DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20200714.001
网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1049.R.20200714.0827.002.html

CRISPR-Cas9技术在肿瘤耐药基因筛选中的研究进展

张 洁,杨 谭,卢永刚✉
(广西壮族自治区柳州市柳铁中心医院药剂科,广西 柳州 545007)

[摘要] 耐药是使用肿瘤分子靶向药物治疗肿瘤面临的主要问题,目前筛选耐药基因常用策略主要为功能性基因筛选。近年来,CRISPR-Cas9基因编辑技术因具有精准、简便、高效的特点,在肿瘤相关基因的功能学研究中被广泛应用。本文就CRISPR-Cas9文库筛选技术的原理和在功能性基因筛选方面的应用进行了综述,同时对该技术的应用前景进行了展望。

[关键词] CRISPR-Cas9技术;功能基因;筛选
[中图分类号] R730.5 [文献标识码] A [文章编号] 1007-1237(2021)11-0878-04

Application of CRISPR-Cas9 technology in the screening of tumor resistance genes: A review

ZHANG Jie, YANG Tan, LU Yong-gang✉
(*Liuzhou Municipal Liutie Central Hospital*, *Liuzhou* 545007, *China*)

[*Foundation Project*]: *This study is supported by the Science and Technology Project of Liuzhou* (2019*BJ*10612)
[*Author*]: *ZHANG Jie* (1978-), *Female*, *M.M.*, *Associate Chief Physician*, *E-mail*: 157204473@qq.com.
[*Correspondence to*]: *LU Yong-gang* (1970-), *Male*, *M.D.*, *E-mail*: *luyonggang*407@163.com.
Received: 2020-03-10 *Revised*: 2020-06-09 *JHMU*, 2021;27(11):872-875

View from specialist: It is creative, an d of certain scientific and educational value.

[ABSTRACT] Drug resistance is a major problem when using molecular targeted drugs for tumors. Currently, functional gene screening is the most common strategy for screening drug resistance genes. In recent years, CRISPR-Cas9 gene-editing technology has been widely used in functional studies on tumor-related genes because of its high accuracy, simplicity, and efficiency. In this paper, the principle of CRISPR-Cas9 library screening technology and its application in functional gene screening are reviewed. At the same time, the application prospect of the CRISPR-Cas9 technology is forecasted.

[KEYWORDS] CRISPR-Cas9 technology; Functional genes; Screening

癌症是临床上常见的恶性肿瘤,进展快、死亡率高,给患者身心及经济上带来了巨大损害。肿瘤分子靶向药物的出现将癌症的治疗推向了一个前所未有的阶段。使用肿瘤分子靶向药物治疗肿瘤面临的最主要问题就是耐药,一些分子靶向药物可能同时具有多种耐药机制。靶向药物耐药的主要机制包括微环境的改变、基因突变、建立代偿信号通路、存在肿瘤异质性以及肿瘤对靶向药产生耐受性等。近年来,高通量功能性筛选技术为肿瘤研究提供了精准的基因学信息。而CRISPR-Cas9文库筛选技术是一种精准、简便、高效的基因编辑工具,为肿瘤相关耐药基因的功能学研究提供了新方法、新思路[1]。本文总结了CRISPR-Cas9文库筛选技术在肿瘤耐药基因筛选中的研究进展。

1 耐药基因筛选的现状

筛选耐药基因当前常用策略主要分为两种,即功能缺失型筛选及功能获得型筛选。RNA干扰(RNA interference, RNAi)在真核细胞中广泛存在,已广泛应用于功能性缺失基因的高通量筛选[2]。与cDNA文库相比,RNAi文库筛选虽具有简单、高

[基金项目] 柳州市科技计划项目(2019BJ10612)
[作者简介] 张洁(1978-),女,硕士,副主任医师,E-mail:157204473@qq.com。
[通讯作者] 卢永刚(1970-),男,医学博士,E-mail:luyonggang407@163.com。
[收稿日期] 2020-03-10 [修回日期] 2020-06-09 网络出版时间:2020-07-14 10:35:41

效、高通量的优点，但仍存在一些问题[3]。无论是使用cDNA文库还是RNAi文库进行耐药基因筛选都不够精准。因此，寻找新的筛选工具对肿瘤耐药基因的发现及研究有着重要的意义。

2 CRISPR-Cas9的生物学特性

CRISPR-Cas是细菌和古细菌在长期演化过程中为了对抗入侵的病毒及外源DNA进化形成的一种适应性免疫防御[4]。CRISPR-Cas于1987年被首次发现，其强大的剪切编辑功能在2010年被研究清楚，从而被广泛应用于生物学研究[5]。CRISPR/Cas9系统能识别出入侵者的原间隔序列并记录到CRISPR序列中。当剪切基因时，crRNA首先被转录成pre-crRNA。特异性RNA核酸酶和活化的cas9对pre-crRNA进行加工[6]。CRISPR-Cas9系统通过与目标序列互补配对，引导Cas9定位于目标基因，在PAM上游约3 bp处进行DNA双链切割[7]。当没有修复模板时，将通过非同源末端连接将DSBs重新连接，这样容易产生插入或突变缺失，导致基因功能丧失[6]。

CRISPR-Cas9技术可以根据不同实验的需要进行更加精细的调整[7]。全基因组的CRISPR筛选几乎可以应用于任何细胞系和遗传背景下的基因筛选，如*KRAS*、*EGFR*、*ALK*突变或其他人类肿瘤细胞系。其他递送方法，如原位移植或静脉注射，有助于鉴别那些参与肿瘤血管形成和外渗的过程[8]。

近年来，CRISP-Cas9系统已经成功应用于人类、小鼠、鱼、果蝇、酵母、烟草、番茄、水稻、大豆、玉米、小麦等多个物种细胞的基因编辑，科学家们利用CRISPR-Cas9技术开始进行功能性的基因筛选。CRISPR-Cas9技术在基因编辑中具有一定优越性，可采用诱导基因突变方式进行功能缺失型筛选，更加高效、精准；敲除效率高，具有更广泛的作用位点及较低的脱靶效率。CRISPR-Cas9基因敲除可用于大部分的基因修饰研究，而且操作相对简单，可以在普通实验室进行，将会在定向编辑研究中带来突破性的发展[9]。

3 CRISPR-Cas9在肿瘤耐药中的应用

3.1 CRISPR-Cas9在肝癌耐药中的应用进展

通过全基因组CRISPR-Cas9文库筛选，研究者已经筛选出在肝癌发生、发展中的抑癌基因*ADAMTSL3*、*PTEN*[10]，以及促癌基因*NSD1*、*NCAPG*[11,12]，这证明了CRISPR-Cas9文库筛选在肝癌耐药基因筛选中的可行性。索拉非尼是晚期肝细胞癌（hepatocellular carcinoma，HCC）的标准治疗方法，然而肿瘤细胞可表现出对索拉非尼的原发性或继发性耐药。Wei等[13]通过使用全基因组CRISPR-Cas9文库筛选，发现磷酸甘油酸脱氢酶（phosphoglycerate dehydrogenase，PHGDH）是索拉非尼耐药的关键驱动因素。索拉非尼治疗后PHGDH失活会升高活性氧（reactive oxygen species ROS）水平并诱导HCC凋亡。PHGDH抑制剂NCT-503的治疗与索拉非尼有协同作用，可消除体内HCC的生长，因此，靶向PHGDH是克服HCC耐药性的有效方法。使用同样的方法，Cai等[14]在人类Huh7细胞中发现LRP8是驱动HCC细胞获得索拉非尼耐药的关键基因，LRP8通过激活β-catenin，增强了其对索拉非尼的耐药性。Zheng等[15]通过基于模型的全基因组CRISP/Cas9敲除（MAGeCK）分析，*KEAP1*被确定索拉非尼耐药性和/或HCC细胞敏感性相关的非突变机制的必需基因。*KEAP1*失活后，KEAP1/Nrf2通路的失控通过上调Nrf2下游基因和降低ROS水平导致治疗HCC的索拉非尼、乐伐替尼和雷戈非尼耐药。此外，通过该方法还筛选出对索拉非尼耐药的关键基因*SGOL1*[16]。

3.2 CRISPR-Cas9在肺癌耐药中的应用进展

化学疗法作为单独或与手术和放疗结合使用的全身疗法，旨在阻止癌细胞的增殖、侵袭和转移，并最终诱导癌细胞死亡。目前，癌细胞的耐药性已成为影响化疗疗效的主要原因。编辑耐药基因可提高化疗疗效和疗效。目前，CRISPR-Cas9已被用于研究与肺癌药物敏感性和耐药性有关的基因，如顺铂、卡铂和紫杉醇等，为提高化疗对肺癌的治疗效果提供了理论基础。在H460和H1299细胞中，将*RSF1*基因与紫杉醇联合敲除会导致G_1的细胞周期停滞，同时抑制细胞迁移和增殖；在使用H460细胞的异种移植小鼠肺癌模型中，与野生型相比，敲除RSF1显着提高了对紫杉醇的敏感性，降低了移植肿瘤的重量（$P<0.01$）和体积（$P<0.05$）[17]。在另一项使用肺癌异种移植小鼠模型的研究中，CRISPR-Cas9在A549细胞中敲除了*NRF2*基因，发现相对于野生型动物，肿瘤细胞对顺铂和卡铂敏感，移植瘤的体积明显降低[18]。在NSCLC细胞系中，CRISPR-Cas9敲除极光B（AURKB）导致肿瘤的恢复，抑癌基因*TP53*的表达，恢复了对顺铂和紫杉醇的敏感性[19]。另一项研究表明，CRISPR-Cas9敲除ERCC1会使癌细胞对顺铂高度敏感[20]。肺癌对化疗药物耐药性的研究为提高药物敏感性和降低或消除肺癌对化疗药物的耐药性提供了科学依据。

3.3　CRISPR-Cas9在乳腺癌耐药中的进展

雌激素受体(estrogen receptor,ER)和人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2 HER2)突变在乳腺癌治疗耐药中作用关键,CRISPR-Cas9系统可用于靶向乳腺癌患者的ER或HER2突变体。sgRNA被设计为靶向ER或HER2突变外显子中的特定序列,以修复突变,消除致癌突变。同时,CRISPR-Cas9还可以破坏ER或HER2的特定功能域,使癌细胞失去了获得性耐药性[21,22]。使用CRISPR-Cas9技术使得两种三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer,TNBC)细胞系MDA-MB-231(野生型)和MDA-MB-436(BRCA1 m)产生缺陷,可使TNBC细胞对3种代表性的化学治疗乳腺癌药物阿霉素、吉西他滨和多西他赛更加敏感[23]。使用同样的细胞系,使用CRISPR-Cas9进行*CXCR4*或*CXCR7*基因的单敲除后,可显著抑制TNBC细胞的恶性进展,用于乳腺癌治疗耐药靶标[24]。总之,CRISPR- Cas9系统可恢复耐药基因突变并确定耐药性乳腺癌的潜在耐药靶标。CRISPR-Cas9系统有望在预防乳腺癌治疗耐药中发挥重要作用,成为个性化医学的重要工具[25]。

3.4　CRISPR-Cas9在其它疾病耐药中的应用

CRISPR-Cas9文库早期经常应用于药物作用基因筛选。Shalem等[26]设计了CRISPR-Cas9基因敲除文库,并命名为GeCKO(Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout)文库。加入vemurafenib抑制A375细胞的生长,进而富集少数具有vemurafenib抗性的细胞,其中*nf2*、*cul3*、*tada2b*和*tada1*与vemurafenib抗性无关。这些候选基因为vemurafenib肿瘤的耐药机制提供了新的假说。研究者还证明了CRISPR-Cas9用于耐药基因筛选的可靠性[27]。Zhou等[28]设计了一个针对这291个靶向基因,除已知的炭疽受体*Antxr1*外含有869条sgRNA基因的慢病毒聚焦人力资源库。这种聚焦文库减少了筛选范围、实验成本及操作难度。选择合适的库容量可以更有效地筛选库,提高实验成功率。

4　展望

CRISPR-Cas9基因组编辑技术是二十一世纪的一项重大的科学突破,推动了生命科学相关领域的研究,对基础科研领域产生了革命性的影响,在未来,CRISPR-Cas9技术的应用也必将越来越广泛。自2014年以来,利用该技术研究人员在药物靶标发现、基因功能研究、药物敏感基因研究、病毒宿主研究等领域取得了巨大的成功。基于CRISPR-Cas9的高通量功能性筛选技术将成为功能基因研究的首选工具。

参考文献

1　雷婷,肖斌,何咏茵,等.CRISPR/Cas9文库筛选技术的发展及在肿瘤研究中的应用[J].南方医科大学学报,2019,39(11):1381-1386.

2　Mohr SE, Smith JA, Shamu CE, et al. RNAi screening comes of age: Improved techniques and complementary approaches[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(9): 591-600.

3　尚仁福.高效saiRNA设计规则的筛选[D].中国科学院上海生命科学研究院;上海生物化学与细胞生物学研究所;中国科学院大学;中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所,2017.

4　印晓静,胡嘉波,韩崇旭,等.CRISPR/Cas9在医学检验中的研究进展及应用[J].中华检验医学杂志,2019,42(5):381-385.

5　Shalem O, Sanjana NE, Zhang F. High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9[J]. Nat Rev Genet, 2015, 16(5): 299-311.

6　孟娇,刘丁玉,黄灿,等.CRISPR/Cas基因编辑系统在原核微生物细胞工厂构建中的开发与应用[J].微生物学通报,2019,46(10):2730-2742.

7　彭冉.黄色粘球菌CRISPR系统的功能分析及CRISPR/Cas9在粘球菌中的应用研究[D].山东大学,2017.

8　Jinek M, Jiang F, Taylor DW, et al. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation[J]. Science (New York, NY), 2014, 343(6176): 1247997.

9　Simon JE, Rodriguez AS, Santiago Vispo N. CRISPR-Cas9: A precise approach to genome engineering[J]. Ther Innov Regul Sci, 2018, 52(6): 701-707.

10　Zhou X, Li R, Jing R, et al. Genome-wide CRISPR knockout screens identify *ADAMTSL3* and *PTEN* genes as suppressors of HCC proliferation and metastasis, respectively[J]. J Cancer Res Clin Oncol 2020, 146(6):1509-1521.

11　Wang Y, Gao B, Tan PY, et al. Genome-wide CRISPR knockout screens identify NCAPG as an essential oncogene for hepatocellular carcinoma tumor growth[J]. FASEB J, 2019, 33(8): 8759-8770.

12　Zhang S, Zhang F, Chen Q, et al. CRISPR/Cas9-mediated knockout of NSD1 suppresses the hepatocellular carcinoma development *via* the NSD1/H3/Wnt10b signaling pathway[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 467.

13　Wei L, Lee D, Law CT, et al. Genome-wide CRISPR/Cas9 library screening identified PHGDH as a critical driver for Sorafenib resistance in HCC[J]. Nat Comm, 2019, 10(1): 4681.

14　Cai J, Chen J, Wu T, et al. Genome-scale CRISPR ac-

tivation screening identifies a role of LRP8 in Sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 526(4):1170-1176.

15 Zheng A, Chevalier N, Calderoni M, et al. CRISPR/Cas9 genome-wide screening identifies KEAP1 as a sorafenib, lenvatinib, and regorafenib sensitivity gene in hepatocellular carcinoma [J]. Oncotarget, 2019, 10(66): 7058-7070.

16 Sun W, He B, Yang B, et al. Genome-wide CRISPR screen reveals SGOL1 as a druggable target of sorafenib-treated hepatocellular carcinoma [J]. Lab Invest, 2018, 98(6): 734-744.

17 Chen X, Sun X, Guan J, et al. Rsf-1 influences the sensitivity of non-small cell lung cancer to paclitaxel by regulating NF-κB pathway and its downstream proteins[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 44(6): 2322-2336.

18 Bialk P, Wang Y, Banas K, et al. Functional gene knockout of NRF2 increases chemosensitivity of human lung cancer A549 cells *in vitro* and in a xenograft mouse model[J]. Mol Ther Oncolytics, 2018, 11:75-89.

19 Yu J, Zhou J, Xu F, et al. High expression of Aurora-B is correlated with poor prognosis and drug resistance in non-small cell lung cancer[J]. Int J Biol Markers, 2018, 33(2): 215-221.

20 Heyza JR, Lei W, Watza D, et al. Identification and characterization of synthetic viability with ERCC1 deficiency in response to interstrand crosslinks in lung cancer [J]. Clin Cancer Res, 2019, 25(8): 2523-2536.

21 Ding Y, Gong C, Chen R, et al. Synthetic lethality between HER2 and transaldolase in intrinsically resistant HER2-positive breast cancers[J]. Nat Comm, 2018, 9(1): 4274.

22 Wang H, Sun W. CRISPR-mediated targeting of HER2 inhibits cell proliferation through a dominant negative mutation[J]. Cancer Lett, 2017, 385:137-143.

23 Mintz RL, Lao YH, Chi CW, et al. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis to validate the synergy between PARP1 inhibition and chemotherapy in BRCA1-mutated breast cancer cells[J]. Bioeng Transl Med, 2020, 5(1): e10152.

24 Yang M, Zeng C, Li P, et al. Impact of CXCR4 and CXCR7 knockout by CRISPR/Cas9 on the function of triple-negative breast cancer cells [J]. Onco Targets Ther, 2019, 12: 3849-3858.

25 Chen Y, Zhang Y. Application of the CRISPR/Cas9 system to drug resistance in breast cancer[J]. Adv Sci (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany), 2018, 5(6): 1700964.

26 Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells[J]. Science, 2014, 343(6166): 84-87.

27 Whittaker SR, Theurillat JP, Van Allen E, et al. A genome-scale RNA interference screen implicates NF1 loss in resistance to RAF inhibition[J]. Cancer Discov, 2013, 3(3): 350-362.

28 Zhou Y, Zhu S, Cai C, et al. High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells[J]. Nature, 2014, 509(7501): 487-491.

[**本文编辑**] 谭贝加

(上接第871页)

19 王曼,周天,胡凯文.引火汤在恶性肿瘤放、化疗不良反应中的应用[J].中医学报,2019,34(6):1156-1158+1187.

20 姚晓燕,沈丽霞.六味地黄丸辅助治疗成人复发性口腔溃疡临床研究[J].新中医,2019,51(11):70-72.

21 张军梅.金匮肾气丸加味配合中药外敷治疗复发性口腔溃疡临床观察[J].西部中医药,2014,27(9):92-93.

22 赵常国,陈艳林,吴生元,等.吴生元经验方加味潜阳封髓丹治疗放化疗后口腔溃疡的临床疗效观察[J].四川中医,2017,35(5):180-182.

23 陆金兰,黎淑芳,卢冠铭,等.穴位注射配合穴位外敷治疗乳腺癌化疗后口腔溃疡疗效观察[J].陕西中医,2018,39(4):527-529.

[**本文编辑**] 宋睿璞