

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2018.01.002

·院士论坛(专题)·

## CRISPR-Cas 基因编辑技术在泌尿系统肿瘤研究中的应用

杨悦, 訾晓渊, 孙颖浩(第二军医大学附属长海医院 泌尿外科, 上海 200433)

**[摘要]** 基于成簇规律间隔短回文重复系统(clustered regularly interspaced short palindromic repeat-clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated system, CRISPR-Cas)的基因编辑技术是一种新兴的基因编辑技术, 它能精准完成外源DNA的识别与编辑, 为基因工程提供了革命性的分子工具。CRISPR-Cas基因编辑技术具有操作简便、易于设计等特点, 将其运用于泌尿系统肿瘤研究中, 可为泌尿系肿瘤相关基因的功能学研究提供新方法, 进而更好地服务临床诊疗。本文将对CRISPR-Cas基因编辑技术分子结构与工作原理、在泌尿系肿瘤研究中的应用现状、最新进展及存在的问题进行综述。

**[关键词]** 成簇规律间隔短回文重复序列系统; 泌尿系统肿瘤; 基因编辑

**[中图分类号]** R737.1; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)01-0009-08

## The application of CRISPR-Cas gene editing technique in urinary system tumors

YANG Yue, ZI Xiaoyuan, SUN Yinghao (Department of Urology, Changhai Hospital Affiliated to Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[Abstract]** The recent development of CRISPR-Cas systems (clustered regularly interspaced short palindromic repeat-clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated system) as easily accessible and programmable tools for genome editing and regulation is spurring a revolution in biology. Experimental approaches based on this versatile technology have the potential to transform the field of cancer genetics. Here, we review current approaches for functional studies of urological cancer genes that are based on CRISPR-Cas systems, with emphasis on both advanced basic and translational urological research.

**[Key words]** clustered regularly interspaced short palindromic repeat-clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated system (CRISPR-Cas); urological cancer; gene editing

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(1): 9-16. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.01.002]



**孙颖浩** 中国工程院院士、主任医师、博士研究生导师, 国家重点基础研究发展计划(973计划)首席科学家, 何梁何利基金和国家杰出青年基金获得者。现任第二军医大学校长, 兼任全军前列腺疾病研究所所长。担任亚洲泌尿外科学会(UAA)前任主席, 中华医学会泌尿外科分会主任委员、中国医师协会泌尿外科医师分会候任会长、全军泌尿外科专业委员会主任委员, 上海市科学技术协会副主席、上海市医学会副会长、上海市医学会泌尿外科分会前任主任委员、上海市医师协会泌尿外科医师分会会长, 美国生殖泌尿外科医师学院(AAGUS)海外院士。创办 *Asian J Urol*, 担任《中华泌尿外科杂志》和《中华腔镜泌尿外科杂志》主编。

成簇规律间隔短回文重复系统(clustered regularly interspaced short palindromic repeat-clustered regularly interspaced short

palindromic repeats associated system, CRISPR-Cas)是细菌以及古细菌在长期进化过程形成的一种适应性免疫防御系统, 可用来抵抗外来噬菌体的入侵。近年来, 科学家基于此免疫系统工作原理, 发明了CRISPR-Cas基因编辑技术, 为基因工程提供了革命性的分子工具, 为肿瘤的基因学研究开启了新途径<sup>[1-5]</sup>。近年来, 高通量测序和生物信息学技术的极速发展, 为精准医疗背景下的泌尿系肿瘤研究

**[基金项目]** 国家重大研发计划精准医疗专项基金项目(No. 2016YFC0902200)。Project supported by the National Special Fund for Precision Medical Research and Development (No. 2016YFC0902200)

**[作者简介]** 杨悦(1992-), 女, 硕士生, 主要从事泌尿系统肿瘤及神经内分泌前列腺癌发生机制的研究, E-mail: elainabbit@163.com

**[通信作者]** 孙颖浩(SUN Yinghao, Corresponding author), E-mail: sunyhsmmu@126.com

**[优先发表]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20180111.1745.002.html>

提供了大量的基因学信息。而泌尿系肿瘤的发生发展是一个由多基因参与的、不同信号通路相互调控的复杂过程。同一基因在不同肿瘤、不同阶段、不同患者中均发挥着截然不同的生物信息学作用。因此,只有深入探究基因与泌尿系肿瘤的关系,让大数据的基因信息更好地服务于肿瘤研究,才能为患者提供最佳的个体化诊疗方案。然而,过去由于缺乏快速有效的基因编辑工具,泌尿系统肿瘤的基因学研究多局限于全基因组关联分析(genome-wide association study, GWAS)<sup>[6]</sup>等观察层面上,功能学层面的深入研究存在较多局限。而CRISPR-Cas9基因编辑技术具有操作简便、易于设计等特点,将其运用于泌尿系肿瘤研究中,可为泌尿系肿瘤相关基因的功能学研究提供新方法、新思路,进而更好地服务临床诊疗。本文阐述CRISPR-Cas技术在泌尿系肿瘤研究中应用的最新进展,旨在为临床研究提供新的思路和策略。

## 1 CRISPR-Cas基因编辑技术

### 1.1 CRISPR-Cas系统的分子结构

1987年,日本大阪大学的研究人员<sup>[7]</sup>在大肠杆菌的碱性磷酸酶基因附近区域发现不同寻常的串联重复序列;2002年,科学家正式将其命名为成簇规律间隔序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)。有研究<sup>[8]</sup>表明,约50%的细菌和90%的古生菌中均存在包含CRISPR-Cas的获得性免疫系统<sup>[9]</sup>。这些系统通过限制-修饰、顿挫感染以及阻碍吸附发挥作用,以抵御外来噬菌体入侵原核生物<sup>[10]</sup>。CRISPR-Cas系统主要由CRISPR序列和Cas蛋白基因组成。其中,CRISPR基因座由前导区(leader)、重复序列区(direct repeat)以及间区(spacer)组成。前导区富含AT,主要执行启动子功能;重复序列区长度20~50 bp,是高度保守的重复序列;间区长度26~72 bp,负责捕获外源入侵DNA片段,并将其整合在相邻重复序列区之间<sup>[11-12]</sup>。外源DNA片段中与间区相匹配的区域称为“原间区(proto-spacer)”<sup>[13]</sup>。根据CRISPR序列旁的Cas基因表达产物——Cas蛋白的种类不同,可将CRISPR-Cas系统分为6型(I~VI型)。其中,II型CRISPR-Cas9系统由于构成简单,对靶基因双链切割只需要Cas9这一种蛋白,已被开发成为一套理想的程序化基因编辑工具并被广泛应用。

### 1.2 CRISPR-Cas9发挥生理功能的主要过程

在正常生理情况下,CRISPR-Cas9的主要功能是产生获得性免疫,其发挥作用的主要过程分为适应(acquisition)、表达(expression)和干扰(interference)3个阶段<sup>[14-15]</sup>(图1)。

1.2.1 适应阶段 又称间区捕获阶段,外源病毒或质粒DNA中的间隔序列前体(protospacers)插入到宿主的CRISPR阵列中,产生一个新的重复序列(repeat)-间隔序列(spacer)单元,主要进行外源DNA的识别、捕获,并且将其作为新的间区整合在CRISPR基因座中。外源DNA中原间区片段的识别并不是随机的,通常在原间区序列下游存在一段由2~5个核苷酸组成的高度保守序列,称为“原间区邻近基序”(proto-spacer adjacent motifs, PAM)<sup>[18-19]</sup>。PAM的存在,可用于区分CRISPR序列本身和外源DNA间区序列,进而防止发生自身免疫反应<sup>[20-22]</sup>。

1.2.2 表达阶段 又称CRISPR RNA(crRNA)生成阶段,pre-CRISPR RNA(pre-crRNA)转录后被加工成短的crRNA,每段包含一个间隔序列和部分重复序列。CRISPR基因座先在前导区的作用下转录生成前体crRNA,在RNA内切酶III的作用下,对前体crRNA进行剪切,加工成为多个成熟crRNA片段,每个成熟crRNA中均含有单独的间区序列<sup>[23]</sup>。

1.2.3 干扰阶段 crRNA与入侵的外源DNA或RNA配对,使Cas蛋白降解这些外源核酸。crRNA作为向导RNA(guide RNA, gRNA),特异性识别噬菌体或质粒中包含与其间区序列配对互补的DNA片段。随后,Cas9蛋白可将DNA双链解开,进而发挥核酸酶作用对外源DNA进行切割,形成双链切口(double-strand breaks, DSBs),以完成细菌对外来入侵的干扰<sup>[1, 24]</sup>。

### 1.3 CRISPR-Cas9基因编辑工作原理

基于CRISPR-Cas9免疫系统发挥生理功能的作用原理,研究人员<sup>[1, 4, 25]</sup>设计出了CRISPR-Cas9基因编辑技术,主要包括两个步骤(图2)。首先,利用CRISPR/Cas9系统对特定DNA进行剪切,此步骤通常需要3个重要元件,分别为Cas9蛋白、根据需要设计的特异性crRNA以及tracrRNA。将这3个元件转染到目标细胞内,当该系统表达时,crRNA会与tracrRNA形成gRNA,并定向与目标DNA结合,同时Cas9蛋白将剪切目标DNA的正链与反链,形成DSB。为进一步简化CRISPR-Cas9系统的操作环节,研究人员将crRNA:tracrRNA所组成的双链RNA结构改造为发夹样的单链导向RNA(single-guide RNA, sgRNA),可大大提高基因编辑的效率。随后,DNA的DSB会被细胞内天然的DNA修复系统进行修复。DSB修方式有两种,一种为非同源末端连接(native non-homologous end joining, NHEJ),引起随机的小片段的缺失或者插入,此编辑方式不能进行精确控制;另一种为同源重组介导的修复(homology-directed repair, HDR),在双链DNA断点产生后,引入模板DNA序列,根据需要插入、删除或突变特定序列,把需要编辑的序列引

入到特定位点,以此达到精确基因编辑目的。

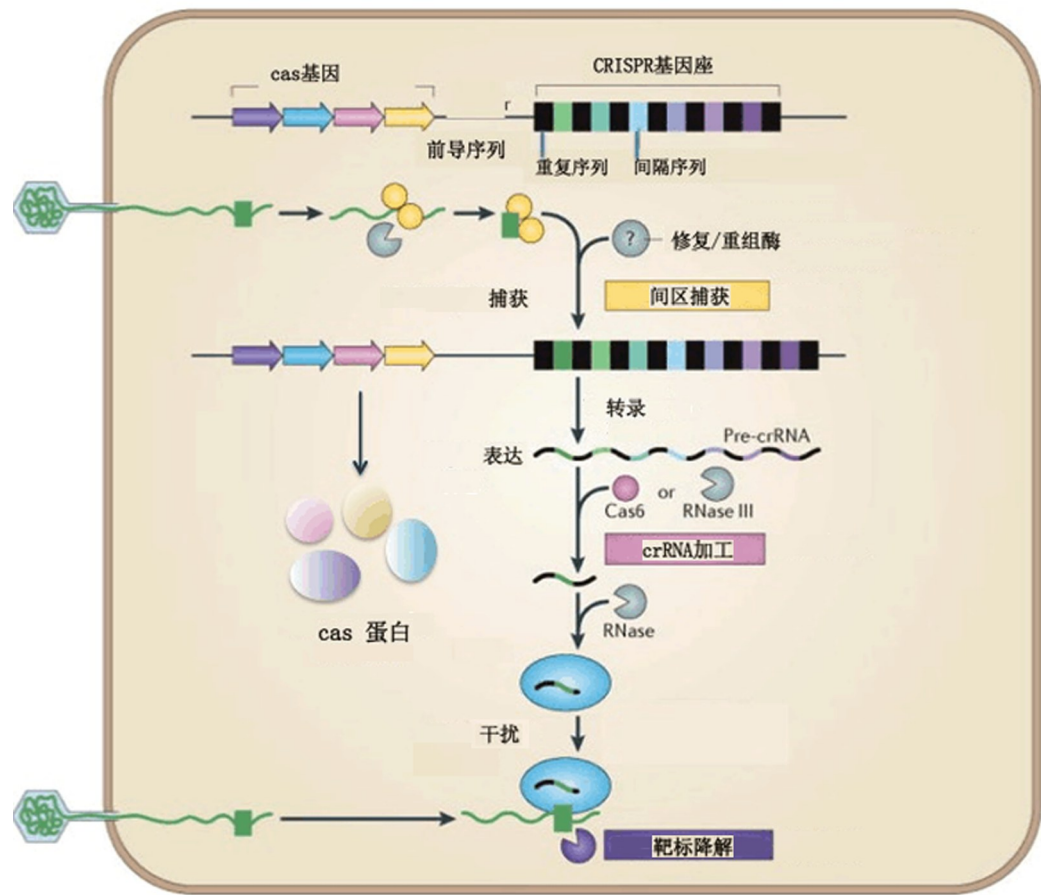


图1 CRISPR-Cas 系统免疫机制<sup>[16-17]</sup>

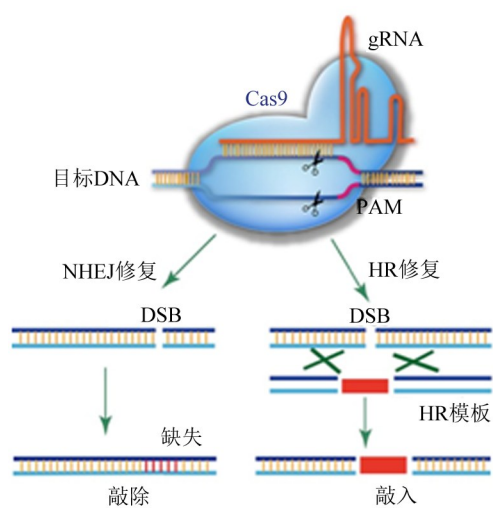


图2 CRISPR-Cas 系统工作原理图<sup>[25]</sup>

2 CRISPR-Cas9 技术在泌尿系肿瘤中的应用现状

2.1 前列腺癌

在欧美,前列腺癌在男性恶性肿瘤中最为常见,病死率居各种癌症第2位。我国前列腺癌发病率明

显低于西方国家,但近年来呈迅速上升趋势。随着高通量测序以及生物信息学技术的飞速发展,人们得到了大量有关前列腺癌的基因组学信息,如何探究这些基因在前列腺癌中的功能,进而指导临床便显得尤为重要。CRISPR-Cas9 系统为靶基因研究提供了快速、有效的工具,通过靶向基因编辑,结合相应的 Western blotting、免疫组化、原位杂交等技术,对相关基因在前列腺癌发生发展过程中的作用进行了深入探究(表1),并促进了前列腺癌分子分型、诊断和治疗等方面的发展。

2.1.1 分子分型与发展机制 根据TCGA提供数据显示,53%的前列腺癌中存在 ETS 家族基因融合现象,其中约90%为 TMPSS2-ERG 基因融合<sup>[25]</sup>。ERF 为 ETS 转录抑制子基因,近年来在原发性前列腺癌和转移性前列腺癌中均发现存在 ERF 基因缺失或是拷贝数变异现象。此外,ERF 不仅与 TMPSS2-ERG 原癌基因产物有接近一致的 DNA 结合域,并且 ERF 缺失均发生在非 TMPSS2-ERG 融合的前列腺癌中。Bose 等<sup>[26]</sup>通过在 TMPRSS2-ERG 阳性的前列腺癌类器官中,利用 CRISPR-Cas9 靶向敲除 ERG 后,发现细胞增殖停滞;但如果



同时沉默 *ERF* 阻遏基因, 则在一定程度上可以保留细胞的增殖性。该结果不仅提示 *ERF* 为一种抑癌基因, 也为前列腺癌分子分型提供新的参考依据。可见,

对于致病机制尚不明确的癌症分型, 研究人员可通过 CRISPR-Cas9 技术研究特定基因在该肿瘤进程中的作用, 明确新的抑癌或原癌基因。

表1 CRISPR-Cas技术在前列腺癌、膀胱癌和肾癌研究中的应用

| 肿瘤类型 | 修饰基因                              | 表型改变                                                                           | 涉及方向                 | 参考文献 |
|------|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|----------------------|------|
| 前列腺癌 | <i>ERF</i> 阻遏基因、 <i>ERG</i>       | 细胞增殖性恢复, 提示 <i>ERF</i> 为前列腺癌抑癌基因                                               | 肿瘤进展、分子分型            | [23] |
|      | 敲除 <i>NANOG</i> 、 <i>NANOG8</i>   | 细胞恶性程度降低, 为前列腺癌的诊治提供新靶标                                                        | 靶向治疗                 | [28] |
|      | 敲除 <i>RNase L</i>                 | 细胞转移性增加, 推测 <i>RNase L</i> 基因促进前列腺癌转移                                          | 前列腺癌转移机制             | [25] |
|      | 敲除 <i>Rb</i> 、 <i>TP53</i>        | 细胞表型改变, 引起去势抵抗                                                                 | 去势抵抗性前列腺癌靶向治疗        | [29] |
|      | 敲除 <i>BRN2</i>                    | 细胞神经内分泌标志物表达下降、证实 <i>BRN2</i> 促进 <i>NEPC</i>                                   | 神经内分泌性前列腺癌靶向治疗       | [30] |
|      | 敲除 <i>FANCA</i>                   | 细胞对顺铂的敏感性增加, 推测存在 <i>FANCA</i> 基因突变的恶性前列腺癌患者对铂类化疗药物敏感                          | 晚期前列腺癌的化疗            | [31] |
|      | 过表达 lncRNA <i>PCAT14</i>          | 细胞侵袭性下降, <i>PCAT14</i> 表达缺失可预测前列腺癌的侵袭性                                         | 前列腺癌生物标志物            | [27] |
| 膀胱癌  | 敲除 <i>CDH1</i>                    | E-钙黏蛋白表达下降, 肿瘤侵袭性、转移性下降                                                        | 浆细胞样膀胱癌基因治疗靶点        | [37] |
|      | 敲除 lncRNA <i>UCA1</i>             | 细胞周期停滞, 细胞凋亡                                                                   | 膀胱癌肿瘤标志物             | [39] |
|      | 敲除 <i>UTX</i> 、 <i>UTY</i>        | 细胞增殖性增强, 提示 <i>UTX</i> 和 <i>UTY</i> 为抑癌基因                                      | 膀胱癌发生发展机制            | [34] |
|      | 敲入 15 个膀胱癌高频突变基因                  | 膀胱癌非干细胞中同时存在 <i>ARID1A</i> 、 <i>GPRC5A</i> 和 <i>MLL2</i> 突变时, 其自我更新能力增强, 成球性最强 | 膀胱癌进展、靶向治疗           | [38] |
| 肾癌   | 敲除 <i>VHL</i>                     | 细胞表型出现上皮间质转化现象, 侵袭性增强                                                          | 建立 <i>VHL</i> 阴性小鼠模型 | [44] |
|      | 敲除 <i>HIF2<math>\alpha</math></i> | 不同细胞株对 <i>HIF2<math>\alpha</math></i> 拮抗剂的敏感性有所差异                              | 肾癌靶向精准治疗             | [45] |
|      | 敲除 <i>PIK3R1</i>                  | 细胞发生上皮间质转化, 同时侵袭性、转移性增强                                                        | 肾癌靶向精准治疗             | [47] |

此外, 美国克利夫兰医学中心的 Banerjee 等<sup>[27]</sup>在 PC3 细胞中利用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术, 靶向敲除 *RNase L* 基因, 发现细胞转移性增加, 推测 *RNase L* 基因突变或变异体可通过剪切黏附蛋白相关 mRNA 等机制来促进前列腺癌转移。

2.1.2 肿瘤标志物 过去数十年的研究证实, 细胞内存在大量长链非编码 RNA (long-chain non-coding RNA, lncRNA)。lncRNA 是一组具有高度异质性的转录本, 其可通过多种多样机制调控基因表达。因此, 它们在肿瘤组织中的表达具有高度异源性, 与正常细胞向肿瘤细胞转化具有直接关系。Ho 等<sup>[28]</sup>利用 CRISPR-Cas9 技术在 LNCap 细胞中敲除 lncRNA

*MI-21*, 为前列腺癌中 lncRNA 的功能学研究提供新方法。此外, Shukla 等<sup>[29]</sup>在 LNCaP 和 PC3 前列腺癌细胞中, 利用 CRISPR-Cas9 技术使 lncRNA *PCAT14* 过表达, 再结合基于高通量 RNA 测序的生物信息学分析技术, 发现 *PCAT14* 可抑制细胞侵袭, *PCAT14* 表达缺失可预测前列腺癌的侵袭性增加, 复发概率增大, 提示 lncRNA *PCAT14* 可作为恶性前列腺癌的肿瘤标志物。

2.1.3 靶向治疗 由于缺少较好的分子靶点, 前列腺癌靶向基因治疗一直存在较大瓶颈。Kawamura 等<sup>[30]</sup>通过 CRISPR-Cas9 技术对前列腺癌细胞系 DU145 中的 *NANOG* 和 *NANOG8* 基因进行突变编辑, 发现突变后的细胞系成瘤性、侵袭性、转移性、药物抵抗

性均大大降低,表明 *NANOG*/*NANOG8* 基因在前列腺癌发生发展中具有重要作用,为前列腺癌的诊治提供新靶标。去势治疗 (androgen deprived therapy, ADT) 是晚期前列腺癌主要的治疗方法,但通常会引起去势抵抗,发展成为去势抵抗性前列腺癌 (castration resistant prostate cancer, CRPC)。Mu 等<sup>[31]</sup> 利用 CRISPR-Cas9 系统在 LNCap 细胞株中靶向敲除 *Rb1* 以及 *P53* 基因,发现其可通过上调转录因子 *SOX2* 来改变细胞株表型,进而引起去势抵抗,为 CRPC 的治疗提供了新思路与潜在靶点。

20% 的 CRPC 会进一步转化成为神经内分泌性前列腺癌 (neuroendocrine prostate cancer, NEPC), 此类患者预后极差。Bishop 等<sup>[32]</sup> 在 16DCRPC 细胞中利用 CRISPR-Cas9 介导神经转录因子 *BRN2* 的敲除后,发现神经内分泌标志物表达下降,证实 *BRN2* 促进 NEPC 的发生,为 CRPC 诱导的 NEPC 患者提供新的治疗靶标。

在一项跨国多中心的转移性前列腺癌精准医疗项目中,研究人员对一位铂类化疗药物异常敏感的患者进行全外显子测序,发现其存在 DNA 修复基因 *FANCA* 的突变。结合在前列腺癌细胞株中利用 CRISPR-Cas9 敲除 *FANCA* 基因后,细胞对顺铂的敏感性增加,推测存在 *FANCA* 基因突变的恶性前列腺癌患者对铂类化疗药物敏感,为前列腺癌精准诊疗提供了新思路、新方法<sup>[33]</sup>。

将 CRISPR 基因编辑系统在体内准确有效地运输至靶器官是 CRISPR 系统应用所要解决的重要问题。Zhen 等<sup>[34]</sup> 研究出一种核酸适配体-脂质体-CRISPR/Cas9 嵌合体,该嵌合体可利用 RNA 适配体 A10 靶向结合前列腺癌细胞膜上的前列腺特异膜抗原 (prostate specific membrane antigen, PSMA) 的特点,对 CRISPR-Cas9 系统在体内进行靶向运输,更好地推进基于 CRISPR-Cas9 基因编辑技术的前列腺癌诊治研究。

## 2.2 膀胱癌

膀胱癌是我国泌尿系统最常见的恶性肿瘤,具有易复发、病死率高等特点。95% 的膀胱癌为尿路上皮肿瘤,而鳞癌或腺癌则较为少见。近年来,人们也将 CRISPR/Cas9 技术体系引入了膀胱癌分子机制研究中,为临床诊治提供了新方向 (表 1)。

Liu 等<sup>[35]</sup> 设计出一种基于 CRISPR-Cas9 系统的“与门 (AND gate)”遗传回路,靶向针对膀胱癌细胞进行基因编辑。该通路的输入端有 2 个启动子,其中肿瘤特异性启动子人端粒酶逆转录酶 (human telomerase reverse transcriptase, *hTERT*) 基因负责调控 sgRNA 转录,膀胱上皮细胞特异性启动子人

尿溶蛋白基因 II (human uroplakin II, hUP II) 负责调控编码 Cas9 蛋白的 mRNA 转录。只有当细胞系中同时存在这 2 个启动子,CRISPR-Cas9 系统才会发挥作用,进而保证了 CRISPR-Cas9 系统在膀胱癌细胞中的特异性应用。再利用此“与门”遗传通路在膀胱癌细胞中敲除 *P21* 基因、*hBAX* 基因和 E-钙黏蛋白基因后,发现能有效抑制细胞增殖,诱导细胞凋亡,降低细胞活性。该研究为癌症的靶向基因治疗提供了新思路。

2.2.1 分子分型与发生机制方面 Ahn 等<sup>[36]</sup> 对 40 例非转移性尿路上皮膀胱癌进行靶向测序,发现 *UTX* 基因突变频率最高,占 30% (12/40)。*UTX* 是位于 X 染色体上的组蛋白去甲基化酶基因,*UTY* 是 *UTX* 位于 Y 染色体上的等位基因。值得一提的是,测序结果显示 *UTY* 是发生拷贝数缺失频率最高的基因,占有男性患者的 22.8% (8/35)。再应用 CRISPR-Cas9 技术在 HT-1197 和 UMUC3 细胞株中分别单独敲除 *UTX* 基因、单独敲除 *UTY* 基因、同时敲除 *UTX* 和 *UTY* 基因,发现细胞增殖性均有所增强。该研究结果提示 *UTX* 和 *UTY* 基因为抑癌基因,两者的缺失可促进膀胱癌的发生发展。Jiang 等<sup>[37]</sup> 应用 CRISPR-Cas9 技术在 UMUC3 和 T24 膀胱癌细胞株中敲除 *FOXO1* 基因,发现细胞侵袭性增强,并可抵消异叶丹大黄素对膀胱癌的抑制作用,提示异叶丹大黄素可通过 STAT/FOXO1/MMPS 上调 *FOXO1* 表达,发挥抑制侵袭性膀胱癌发生发展的作用。

2.2.2 靶向治疗 浆细胞样膀胱癌是一类恶性程度较高的泌尿系统肿瘤,其具有临床分期高、对化疗不敏感、易复发并且常伴腹膜内转移的特点<sup>[38]</sup>。Al-Ahmadie 等<sup>[39]</sup> 应用全外显子测序和靶向测序技术,发现相比其他类型的膀胱癌,浆细胞样膀胱癌存在特异性的 *CDH1* 基因突变。随后,研究人员在膀胱癌 RT4 和 MGHU4 细胞系中应用 CRISPR-Cas9 技术靶向敲除 *CDH1* 基因,发现与肿瘤细胞转移相关的 E-钙黏蛋白表达水平下降,肿瘤细胞侵袭性和转移性增强。进一步从分子层面揭示了浆细胞样膀胱癌恶性程度高、易转移的发生机制,为临床治疗提供新的潜在靶点。

Yang 等<sup>[40]</sup> 通过对 56 个膀胱癌干细胞 (bladder cancer stem cell, BCSC)、膀胱癌非干细胞 (bladder cancer non-stem cell, BCNSC) 和膀胱癌上皮干细胞 (bladder cancer epithelial stem cell, BLESC) 进行测序,发现了在 BCSC 中的 21 个重要突变。随后,利用 CRISPR-Cas9 技术将其中的 15 个高频突变基因依次敲入 BCNSC 中,结果表明当 BCNSC 中同时存在 *ARID1A*、*GPRC5A* 和 *MLL2* 突变时,其自我更



新能力增强,成球性最强。该研究提示 *ARID1A*、*GPRC5A*和 *MLL2*基因突变在膀胱癌发生过程中起到重要作用,为临床诊断与治疗提供新的潜在标志物。

2.2.3 肿瘤标志物 Zhen等<sup>[41]</sup>在膀胱癌5637和T24细胞株中利用CRISPR-Cas9技术敲除lncRNA *UCA1* (urothelial cancer associated 1),发现*UCA1*的敲除可诱导细胞周期停滞在G1期,引起细胞凋亡,进而导致肿瘤细胞的增殖性、迁移性和侵袭性下降。进一步Meta分析表明,尿液中*UCA1*可成为诊断膀胱癌的无创高敏标志物。此外,Evers等<sup>[42]</sup>在膀胱癌UM-UC-3细胞株中分别利用shRNA和CRISPR系统靶向敲除92个基因,结合统计学和生物信息学对比分析表明,CRISPR基因编辑系统脱靶效应较少,更为稳定。

### 2.3 肾癌

肾细胞癌是常见的泌尿系统肿瘤,其病死率在我国泌尿系统肿瘤中居首位,对化疗极为不敏感,患者5年生存率不足20%<sup>[43]</sup>。近年来通过大规模高通量测序,科学家从基因组学层面揭示了肾癌的发病机制,并研发出诸如mTOR激酶竞争性抑制剂坦莫西司、VEGF信号转导通路抑制剂舒尼替尼等多种靶向治疗药物<sup>[42]</sup>。近几年,研究人员将CRISPR-Cas技术与此前肾癌的研究成果相结合,以达到更好地为肾癌临床诊疗服务的目标。

有研究<sup>[45]</sup>表明,抑癌基因*VHL*突变与肾透明细胞癌发生发展存在密切关系,90%的散发病例中存在*VHL*基因突变或沉默现象。Schokrpur等<sup>[46]</sup>在体外利用CRISPR-Cas9技术在RENCA肾癌细胞中敲除*VHL*,建立*VHL*阴性细胞株,发现敲除*VHL*基因后,细胞表型出现上皮间质转化现象,侵袭性增强。随后又建立*VHL*阴性小鼠模型,发现肿瘤细胞在体内转移性增强。该研究团体利用CRISPR-Cas9建立的*VHL*阴性小鼠模型,有许多与临床肾癌患者极为相似的特征,如与肿瘤转移相关的E-钙黏蛋白表达下降等,为探究肾透明细胞癌的发生发展机制、寻找潜在治疗靶点以及肿瘤标志物提供了新模型。

*VHL*基因突变可导致缺氧诱导因子(hypoxia induced factor, HIF)积聚,进而诱发缺氧反应,加剧癌症恶化。小分子化学药物HIF2 $\alpha$ 拮抗剂PT2399可抑制*VHL*阴性肾癌细胞的发生发展。Cho等<sup>[47]</sup>利用CRISPR-Cas9技术在不同*VHL*阴性细胞株中敲除*HIF2 $\alpha$* 基因,发现部分细胞株(如786-O和A-498)出现增殖抑制现象,部分细胞株(如UMRC-2和769-P)则没有,不同细胞株对PT2399的敏感性有所差异。因此,PT2399作为HIF2 $\alpha$ 拮抗剂在治疗肾透明细胞癌过程中,需要先结合HIF2 $\alpha$ 活性、P53状态等标志物情况来预测肿瘤对于药物的敏感性。

近年来研究<sup>[48]</sup>发现,除了*VHL*基因失活导致的泛素介导的蛋白裂解通路之外,PI3K/AKT通路在肾细胞癌的发生发展过程中也发挥着重要作用。Lin等<sup>[49]</sup>发现,在肾癌细胞和转移性肾癌细胞中*PI3KR1*表达下降,并且在786-O和A-498细胞株中利用CRISPR-Cas9技术敲除*PI3KR1*基因后,肿瘤细胞发生上皮间质转化,同时侵袭性、转移性增强。该研究提示*PI3KR1*可成为肾癌诊治过程中新的潜在靶点。

目前,CRISPR-Cas9基因编辑技术在泌尿系统肿瘤中的应用尚处于初期研究阶段,距离真正的临床应用还有较大距离。相信随着相关技术的完善与发展,CRISPR-Cas技术必将为泌尿系统肿瘤的诊疗提供新思路、新方法。

## 3 CRISPR基因编辑技术的新进展

二代测序技术的高速发展带动了众多基于测序技术的高通量测序数据呈爆炸式增长,CRISPR基因编辑术为大数据的基因功能学研究提供了有力工具。既可利用CRISPR系统建立精确的细胞模型,加速功能基因组学发展,揭示细胞机制并确证新的药物靶点,也可以用于开发更好的用药安全性测试的动物模型,进而改善治疗方案。

来自哈佛大学Broad研究院的研究人员研发出的CROP-seq(CRISPR droplet sequencing)技术,创造性地将CRISPR筛选与文库筛选结合起来,通过整合CRISPR基因编辑与单细胞RNA测序,平行确定多个基因的基因调控影响,在单个实验中研究数千个单细胞,可大规模完成前所未有的高通量基因调控分析<sup>[50]</sup>。

此外,科学家将CRISPR基因编辑技术与CAR-T免疫治疗相结合,利用快速基因编辑生成定制的自我细胞进行治疗。美国国家卫生研究院(NIH)重组DNA咨询委员会(RAC)去年批准了将在宾夕法尼亚大学进行的黑色素瘤靶向CAR-T临床试验,其中Cas9将用于敲除细胞编码PD1和内源性T细胞受体基因。中国也于前不久开始了CRISPR-Cas的第一次临床试验,该试验将使用CRISPR-Cas9技术敲除患有肺癌的个体的T细胞中的*PD-1*。而类似的试验,用于前列腺和膀胱癌以及肾细胞癌的*PD-1*敲除T细胞也即将开始,为癌症的诊治提供了新策略<sup>[48]</sup>。

## 4 结 语

CRISPR-Cas基因编辑技术具有高效、快速、易于操作等特点,与传统基因编辑技术相比,CRISPR/Cas9系统不仅提高了基因靶向修饰效率,也为疾病诊疗提供有力手段。然而,倘若要将其应用到临床中,仍需要解决脱靶切割等问题。由于CRISPR/Cas9

系统的向导 gRNA 片段与目标 DNA 片段只需 20 个核苷酸进行匹配,所以 gRNA 也很可能与目标外的其他片段结合。这种脱靶效应干扰了细胞内其他基因的稳定性,由此导致的非预期细胞生物问题也随之而来,比如降低基因敲除效率,出现细胞毒性,进而为肿瘤基因治疗带来不小的挑战。研究人员也探索了一系列方法,以期解决这些问题,如设计高特异性 sgRNA;除目标基因外,尽量避免在基因组中出现 sgRNA 后紧随 PAM 结构的情况等。CRISPR-Cas9 为近几年新研发出的基因编辑技术,还未完全成熟,不免仍存在一些问题,将其应用于临床诊疗中仍然任重而道远。但不能否定的是,CRISPR-Cas9 基因编辑技术的产生为生命科学研究领域中的里程碑事件,正经历着日新月异的飞速发展。相信随着此技术自身的不断完善、以及相关法律法规的制定实施,精准、高效的 CRISPR-Cas 技术必将在泌尿系肿瘤的分子分型、发展机制以及靶向治疗等领域发挥巨大作用。总之,CRISPR-Cas9 基因编辑技术在泌尿肿瘤研究中的应用前景是令人振奋的,但是将其应用于临床诊疗之中,仍然任重而道远。

## 参考文献

- [1] MALI P, YANG L, ESVELT K M, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 823-826. DOI: 10.1126/science.1232033.
- [2] JINEK M, EAST A, CHENG A, et al. RNA-programmed genome editing in human cells[J/OL]. *Elife*, 2013, 2: e00471[2017-06-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3557905/>. DOI: 10.7554/eLife.00471.
- [3] 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. DOI: 10.1126/science.1225829.
- [4] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823. DOI: 10.1126/science.1231143.
- [5] 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.
- [6] CHEN R, REN S, SUN Y. Genome-wide association studies on prostate cancer: the end or the beginning?[J]. *Protein Cell*, 2013, 4(9): 677-686. DOI: 10.1007/s13238-013-3055-4.
- [7] MAHFOUZ M M, LI L, SHAMIMUZZAMAN M, et al. De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(6): 2623-2628. DOI: 10.1073/pnas.1019533108.
- [8] KLUG A. The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation[J]. *Annu Rev Biochem*, 2010, 79(3): 213-231. DOI: 10.1146/annurev-biochem-010909-09505.
- [9] MAKAROVA K S, WOLF Y I, ALKHNASHI O S, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13(11): 722-736. DOI: 10.1038/nrmicro3569.
- [10] LABRIE S J, SAMSON J E, MOINEAU S. Bacteriophage resistance mechanisms[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8(5): 317-327. DOI: 10.1038/nrmicro2315.
- [11] JANSEN R, EMBDEN J D, GAASTRA W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes[J]. *Mol Microbiol*, 2002, 43(6): 1565-1575.
- [12] KUNIN V, SOREK R, HUGENHOLTZ P. Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats[J]. *Genome Biol*, 2007, 8(4): R61. DOI: 10.1186/gb-2007-8-4-r61.
- [13] BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. *Science*, 2007, 315(5819): 1709-1712. DOI: 10.1126/science.1138140.
- [14] 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.
- [15] VAN DER OOST J, JORE M M, WESTRA E R, et al. CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes[J]. *Trends Biochem Sci*, 2009, 34(8): 401-407. DOI: 10.1016/j.tibs.2009.05.002.
- [16] BHAYA D, DAVISON M, BARRANGOU R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation[J]. *Annu Rev Genet*, 2011, 45(4): 273-297. DOI: 10.1146/annurev-genet-110410-132430.
- [17] 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.
- [18] DEVEAU H, BARRANGOU R, GARNEAU J E, et al. Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*[J]. *J Bacteriol*, 2008, 190(4): 1390-1400. DOI: 10.1038/nrmicro3279.
- [19] MOJICA F J, DIEZ-VILLASENOR C, GARCIA-MARTINEZ J, et al. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system[J]. *Microbiology*, 2009, 155(Pt 3): 733-740. DOI: 10.1099/mic.0.023960-0.
- [20] HYNES A P, VILLION M, MOINEAU S. Adaptation in bacterial CRISPR-Cas immunity can be driven by defective phages[J/OL]. *Nat Commun*, 2014, 5: 4399[2017-06-01]. <http://qy3ng8dx8g.search.serialssolutions.com/?V=1.0&sid=PubMed:LinkOut&pmid=25056268>. DOI: 10.1038/ncomms5399.
- [21] HELER R, SAMAI P, MODELL J W, et al. Cas9 specifies functional viral targets during CRISPR-Cas adaptation[J]. *Nature*, 2015, 519(7542): 199-202. DOI: 10.1038/nature14245.
- [22] DIEZ-VILLASENOR C, GUZMAN N M, ALMENDROS C, et al. CRISPR-spacer integration reporter plasmids reveal distinct genuine acquisition specificities among CRISPR-Cas I-E variants of *Escherichia coli*[J]. *RNA Biol*, 2013, 10(5): 792-802. DOI: 10.4161/rna.24023.
- [23] BROUNS S J, JORE M M, LUNDGREN M, et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes[J]. *Science*, 2008, 321(5891): 960-964. DOI: 10.1126/science.1159689.
- [24] HAURWITZ R E, JINEK M, WIEDENHEFT B, et al. Sequence- and structure-specific RNA processing by a CRISPR endonuclease[J]. *Science*, 2010, 329(5997): 1355-1358. DOI: 10.1126/science.1192272.

- [25] CANCER GENOME ATLAS RESEARCH N. The molecular taxonomy of primary prostate cancer[J]. *Cell*, 2015, 163(4): 1011-1025. DOI: 10.1016/j.cell.2015.10.025.
- [26] BOSE R, ABIDA W, KARTHAUS W, et al. Loss of function mutations of an ETS repressor expand the ETS positive subset of prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(13):1538-1544. DOI: 10.1158/1538-7445.
- [27] BANERJEE S, LI G, LI Y, et al. RNase L is a negative regulator of cell migration[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(42): 44360-44372. DOI: 10.18632/oncotarget.6246.
- [28] HO T T, ZHOU N, HUANG J, et al. Targeting non-coding RNAs with the CRISPR/Cas9 system in human cell lines[J/OL]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(3): e17[2017-06-01].<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC414344/>. DOI: 10.1093/nar/gku1198.
- [29] SHUKLA S, ZHANG X, NIKNAFS Y S, et al. Identification and validation of pcat14 as prognostic biomarker in prostate cancer[J]. *Neoplasia*, 2016, 18(8): 489-499. DOI: 10.1016/j.neo.2016.07.001.
- [30] KAWAMURA N, NIMURA K, NAGANO H, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene knockout of NANOG and NANOGP8 decreases the malignant potential of prostate cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(26): 22361-22374. DOI: 10.18632/oncotarget.4293.
- [31] MU P, ZHANG Z, BENELLI M, et al. SOX2 promotes lineage plasticity and antiandrogen resistance in TP53- and RB1-deficient prostate cancer[J]. *Science*, 2017, 355(6320): 84-88. DOI: 10.1126/science.aah4307.
- [32] BISHOP J L, THAPER D, VAHID S, et al. The master neural transcription factor brn2 is an androgen receptor-suppressed driver of neuroendocrine differentiation in prostate cancer[J]. *Cancer Discov*, 2017, 7(1): 54-71. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-15-1263.
- [33] BELTRAN H, SBONER A, MOSQUERA J M, et al. Precision medicine program for whole-exome sequencing (WES) provides new insight on platinum sensitivity in advanced prostate cancer (PCa)[J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(7):158-164. DOI: 10.1200/jco.2015.33.7\_suppl.158.
- [34] ZHEN S, TAKAHASHI Y, NARITA S, et al. Targeted delivery of CRISPR/Cas9 to prostate cancer by modified gRNA using a flexible aptamer-cationic liposome[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(6): 9375-9387. DOI: 10.18632/oncotarget.14072.
- [35] LIU Y, ZENG Y, LIU L, et al. Synthesizing AND gate genetic circuits based on CRISPR-Cas9 for identification of bladder cancer cells[J/OL]. *Nat Commun*, 2014, 5: 5393[2017-06-01]. <http://qy3ng8dx8g.search.serialssolutions.com/?V=1.0&sid=PubMed:LinkOut&pmid=25373919>. DOI: 10.1038/ncomms6393.
- [36] AHN J, KIM K H, PARK S, et al. Target sequencing and CRISPR/Cas editing reveal simultaneous loss of UTX and UTY in urothelial bladder cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(39): 63252-63260. DOI: 10.18632/oncotarget.11207.
- [37] JIANG G, WU A D, HUANG C, et al. Isorhapontigenin (ISO) inhibits invasive bladder cancer formation in vivo and human bladder cancer invasion in vitro by targeting STAT1/FOXO1 axis[J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2016, 9(7): 567-580. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-15-0338.
- [38] RICARDO-GONZALEZ R R, NGUYEN M, GOKDEN N, et al. Plasmacytoid carcinoma of the bladder: a urothelial carcinoma variant with a predilection for intraperitoneal spread[J]. *J Urol*, 2012, 187(3): 852-855. DOI: 10.1016/j.juro.2011.10.145.
- [39] AL-AHMADIE H A, IYER G. Frequent somatic CDH1 loss-of-function mutations in plasmacytoid variant bladder cancer[J]. *Nat Genetics*, 2016, 48(4): 356-358. DOI:10.1038/ng.3503.
- [40] YANG Z, LI C, FAN Z, et al. Single-cell sequencing reveals variants in ARID1A, GPRC5A and MLL2 driving self-renewal of human bladder cancer stem cells[J]. *Eur Urol*, 2017, 71(1): 8-12. DOI: 10.1016/j.eururo.2016.06.025.
- [41] ZHEN S, HUA L, LIU Y H, et al. Inhibition of long non-coding RNA UCA1 by CRISPR/Cas9 attenuated malignant phenotypes of bladder cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(6): 9634-9646. DOI: 10.18632/oncotarget.14176.
- [42] EVERS B, JASTRZEBSKI K, HEIJMANS J P, et al. CRISPR knockout screening outperforms shRNA and CRISPRi in identifying essential genes[J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(6): 631-633. DOI: 10.1038/nbt.3536.
- [43] YANG K W, XIONG G Y, LI X S, et al. Prevalence of baseline chronic kidney disease in 2,769 Chinese patients with renal cancer: nephron-sparing treatment is still underutilized[J]. *World J Urol*, 2014, 32(4): 1027-1031. DOI: 10.1007/s00345-013-1178-0.
- [44] SINGER E A, GUPTA G N, SRINIVASAN R. Update on targeted therapies for clear cell renal cell carcinoma[J]. *Curr Opin Oncol*, 2011, 23(3): 283-289. DOI: 10.1097/CCO.0b013e32834479c0.
- [45] MOORE L E, NICKERSON M L, BRENNAN P, et al. Von Hippel-Lindau (VHL) inactivation in sporadic clear cell renal cancer: associations with germline VHL polymorphisms and etiologic risk factors[J/OL]. *PLoS Genet*, 2011, 7(10): e1002312[2017-06-01].<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3192834/>. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002312.
- [46] SCHOKRPUR S, HU J, MOUGHON D L, et al. CRISPR-mediated VHL knockout generates an improved model for metastatic renal cell carcinoma[J/OL]. *Sci Rep*, 2016, 6: 29032[2017-06-01]. <http://europepmc.org/backend/ptpmcrender.fegi?accid=PMC4928183&blotype=pdf>. DOI: 10.1038/srep29032.
- [47] CHO H, DU X, RIZZI J P, et al. On-target efficacy of a HIF-2alpha antagonist in preclinical kidney cancer models[J]. *Nature*, 2016, 539(7627): 107-111. DOI: 10.1038/nature19795.
- [48] Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma[J]. *Nature*, 2013, 499(7456): 43-49. DOI: 10.1038/nature12222.
- [49] LIN Y, YANG Z, XU A, et al. PIK3R1 negatively regulates the epithelial-mesenchymal transition and stem-like phenotype of renal cancer cells through the AKT/GSK3beta/CTNNB1 signaling pathway[J/OL]. *Sci Rep*, 2015, 5: 8997[2017-06-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4355729/>. DOI: 10.1038/srep08997.
- [50] FELLMANN C, GOWEN B G, LIN P C, et al. Cornerstones of CRISPR-Cas in drug discovery and therapy[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(2): 89-100. DOI: 10.1038/nrd.2016.238.

[收稿日期] 2017-10-22

[修回日期] 2017-11-27

[本文编辑] 王映红