth up-regulating factor receptor 2 increases with increasing phosphorylation levels in JNK, c-Jun and retinoblastoma. However, the increase of the above level can be decreased with the exogenous increase of NF2 expression.
Osteosarcoma cell model	Exon 1 of <i>CD44</i> in osteosarcoma drug-resistant cell lines (KHOSR2 and U-2OSR2) was specifically knocked out by CRISPR-Cas9 system. Compared with non-knock-out drug-resistant strains, after knocking out <i>CD44</i> gene, the migration and invasion activity of drug-resistant strains are significantly inhibited, and knocking out the gene can improve the therapeutic sensitivity of chemotherapy drugs.

3 展 望

CRISPR-Cas9 是细菌的适应性防御系统,通过 RNA 介导,可实现特异性地切割外源遗传物质的功能。目前,CRISPR-Cas9 技术除在构建基因模型细胞模型上取得了一定的成绩,在肿瘤免疫临床治疗及改善肿瘤药物耐药等相关研究方面亦获得了一定认可。但 CRISPR-Cas9 技术仍存在脱靶现象。由于 Cas9 蛋白能接受的 sgRNA 与基因组 DNA 的不完全匹配,导致细胞中的 Cas9 蛋白浓度越高,脱靶现象越严重。目前已有许多学者致力于该项技术的改进。随着 CRISPR-Cas9 基因编辑技术的完善,其可为研究基因功能的缺失、突变等与肿瘤表型的相关性、肿瘤基因致癌机理及肿瘤抑癌基因的研究、肿瘤的基因治疗等提供新的方向与策略。

作者声明:本文全部作者对于研究和撰写的论文出现的不端行为承担相应责任;并承诺论文中涉及的原始图片、数据资料等已按照有关规定保存,可接受核查。

学术不端:本文在初审、返修及出版前均通过中国知网(CNKI)科技期刊学术不端文献检测系统的学术不端检测。

同行评议:经同行专家双盲外审,达到刊发要求。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

文章版权:本文出版前已与全体作者签署了论文授权书等协议。

[参考文献]

- [1] Sánchez-Rivera FJ. Applications of the CRISPR-Cas9 system in cancer biology. *Nat Rev Cancer*, 2015,15 :387-395.
- [2] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. *Science*, 2012, 337(6096) :816-821.
- [3] 姜舒畅,施明,彭晖. CRISPR/Cas9 基因编辑技术在肿瘤耐药研究中的应用进展 [J]. *国际药学研究杂志*, 2017, 44 (04) : 299-305.
- [4] Janssen JM, Chen X, Liu J. The chromatin structure of CRISPR-Cas9 target DNA controls the balance between mutagenic and homology-directed gene-editing events [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 16 :141-154.
- [5] Shah SZ, Rehman A, Nasir H, et al. Advances in research on genome editing Crispr-Cas9 technology [J]. *JAMC*, 2019, 31(1) : 108-122.
- [6] Lee J, Jung MH, Jeong E. Using sniper-Cas9 to minimize off-target effects of CRISPR-Cas9 without the loss of on-target activity via directed evolution [J]. *J Visualized Experiments*, 2019, (144) : e59202.
- [7] 龚娇芳,胡娟,鲁兵,等. miR-199a-3p 通过调控 CBX7 对肺癌细胞 A549 侵袭与迁移的影响 [J]. *肿瘤预防与治疗*, 2019, 32 (09) :764-772.
- [8] Zheng X, Jia W, Ayub Abdulle, et al. Targeting CD44 by CRISPR-Cas9 in multidrug resistant osteosarcoma cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 51(4) :1879-1893.
- [9] 罗丹,王莉娟,孙秀璇,等. 应用 CRISPR/Cas9 技术构建

- miR-362 敲除的 95-D 肺癌细胞株[J]. 中国生物工程杂志, 2017, 37(11): 94-100.
- [10] Rezuchova I, Hudecova S, Soltysova A, et al. Type 3 inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor has antiapoptotic and proliferative role in cancer cells[J]. Cell Death Disease, 2019, 10(3): 186.
- [11] Liang XH, Jackson S, Seaman M, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1[J]. Nature, 1999, 402: 672-676.
- [12] Wu CL, Zhang SM, Lin L, et al. BECN1-knockout impairs tumor growth, migration and invasion by suppressing the cell cycle and partially suppressing the epithelial-mesenchymal transition of human triple-negative breast cancer cells[J]. Int J Oncol, 2018, 53(3): 1301-1312.
- [13] Li Z, Ji X, Wang D, Liu J, et al. Autophagic flux is highly active in early mitosis and differentially regulated throughout the cell cycle[J]. Oncotarget, 2016, 7: 39705-39718.
- [14] Frémont S, Gérard A, Galloux M, et al. Beclin-1 is required for chromosome congression and proper outer kinetochore assembly[J]. EMBO Rep, 2013, 14: 364-372.
- [15] Jabbour, E, Kantarjian, H. Chronic myeloid leukemia: 2016 update on diagnosis, therapy, and monitoring[J]. Am J Hematol, 2016, 91(2): 252-265.
- [16] Liu Q, Fan D, Adah D, et al. CRISPR/Cas9 mediated hypoxia inducible factor1 α knockout enhances the antitumor effect of transarterial embolization in hepatocellular carcinoma[J]. Oncology Rep, 2018, 40(5): 2547-2557.
- [17] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016 [J]. Cancer J Clin, 2016, 66(1): 7-30.
- [18] Hartke J, Johnson M. The diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma[J]. Semin Diagn Pathol, 2017, 34(2): 153-159.
- [19] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [20] Cheng YX, Chen GT, Yang X, et al. Effects of HPV pseudotype virus in cutting E6 gene selectively in SiHa cells[J]. Current Medical Sci, 2018, 38(2): 212-221.
- [21] Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, et al. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: The unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States[J]. Cancer Res, 2014, 74(11): 2913-2921.
- [22] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017[J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(1): 7-30.
- [23] Bergstrom K, Liu X, Zhao Y, et al. Defective intestinal mucin-type O-glycosylation causes spontaneous colitis-associated cancer in mice [J]. Gastroenterology, 2016, 151(1): 152-164. e11.
- [24] Chugh S, Barkeer S, Rachagani S, et al. Disruption of C1galT1 gene promotes development and metastasis of pancreatic adenocarcinomas in mice [J]. Gastroenterology, 2018, 155(5): 1608-1624.
- [25] Spartalis E, Athanasiadis DI, Chrysikos D, et al. Histone deacetylase inhibitors and anaplastic thyroid carcinoma[J]. Anti-cancer Research, 2019, 39(3): 1119-1127.
- [26] Molinaro E, Romei C, Biagini A, et al. Anaplastic thyroid carcinoma: from clinicopathology to genetics and advanced therapies [J]. Nat Rev Endocrinol, 2017, 13(11): 644-660.
- [27] Huang LC, Tam KW, Liu WN, et al. CRISPR/Cas9 genome editing of epidermal growth factor receptor sufficiently abolished oncogenicity in anaplastic thyroid cancer [J]. Disease Markers, 2018, 2018(1): 14.
- [28] Alvarez Argote J. ASXL1 mutations in myeloid neoplasms: pathogenetic considerations, impact on clinical outcomes and survival [J]. Curr Med Res Opin, 2018, 34(5): 757-763.
- [29] Functional and cancer genomics of ASXL family members[J]. British J Cancer, 2013, 109(2): 299-306.
- [30] Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes[J]. N. Engl. J. Med., 2011, 364(26): 2496-2506.
- [31] Wu ZJ, Zhao X, Banaszak LG, et al. CRISPR/Cas9-mediated ASXL1 mutations in U937 cells disrupt myeloid differentiation [J]. Int J Oncol, 2018, 52(4): 1209-1223.
- [32] Bolognesi C, Martini F, Tognon M, et al. A molecular epidemiology case control study on pleural malignant mesothelioma[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2005, 14(7): 1741-1746.
- [33] Patel SC, Dowell JE. Modern management of malignant pleural mesothelioma[J]. Lung Cancer, 2016, 7: 63-72.
- [34] Wahiduzzaman M, Karan S, Ota A, et al. Establishment and characterization of CRISPR/Cas9-mediated NF2-/- human mesothelial cell line: Molecular insight into fibroblast growth factor receptor 2 in malignant pleural mesothelioma [J]. Cancer Sci, 2018, 110(1): 180-193.
- [35] Wahiduzzaman M, Sivasundaram K, Akinobu O, et al. Establishment and characterization of CRISPR/Cas9-mediated NF2-/- human mesothelial cell line: Molecular insight into fibroblast growth factor receptor 2 in malignant pleural mesothelioma[J]. Cancer Sci, 2018, 1-14. DOI: 10.1111/cas.13871
- [36] 吴进, 刘庆军, 曾文容, 等. 沉默 Ether à go-go 1 基因调控 VEGF/PI3K/AKT 抑制骨肉瘤增殖和血管生成的研究[J]. 肿瘤预防与治疗, 2016, 29(4): 193-198.
- [37] Simpson, Siobhan, de Brot S, et al. Comparative review of human and canine osteosarcoma: Morphology, epidemiology, prognosis, treatment and genetics[J]. Acta Vet Scand. 2017, 59(1): 71.
- [38] Gao Y, Feng Y, Shen JK, et al. CD44 is a direct target of miR-199a-3p and contributes to aggressive progression in osteosarcoma [J]. Sci Rep, 2015, 5: 11365.
- [39] Zheng X, Jia W, Ayub Abdulle, et al. Targeting CD44 by CRISPR-Cas9 in multidrug resistant osteosarcoma cells[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 51(4): 1879-1893.
- [40] 吴萍. CRISPR/Cas9 敲除 BLM 解旋酶基因对前列腺癌细胞增殖的影响[D]. 贵阳: 贵州大学, 2017.
- [41] 王思思, 廖晓敏, 邵钟铭, 等. 基于 CRISPR/Cas9 技术构建 SETD2 基因敲除鼻咽癌细胞株并分析其增殖特性[J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(12): 2172-2179.
- [42] 沈伟男, 谢阳阳, 范晓翔, 等. CRISPR/Cas9 基因编辑系统在结肠癌中的应用进展[J]. 医学综述, 2018, 24(24): 4852-4857.
- [43] Roy A, Goodman JH, Begum G, et al. Generation of WNK1 knockout cell lines by CRISPR/Cas-mediated genome editing[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2015, 308(4): F366-376.