

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.06.018

· 综述 ·

## CRISPR/Cas 基因编辑技术应用于表皮生长因子受体突变型肺腺癌的治疗

Treatment of editing CRISPR/Cas gene technique for the lung cancer with epidermal growth factor receptor mutation

赵家义<sup>1</sup>综述;吴宏宇<sup>2</sup>,韩一平<sup>1</sup>审阅(1.第二军医大学附属长海医院呼吸与危重症医学科,上海200433;2.复旦大学生命科学院遗传学研究所暨遗传工程国家重点实验室,上海200433)

**[摘要]** CRISPR/Cas 基因编辑技术是一种强大的新技术,可以精确编辑细胞基因组。该技术在实验室应用的基础上,引入至肿瘤研究领域,成为目前肿瘤治疗研究领域的热点。肺癌的综合治疗已经进入了分子靶向时代,表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, *EGFR*)基因突变是肺腺癌最主要、最重要的驱动基因之一,表皮生长因子受体-酪氨酸激酶抑制剂(epidermal growth factor receptor-tyrosinekinase inhibitors, *EGFR-TKI*)治疗 *EGFR* 突变肺腺癌有显著疗效,但随之而来的原发性和继发性耐药现象成为当前迫切需要解决的问题。应用 CRISPR/Cas 基因组编辑技术进行个性化分子手术可有效地纠正或破坏 *EGFR* 突变,从而抑制肿瘤生长和进展。随着 CRISPR/Cas 基因重组技术的日臻完善与成熟,分子手术方法联合传统外科手术、放疗和/或 *TKI* 靶向药物治疗必将为携带 *EGFR* 突变的肺腺癌患者带来很好的希望。

**[关键词]** CRISPR/Cas;基因编辑技术;表皮生长因子受体;肺癌

**[中图分类号]** R734.2; R730.5

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2017)06-0675-05

成簇规律间隔短回文重复序列/成簇规律间隔短回文重复序列关联蛋白(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins, CRISPR/Cas)基因编辑技术是近年来基因工程领域的重要突破。CRISPR/Cas 是细菌和古细菌的天然免疫系统,其研究历史很短,但从衍生出的定向基因编辑技术已经迅速超越以往的方法,在生物研究的各领域产生了革命性影响。在肿瘤研究中,利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术研究肿瘤发生发展相关机制、筛选相关基因<sup>[1]</sup>、建立肿瘤模型<sup>[2]</sup>以及肿瘤基因治疗等方面,均显示出强大的生命力和广泛的应用前景。肺癌是最常见的恶性肿瘤,预后差,死亡率高居癌症之首。表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, *EGFR*)基因突变是肺腺癌最重要、最主要的驱动基因之一,也是表皮生长因子受体-酪氨酸激酶抑制剂(epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors, *EGFR-TKI*)治疗肺腺癌的首选靶点,但随之而来的原发性和继发性耐药现象成为当前迫切需要解决的问题。为此,本文对 CRISPR/Cas 基因编辑技术在 *EGFR* 突变的肺癌治疗中应用的研究进展进行综述,旨在为该类药物提供更多的治疗手段。

### 1 CRISPR/Cas 概述

CRISPR/Cas 基因编辑技术的研发可追溯到

1987年,日本科学家 Ishino 等首次在大肠杆菌 *IAP* 基因下游发现了被 32 bp 的非重复序列所隔开的奇怪的 29 bp 重复序列。直到近年,该重复序列被发现在 40% 以上的细菌和 90% 的古细菌中广泛存在,并且在不断进化的过程中产生适应性的免疫防御机制,用来保护自身的基因组免受外源核酸的干扰和破坏<sup>[3]</sup>。CRISPR/Cas 系统作为一套适应性免疫系统,其应用 CRISPR RNA(*crRNA*)以碱基互补的形式引导 Cas 蛋白识别入侵的外源基因组,并对其 DNA 进行剪切。根据 CRISPR 的进化序列、基因座结构和组成的不同,CRISPR 系统分成 3 个类型(I~III型)<sup>[4-5]</sup>,其中 II 型,即 CRISPR/Cas9 系统,因仅需 Cas9 蛋白,目前已成为一套理想的程序化的基因编辑工具<sup>[6]</sup>。

CRISPR/Cas9 系统的组成结构主要有 3 部分<sup>[7]</sup>,分别为 Cas9 核酸内切酶、反式激活 *crRNA* (transactivating *crRNA*, *tracrRNA*)和 CRISPR RNA (*crRNA*) (图 1)。Cas9 核酸内切酶是一个多结构域

**[基金项目]** 上海市科研计划基金项目资助(No. 15411960400)。Project supported by the Scientific Research Foundation of Shanghai(No. 15411960400)

**[作者简介]** 赵家义(1986-),男,硕士,主治医师,主要从事肺癌早期治疗及基础研究,E-mail: rayzhaojiayi@163.com

**[通信作者]** 韩一平(HAN Yiping, corresponding author),硕士,主任医师,教授,主要从事肺部肿瘤的综合治疗研究,E-mail: yphan2006@163.com

蛋白,其包括 RuvC 样核酸内切酶的结构域和 HNH 样核酸酶的活性结构域,是 II 型 CRISPR/Cas9 系统不可缺少的组成元件,可以针对具有特异性序列的 DNA 进行双链剪切。在化脓性链球菌的体外实验<sup>[8]</sup>中证实, Cas9 蛋白可以使目标 DNA 形成双链断裂切口,然后 HNH 样核酸内切酶结构域对 crRNA 互补链进行剪切,而 RuvC 样核酸内切酶切割另一条非互补链。此外,在间隔序列旁有一段保守的短核酸序即间隔序列临近基序( protospacer adjacent motif, PAM)结构,如 NGG、NGGNG、NAAR 和 NNA-GAAW,该结构对于 Cas9 蛋白进行结合、剪切十分重要<sup>[9]</sup>。此外,PAM 是区分异己的重要基序<sup>[10]</sup>,被整合到宿主基因组中的间隔序列不含 PAM,因此宿主基因组不会被切割。TracrRNA 是一个非蛋白编码 RNA,其作用是促进 crRNA 的成熟和完成随后的 DNA 剪切<sup>[11]</sup>。同时, tracrRNA 还能与 crRNA 前体互补,有助于 crRNA 成熟<sup>[12]</sup>。crRNA 携带着 CRISPR/Cas 系统中的间隔序列,负责捕捉外源性的 DNA 序列,起到复合体定位的功能<sup>[13]</sup>。前体 crRNA ( pre-crRNA )需要借助 tracrRNA、核糖核酸酶 III( Ribonuclease III, RNase III )及 Cas9 蛋白经过两步剪切才能成为成熟的 crRNA,其中某些间隔序列和重复序列可以特异性地识别入侵基因组的剪切位点,指导 CRISPR/Cas9 系统进行编辑。

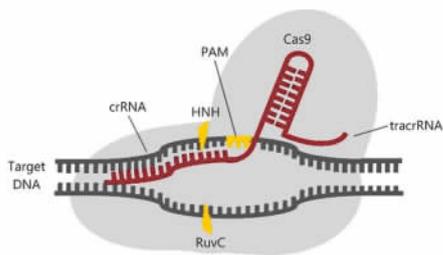


图1 CRISPR/Cas9 系统的组成结构<sup>[7]</sup>

## 2 CRISPR/Cas9 基因编辑技术原理及作用过程

CRISPR/Cas9 是一种 RNA 介导的 DNA 内切酶<sup>[14]</sup>,通过一个与目标序列互补的单引导 RNA<sup>[15]</sup> ( single guide RNA, sgRNA )引导定位到与 PAM ( NGG 或 NAG 形式 )相邻的基因组目标序列<sup>[16]</sup>。通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在目标基因片段上产生 DNA 双链断裂,再通过同源重组修复( homology-directed repair, HDR )<sup>[17]</sup>或非同源末端连接( native nonhomologous end joining, NHEJ )<sup>[18]</sup>修复机制产生点突变、移码突变、插入标记、提前终止密码、

加入报告基因或进行基因修正等方式引入突变或新的基因,就可达到特异性基因编辑的目的<sup>[19]</sup> ( 图 2 )。

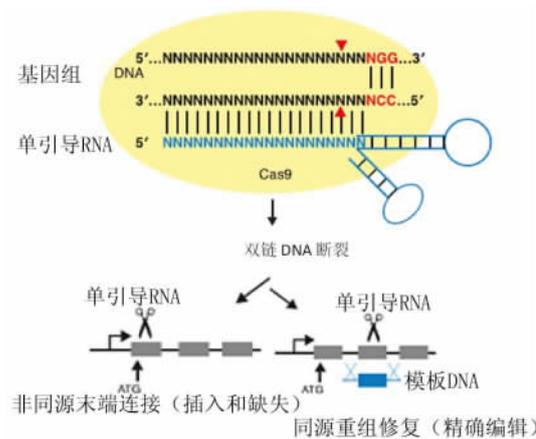


图2 CRISPR/Cas9 基因编辑技术原理<sup>[19]</sup>

CRISPR/Cas9 基因编辑的过程分为 3 个阶段: 获得阶段、表达阶段和干扰阶段<sup>[20]</sup>。获得阶段: 外源病毒或者质粒 DNA 中的间隔序列前体插入到宿主的 CRISPR 阵列中,产生一个新的重复序列-间隔序列单元,即获得 CRISPR 间隔序列。表达阶段: 表达 CRISPR 基因座和 Cas 基因相关蛋白。在 II 型 CRISPR 系统中, tracrRNA 与 pre-crRNA 的重复序列配对,引导 pre-crRNA 的加工,产生成熟的 crRNA-tracrRNA 复合体。干扰阶段: crRNA-tracrRNA 与 Cas9 核酸酶形成复合体,指引 Cas9 切割与间隔序列匹配的外源 DNA。外源性的核酸会在 CRISPR / Cas9 系统复合体的作用下于特定的位置被剪切,形成双链断裂切口( double strand break, DSB ),从而完成编辑过程。

基于对 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的研究,研究者们已将该套系统改造成为一套理想的程序化的基因编辑工具。从两方面完成整个基因编辑过程: 一是 Cas9 核酸内切酶在 crRNA 的介导下对基因组 DNA 进行剪切;二是 DNA 的 DSB 会被细胞内天然的 DNA 修复系统进行修复<sup>[21]</sup>。

## 3 CRISPR/Cas 基因编辑技术在 EGFR 突变肺癌治疗中的应用

目前癌症基因组计划已经明确,癌症是由于许多基因组改变所致,比如基因缺失、倒位和易位<sup>[22]</sup>。CRISPR/Cas9 系统作为一种新兴的基因编辑技术,目前在肿瘤的研究中也被广泛应用,是当前肿瘤治

疗研究领域的热点之一。Check 等<sup>[23]</sup>认为,可通过特殊的方法改变患者的遗传物质,将人的正常基因或者有治疗作用的基因通过一定方式导入患者的靶细胞,直接针对患者的异常基因本身进行治疗,从而达到治疗肿瘤的目的。

肺癌是全球病死率最高的恶性肿瘤,其中 85% 左右的肺癌是非小细胞(non-small cell lung cancer, NSCLC),包括腺癌和鳞状细胞癌。肺癌的治疗方法取决于分期,主要有外科手术、放射治疗、靶向治疗或化学治疗。对于晚期肺癌提倡用药物治疗肿瘤的传统观点而言,化学治疗的非特异性细胞毒性作用始终是治疗的一大瓶颈。Lynch 等<sup>[24]</sup>和 Paez 等<sup>[25]</sup>首次报道了在肺腺癌患者某一亚组中发现 EGFR 酪氨酸激酶持续活化的基因突变,这些 EGFR 基因突变多见于东亚女性患者。EGFR 是一种膜糖蛋白,包括细胞外配体结合域、穿膜结构域以及细胞内酪氨酸激酶结构域。配体结合后激活细胞内酪氨酸激酶,通过串联下行信号促进许多支持肿瘤表型的细胞内途径,包括基底细胞增生、新生血管形成、肿瘤侵袭和转移、细胞凋亡减少以及激活 Warburg 效应(肿瘤细胞在有氧条件下表现活跃的葡萄糖摄取和糖酵解)。最常见的 EGFR 突变是 19 外显子缺失(del-E746-A750,约占 50%)和 21 外显子点突变[即在密码子 858(L858R)的位置上精氨酸替代亮氨酸,约占 40%]。现在已经开发了如吉非替尼、厄洛替尼和埃克替尼等 TKI,通过与 ATP 竞争 EGFR 的酪氨酸激酶结构域的 ATP 结合口袋来抑制 EGFR 的酪氨酸激酶活性。TKI 已经成为 EGFR 突变的晚期非小细胞肺癌的一线治疗药物。

EGFR-TKI 在晚期 EGFR 突变敏感的肺癌患者治疗中疗效已广为人知,但几乎所有患者都不可避免地在使用 1 年后出现耐药现象。这种获得性耐药往往是由于在 20 号外显子的 790(T790M)位置上发生了二级突变,蛋氨酸替代了苏氨酸;约 65% 患者存在 TKI 获得性耐药。T790M 相关的耐药可能是因为结合在 EGFR 的 ATP 结合口袋的结构发生了改变,并且与 ATP 结合的亲和力得到恢复。为了解决耐药性问题,一些第二代 TKI 药物如阿法替尼、达克替尼、来那替尼以及第三代药物如 CO-1686、AZD9291 等已被开发和应用。第二代药物是不可逆性抑制剂,第三代药物可选择性抑制 T790M 突变。目前初步研究<sup>[26]</sup>表明,其可能会增加适合该类药物治疗的患者 9~13 个月的 OFS。然而,Thress 等<sup>[27]</sup>研究发现,第三代 TKI 药物也可诱导新的耐药性突变(如 C797S)。由于不断使用新的靶向药物,

导致各种新的肿瘤中耐药基因突变产生,因此有必要探索一种新的方法来解决该类问题。Tang 等<sup>[28]</sup>研究认为,使用 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术进行个性化分子手术可有效地纠正或破坏 EGFR 突变。由于 CRISPR/Cas 基因编辑技术介导的基因敲除相比其他基因剪辑技术更高效<sup>[29]</sup>,因此 CRISPR/Cas 基因编辑技术为今后研究基因功能提供了一种便捷的实验室工具<sup>[30]</sup>。更重要的是,通过修复基因突变来治疗临床疾病在理论上有了可能<sup>[31-32]</sup>。

作为肺癌分子手术的理论证据,Tang 等<sup>[28]</sup>提出使用 CRISPR/Cas9 修复或破坏 NSCLC 中 EGFR 突变基因。他们首先将患者的活检样本进行基因突变检测,选取具有最常见的原发性突变和继发性突变的样本,然后将 sgRNA 设计用于靶向定位突变外显子的特定序列(例如 21 外显子中的特定序列 L858R、19 外显子中的 E19del 或 20 外显子中的 T790M 耐药性突变)。为了修复突变的 EGFR,研究者接着运用 CRISPR/Cas9 切口酶作用于侧链突变的 DNA 序列(如果在外显子中有其他的突变则作用于整个外显子),使突变基因或外显子的每一侧基因组 DNA 序列中都会产生单链的断裂(如 19 外显子或 21 外显子)。最后供体 DNA 序列携带野生型的 19 或 21 外显子及其左右同源臂通过同源重组的方法替换原突变序列或外显子<sup>[33]</sup>。这种替换将根除致癌基因的突变,终止持续活化的酪氨酸激酶的活性,从而阻止肿瘤的发展。同样,该方法将对原发性 EGFR 突变(例如 E19del、L858R)或同一外显子的多个突变都具有显著的作用。

#### 4 展 望

个体化分子手术——CRISPR/Cas 基因编辑技术治疗 EGFR 突变肺癌的策略就是为了破坏突变的 EGFR 基因。Tang 等<sup>[28]</sup>使用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术靶向作用于 EGFR 酪氨酸激酶结构域突变的 DNA 序列,并引入一个终止密码子或利用插入缺失而中断蛋白翻译,导致突变后翻译的 EGFR 蛋白缺乏相应的功能,从而失去其致癌活性。这种定向破坏的方法可作用于在酪氨酸激酶结构域(从 18 至 24 外显子)中任何部位突变或缺失以及更多常见的突变,故称为“分子手术”。只要存在合适的突变基因,靶向 sgRNA 都可起到相应的作用。研究者通过具有识别突变功能的 sgRNA 序列靶向作用于 20 外显子的 T790M 序列和 19 外显子的 del 序列,然后应用 CRISPR/Cas9 介导的基因编辑技术将依赖性 HDR 插入来终止 EGFR 19 或 20 外显子翻译,或者

将依赖性 NHEJ 随机插入/缺失而破坏 EGFR 酪氨酸激酶活性从而抑制肿瘤进展。

临床上是否可以将这些 CRISPR/Cas9 系统 (sgRNA 和 Cas9 可表达质粒及供体 DNA 质粒) 包装进病毒颗粒并且经气管给药输送到患者体内用于治疗局部肿瘤, 或通过血管内注射给药治疗转移性肿瘤, 都有待进一步研究。

利用基因组 DNA “分子手术” 的方式治疗 EGFR 突变的肺癌, 这种直接针对病因的治疗方式可望成为一种个体化、永久性的方法。同样的策略可以用来靶向作用其他类型的肿瘤驱动基因, 如间变性淋巴瘤激酶等位基因的重排和 *K-ras* 基因的突变。如果该类方法有效, 则将会成为另一种形式的基因治疗手段, 这可以避免因新突变基因而开发新型 TKI 药物所耗费昂贵、漫长的代价。尽管和其他治疗方式一样, 这一策略也可能被其他细胞增殖途径反馈激活所颠覆。然而, CRISPR/Cas 基因重组技术将可能最大限度防止继发性基因突变 (这也是 TKI 产生耐药的主要原因)。通过设计良好的 sgRNA、成功处理潜在的脱靶效应以及高效传递将是 CRISPR/Cas 基因编辑技术治疗方式成功的必要条件。随着 CRISPR/Cas 基因重组技术的完善与成熟, 分子手术方法联合传统外科手术、放疗、和/或 TKI 靶向药物治疗必将为 EGFR 突变的 NSCLC 患者延长生存时间带来福音。值得注意的是, 尽管 CRISPR/Cas 基因编辑技术已被证明是一种灵活的研究工具, 其安全性仍是科学界所关注的问题<sup>[34-35]</sup>, 在今后工作中需要进行更详细的安全评估。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] SHALEM O, SANJANA N E, ZHANG F, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells [ J ]. *Science*, 2014, 343( 6166 ): 84-87. DOI: 10. 1126/science. 1247005.
- [ 2 ] KHALED W T, LIU P. Cancer mouse models: past, present and future [ J ]. *Semin Cell Dev Biol*, 2014, 27( 1 ): 54-60. DOI: 10. 1016/j. semcdb. 2014. 04. 003.
- [ 3 ] HORVATH P, BARRANGOU R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea [ J ]. *Science*, 2010, 327( 5962 ): 167-170. DOI: 10. 1126/science. 1179555.
- [ 4 ] BHAYA D, DAVISON M, BARRANGOU R. CRISPR/Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation [ J ]. *Annu Rev Genetics*, 2011, 45( 3 ): 273-297. DOI: 10. 1146/annurev-genet-110410-132430.
- [ 5 ] MAKAROVA K S, HAFT D H, BARRANGOU R, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems [ J ]. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9( 6 ): 467-477. DOI: 10. 1038/nrmicro2577.
- [ 6 ] ZHANG J, ROUILLON C, KEROU M, et al. Structure and mechanism of the CMR complex for CRISPR-mediated antiviral immunity [ J ]. *Mol Cell*, 2012, 45( 3 ): 303-313. DOI: 10. 1016/j. molcel. 2011. 12. 013.
- [ 7 ] XIAO Y. Applications of the CRISPR-Cas9 mediated genome engineering [ J ]. *Milit Med Res*, 2015, 2( 1 ): 11-16. DOI: 10. 1186/s40779-015-0038-1.
- [ 8 ] GASIUNAS G, BARRANGOU R, HORVATH P, et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109( 39 ): 2579-2586. DOI: 10. 1073/pnas. 1208507109.
- [ 9 ] VAN DER PLOEG J R. Analysis of CRISPR in *Streptococcus mutans* suggests frequent occurrence of acquired immunity against infection by M102-like bacteriophages [ J ]. *Microbiology*, 2009, 155( Pt 6 ): 1966-1976. DOI: 10. 1099/mic. 0. 027508-0.
- [ 10 ] SHAH S A, ERDMANN S, MOJICA F J, et al. Protospacer recognition motifs: mixed identities and functional diversity [ J ]. *RNA Biol*, 2013, 10( 5 ): 891-899. DOI: 10. 4161/ma. 23764.
- [ 11 ] KARVELIS T, GASIUNAS G, MIKSYS A, et al. crRNA and tracrRNA guide Cas9-mediated DNA interference in *Streptococcus thermophilus* [ J ]. *RNA Biol*, 2013, 10( 5 ): 841-851. DOI: 10. 4161/ma. 24203.
- [ 12 ] DELTCHEVA E, CHYLINSKI K, SHARMA C M, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III [ J ]. *Nature*, 2011, 471( 7340 ): 602-607. DOI: 10. 1038/nature09886.
- [ 13 ] 刘超, 李志伟, 张艳桥. CRISPR/Cas9 基因编辑系统在肿瘤研究中的应用进展 [ J ]. *中国肺癌杂志*, 2015, 9( 18 ): 571-579. DOI: 10. 3779/j. issn. 1009-3419. 2015. 09. 08.
- [ 14 ] DOUDNA J A, CHARPENTIER E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 [ J/OL ]. *Science*, 2014, 346: 1258096 [ 2016-12-28 ]. <https://science.sciencemag.org/content/346/6316/1258096>. DOI: 10. 1126/science. 1258096.
- [ 15 ] CHO S W, KIM S, KIM J M, et al. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease [ J ]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31( 3 ): 230-232. DOI: 10. 1038/nbt. 2507.
- [ 16 ] 李君红, 张富婷, 桑春艳, 等. CRISPR 基因编辑技术在肿瘤研究中的应用 [ J ]. *解放军医药杂志*, 2015, 27( 9 ): 95-99. DOI: 10. 3969/j. issn. 2095-140X. 2015. 09. 020.
- [ 17 ] SMITH G R. Homologous recombination near and far from DNA breaks: alternative roles and contrasting views [ J ]. *Annu Rev Genet*, 2001, 5( 3 ): 243-274. DOI: 10. 1146/annurev. genet. 35. 102401. 090509.
- [ 18 ] SHUMAN S, GLICKMAN M S. Bacterial DNA repair by non-homologous end joining [ J ]. *Nat Rev Microbiol*, 2007, 5( 11 ): 852-861. DOI: 10. 1038/nrmicro1768.
- [ 19 ] HAIWEI M, ZACHARY K, DANIEL G A, et al. Precision cancer mouse models through genome editing with CRISPR-Cas9 [ J ]. *Genome Med*, 2015, 7( 1 ): 53-63. DOI: 10. 1186/s13073-015-0178-7.
- [ 20 ] VAN DER OOST J, WESTRA E R, JACKSON R N, et al. Unraveling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems [ J ]. *Nat Rev Microbiol*, 2014, 12( 7 ): 479-492. DOI: 10. 1038/nrmicro3279.
- [ 21 ] XU T, LI Y, VAN NOSTRAND J D, et al. Cas9-based tools for

- targeted genome editing and transcriptional control [ J ]. Appl Environ Microbiol, 2014, 80( 5 ): 1544-1552. DOI: 10. 1128/AEM. 03786-13.
- [ 22 ] LAWRENCE M, STOJANOV P, MERMEL C H, et al. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumortypes [ J ]. Nature, 2014, 505 ( 7484 ): 495-501. DOI: 10. 1038/nature12912.
- [ 23 ] CHECK E. Gene-therapy trials to restart following cancer risk review [ J ]. Nature, 2005, 434 ( 7030 ): 127. DOI: 10. 1038/434127b.
- [ 24 ] LYNCH T J, BELL D W, SORDELLA R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib [ J ]. N Engl J Med, 2004, 350( 4 ): 2129-2139. DOI: 10. 1056/NEJMoa040938.
- [ 25 ] PAEZ J G, JÄNNE P A, LEE J C, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy [ J ]. Science, 2004, 304( 10 ): 1497-1500. DOI: 10. 1126/science. 1099314.
- [ 26 ] POLITI K, AYENI D, LYNCH T. The next wave of EGFR tyrosine kinase inhibitors enter the clinic [ J ]. Cancer Cell, 2015, 27( 5 ): 751-753. DOI: 10. 1016/j. ccell. 2015. 05. 012.
- [ 27 ] THRESS K S, PAWELETZ C P, FELIP E, et al. Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M [ J ]. Nat Med, 2015, 21 ( 7 ): 560-562. DOI: 10. 1038/nm. 3854.
- [ 28 ] TANG H B, JOSEPH B S. CRISPR/Cas-mediated genome editing to treat EGFR-mutant lung cancer: a personalized molecular surgical therapy [ J ]. EMBO Mol Med, 2016, 8( 2 ): 83-85. DOI: 10. 15252/emmm. 201506006.
- [ 29 ] SANDER J D, JOUNG J K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes [ J ]. Nat Biotechnol, 2014, 32( 7 ): 347-355. DOI: 10. 1038/nbt. 2842.
- [ 30 ] CHEN S, SANJANA N E, ZHENG K, et al. Genome-wide CRISPR screen in a mouse model of tumor growth and metastasis [ J ]. Cell, 2015, 160( 2 ): 1246-1260. DOI: 10. 1016/j. cell. 2015. 02. 038.
- [ 31 ] EBINA H, MISAWA N, KANEMURA Y, et al. Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus [ J ]. Sci Rep, 2013, 3: 2510 [ 2016-12-28 ]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3752613>. DOI: 10. 1038/srep02510.
- [ 32 ] SÁNCHEZ-RIVERA F J, JACKS T. Applications of the CRISPR-Cas9 system in cancer biology [ J ]. Nat Rev Cancer, 2015, 15 ( 7 ): 387-395. DOI: 10. 1038/nrc3950.
- [ 33 ] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [ J ]. Science, 2013, 339( 9 ): 819-823. DOI: 10. 1126/science. 1231143.
- [ 34 ] BALTIMORE B D, BERG P, BOTCHAN M, et al. A prudent path forward for genomic engineering and germline genomodification [ J ]. Science, 2015, 348( 1 ): 36-38. DOI: 10. 1126/science. aab1028.
- [ 35 ] MOU H, KENNEDY Z, ANDERSON D G, et al. Precision cancer mouse models through genome editing with CRISPR-Cas9 [ J ]. Gen Med, 2015, 7( 1 ): 53-60. DOI: 10. 1186/s13073-015-0178-7.
- [ 收稿日期 ] 2016 - 12 - 22 [ 修回日期 ] 2017 - 03 - 29  
[ 本文编辑 ] 王映红

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 文稿中须写成斜体的外文字符

在科技文稿中出现许多外文字符, 它们有的是正体、有的是斜体。正体和斜体外文字符各有其特定含义和用法, 切不可混淆使用。现根据有关标准和规则, 把生物医学文稿中须要写成斜体的外文字符归纳为以下几类:

(1) 生物学中拉丁学名的属名和种名(包括亚属、亚种、变种)应斜体, 例如大肠杆菌 *Escherichia coli*、幽门螺杆菌 *Helicobacter pylori* 等。(2) 各种基因的缩写符号应斜体(基因表达产物缩写符号应写成正体), 例如人脆性 X 智力低下基因 1 的符号为 *FMRI*、原癌基因 *RAF1*(人)、病毒癌基因 *v-raf-1*(鼠)、抑癌基因 *p53*(鼠)等。(3) 限制性内切核酸酶缩写符号中前 3 个字母应斜体, 例如 *Hind* III、*Bam* H I、*Sal* I 等。(4) 各种统计学符号应斜体, 例如样本数 *n*、均数  $\bar{x}$ 、样本差 *s*、*t* 检验、*F* 检验、概率 *P*、相关系数 *r* 等。(5) 各种物理量的量符号应斜体(*pH* 用正体除外), 例如长度 *l*(*l*)、面积 *A*(或 *S*)、体积 *V*、质量 *m*、时间 *t*、压力 *p*、相对分子质量 *M<sub>r</sub>*、物质的量浓度 *c<sub>B</sub>* 等。(6) 化学中表示旋光性、分子构型、构象、取代基等符号应斜体, 例如左旋 *L*-、右旋 *D*-、邻位 *o*-、对位 *p*-、反式 *trans*-、顺式 *cis*- 等。(7) 数学中用字母表示的变数和一般函数应斜体。(8) 英文中使用的某些拉丁词应斜体, 例如 *vs*、*in situ*、*in vivo*、*in vitro* 等。

(本刊编辑部)