

DOI: 10.13376/j.cblls/2019089

文章编号: 1004-0374(2019)07-0731-08

# CRISPR/Cas9基因编辑技术在前列腺癌研究中的进展

胡坤<sup>1</sup>, 刘雨函<sup>2</sup>, 肖俊文<sup>2</sup>, 廖新惠<sup>2</sup>, 陈杰青<sup>2</sup>, 张仲富<sup>2</sup>, 吴建挺<sup>2</sup>, 梅红兵<sup>1,2\*</sup>

(1 安徽医科大学深圳市第二人民医院临床医学院泌尿外科, 深圳 518000; 2 深圳市第二人民医院泌尿外科, 深圳大学第一附属医院泌尿外科, 深圳市泌尿生殖系统肿瘤研究重点实验室, 深圳 518000)

**摘要:** CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR-associated protein 9) 基因编辑技术是基于细菌和古细菌适应性免疫防御系统发展而来的一种基因编辑工具。Cas9 蛋白借助 gRNA 的引导靶向目标基因进而实现对目标基因精确、高效的编辑。因其具有操作简单、成本低的特点, 被研究人员广泛应用, 并在前列腺癌相关基因及信号通路的研究中发挥着重要作用。该文将对 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的发展、作用机理及其在前列腺癌研究中的应用进展进行综述。

**关键词:** CRISPR/Cas9; Cas9 蛋白; 前列腺癌; 基因编辑

**中图分类号:** Q78; R737.25 **文献标志码:** A

## Progress of CRISPR/Cas9 gene editing technology in prostate cancer

HU Kun<sup>1</sup>, LIU Yu-Han<sup>2</sup>, XIAO Jun-Wen<sup>2</sup>, LIAO Xin-Hui<sup>2</sup>, CHEN Jie-Qing<sup>2</sup>,  
ZHANG Zhong-Fu<sup>2</sup>, WU Jian-Ting<sup>2</sup>, MEI Hong-Bing<sup>1,2\*</sup>

(1 Urology Department, Shenzhen Second People's Hospital, Clinical Medicine College of Anhui Medical University, Shenzhen 518000, China; 2 Key Laboratory of Medical Reprogramming Technology, Shenzhen Second People's Hospital, The First Affiliated Hospital of Shenzhen University, Shenzhen 518000, China)

**Abstract:** CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR-associated protein 9) technology is a gene editing tool based on the development of bacterial and archaeal adaptive immune defense systems. The Cas9 protein targets the gene by gRNA guidance to achieve accurate and efficient editing of the target genes. Because of its simple operation and low cost, it is widely used and plays an important role in the research of prostate cancer related genes and signaling pathways. Here, we briefly introduce the development process and mechanism of the CRISPR/Cas9 as well as summarize its application in the research of prostate cancer.

**Key words:** CRISPR/Cas9; Cas9 protein; prostate cancer; gene editing

近年来, 研究者们通过高通量基因测序技术发掘了大量前列腺癌相关的基因, 而这些基因通过何种机制影响前列腺癌亟待明确。基因编辑技术可以调控基因在前列腺癌细胞中的表达, 为探索相关基因在前列腺癌中的功能提供了巨大的帮助。目前已有多种技术可以实现对基因的编辑, 包括锌指核酸内切酶 (zinc finger endonuclease, ZFN)<sup>[1]</sup>、类转录激活因子效应物核酸酶 (transcription activator like effector nuclease, TALEN)<sup>[2]</sup>、CRISPR/Cas9 基因编辑技术。其中 CRISPR/Cas9 基因编辑技术更加经济高效且易于实现<sup>[3]</sup>, 已被广泛应用于各种肿瘤的研究中<sup>[4-7]</sup>。

联合 CRISPR/Cas9 基因编辑技术和 CAR-T (chimeric antigen receptor-T) 免疫疗法在人类急性淋巴细胞白血病和急性髓系白血病等血液系统肿瘤的治疗上更是取得了突破性的进展<sup>[8-9]</sup>。目前 CRISPR/Cas9 基因编辑技术应用于前列腺癌的研究逐年增多, 本文旨在总结这一技术应用于前列腺癌的最新研究进展, 浅析 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的相关作用机制。

收稿日期: 2018-11-04; 修回日期: 2019-04-04

基金项目: 深圳市卫生计生系统科研项目(201601025)

\*通信作者: E-mail: hbmei68@163.com

## 1 CRISPR/Cas系统简介

### 1.1 CRISPR/Cas系统的发现

1987年,日本科学家首次在大肠杆菌基因组中发现了一些不明串联重复序列,但未能进一步理解其生物学意义<sup>[10]</sup>。研究发现,许多细菌及古细菌基因组均含有一个独特的DNA重复序列家族,其间由长度相似的重复序列和间区序列间隔排列构成。起初,研究者将这些结构命名为短规律间隔重复序列(short regularly spaced repeats, SRSR)。后来,这个名称被改为成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)并沿用至今<sup>[11]</sup>。2005年, Bolotin等<sup>[12]</sup>在研究嗜热链球菌时发现噬菌体易感性与CRISPR间隔序列数量具有相关性,同时,他们首次提出间隔序列的获取与嗜热链球菌中原间隔序列相关基序密切相关,这一见解暗示了识别外源性核酸所需的特异性结构,即原间区邻近基序(proto-spacer adjacent motifs, PAMs)。2007年, Barrangou等<sup>[13]</sup>通过实验证明了CRISPR系统确实是一种适应性免疫系统,他们发现通过修饰细菌所整合的噬菌体基因序列可以改变细菌对噬菌体的抗性。2008年, Brouns等<sup>[14]</sup>发现, CRISPR原间区序列转录成的非编码RNA(CRISPR RNA, crRNA)可以将Cas蛋白引导到DNA的靶标特异性部分发挥防御作用。2011年 Deltcheva等<sup>[15]</sup>发现了反式激活RNA(trans-activating RNA, tracrRNA),它是CRISPR序列附近与crRNA前体的重复区具有24个核苷酸的互补性的小RNA, tracrRNA可与crRNA互补结合形成双链RNA,成熟后双链RNA将Cas9蛋白引导至目标DNA序列中诱导特异性双链断裂,因此,上述双链RNA又被称为gRNA(guide RNA)。2012年, RNA学专家 Charpentier和酶学专家 Jennifer Doudna 两组团队合作进一步将双链RNA简化为单链RNA(single-guide RNA, sgRNA)<sup>[16]</sup>,并证明单链RNA也可以发挥引导切割目标DNA的功能,且效率更高。2013年,张锋团队和 Church团队将II型Cas系统用于哺乳动物细胞中DNA的切割<sup>[17-18]</sup>,为此后CRISPR/Cas9系统作为广泛适用的基因组编辑工具奠定了基础。2013年, Jennifer Doudna团队首次开发的一种丧失核酸酶活性的Cas9蛋白突变体dCas9(endonuclease-deficient Cas9)受到广泛关注<sup>[19]</sup>。失去剪切作用的dCas9仍然可以结合DNA序列,当dCas9结合靶基因的转录起始位点时,dCas9系统可以利用融合的转录调节因子来抑制或诱导基因转录,进而实现

CRISPR干扰(CRISPRi)和激活(CRISPRa)效应<sup>[20]</sup>。

### 1.2 CRISPR/Cas系统的分类

Makarova等<sup>[21]</sup>发现,自然界中主要存在3种类型的CRISPR/Cas系统;而CRISPR/Cas系统发挥功能必须借助成熟的crRNA与Cas蛋白结合所形成的稳定的crRNP(CRISPR ribonucleoprotein)复合物<sup>[22-23]</sup>。其中I型和III型系统中前体crRNA(pre-crRNA)的成熟需要依赖多种特异的Cas因子<sup>[24-25]</sup>,成熟后的crRNA与相应的Cas蛋白组装成crRNP复合物,识别和切割与crRNA互补的靶标区域<sup>[16]</sup>。然而,I型和III型系统所涉及的Cas蛋白种类繁多,机制较为复杂,研究者还很难加以运用。II型系统则通过不同的机制处理pre-crRNA<sup>[15]</sup>,其中pre-crRNA和tracrRNA结合形成双链RNA,触发特异性RNA内切酶III活性,从而形成成熟的crRNA。II型系统相对较为简单,仅需要Cas9一种Cas蛋白即可与成熟的crRNA组装成crRNP复合物发挥作用<sup>[26]</sup>,因此得到更广泛的研究和应用。

### 1.3 CRISPR/Cas系统的生理功能及基因编辑机理

CRISPR/Cas9系统在一些细菌和古细菌中发挥着抵御和破坏外源核酸的生理作用。来自病毒的外源核酸初次入侵宿主菌时,CRISPR/Cas9系统会从外源核酸序列捕获一段序列整合成宿主基因座中新的间隔序列<sup>[27]</sup>。当相同病毒再次入侵时,CRISPR中新的间隔序列可以通过互补配对识别入侵的DNA序列,这些能够识别入侵DNA序列的间隔序列前体(prospacers)经过转录和加工成为成熟的crRNA,并与tracrRNA配对形成双链gRNA<sup>[28]</sup>。紧接着gRNA引导Cas9蛋白识别PAMs<sup>[16]</sup>,当Cas9蛋白结合到外源的DNA序列后,促使外源的DNA双链打开,Cas9蛋白的两个结构域诱导双链断裂(double strand break, DSB)<sup>[29]</sup>,进而实现了破坏外来核酸的生理功能。研究人员受到CRISPR/Cas9系统在细菌和古细菌内发挥生理作用的启示,将其改造为一种重要的基因工程工具,在各种细胞中实现了基因编辑功能。CRISPR/Cas9系统在细胞内实现基因编辑需要依赖3个重要的元件,包括Cas9蛋白、crRNA及与之互补的tracrRNA,而经过简化后则只需要将由crRNA和tracrRNA融合形成的sgRNA及Cas蛋白转入目标细胞中。待这些元件发挥作用,特异性实现目标DNA序列的DSB后,宿主细胞会通过两种修复方式来修复断端<sup>[30]</sup>。一种通过引起随机的小片段插入或者缺失的形式修复,称为非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ);另

一种则是通过提供模板 DNA 序列来修复断端, 称为同源重组介导的修复 (homology-directed repair, HDR)。通过对断端的修复进而实现对基因的编辑, 包括目标基因的敲除和外源基因的敲入<sup>[31]</sup>(图 1)。

## 2 CRISPR/Cas9基因编辑技术在前列腺癌中的应用现状

前列腺癌是男性健康的杀手, 在欧美发达国家中已成为男性肿瘤发病率第一位、死亡率第二位的肿瘤<sup>[32]</sup>, 而我国前列腺癌的发病率也处于上升趋势。尽管前列腺癌的治疗手段多样, 但其预后仍不理想。早期诊断前列腺癌并从根本上弄清前列腺癌的发生发展机制, 才能实现对前列腺癌的精准治疗。随着对前列腺癌发生发展分子机制研究的不断开展, 人们对前列腺癌涉及的信号通路、非编码 RNA 以及单核苷酸多态性等方面有了一定的了解, 而 CRISPR/Cas9 基因编辑技术无疑为更深入地研究相关机制提供了有力的手段(表 1)。

### 2.1 CRISPR/Cas9基因编辑技术靶向雄激素受体及去势治疗相关通路

雄激素受体 (androgen receptor, AR) 是配体激活的核转录因子的类固醇激素受体家族的成员, 雄激素主要通过其对雄激素受体 (AR) 的作用发挥功

能, AR 介导的相关通路调控着前列腺癌的发生发展, 抑制其功能可能有助于减缓前列腺癌的进展。临床上治疗前列腺癌的标准方法——雄激素剥夺疗法 (androgen deprivation therapy, ADT) 即依据这一原理, 而 ADT 治疗面临的问题是患者在接受 ADT 治疗若干年后会逐渐进展为去势抵抗性前列腺癌 (castration-resistant prostate cancer, CRPC)<sup>[33-34]</sup>。探索 AR 受体相关通路在去势抵抗性前列腺癌中的潜在机制变得尤为重要, 而 CRISPR/Cas9 基因编辑技术无疑为相关研究提供了重要的工具。Wei 等<sup>[35]</sup>发现, AR-sgRNA 引导的 CRISPR/Cas9 系统能够破坏 AR 基因的特定位置, 并抑制雄激素敏感的前列腺癌细胞的生长, 提示 CRISPR/Cas9 基因编辑技术可能成为将来基因治疗前列腺癌的重要手段。Liu 等<sup>[36]</sup>发现, 半胱氨酸-X-半胱氨酸基序趋化因子受体 7 (cysteine-X-cysteine chemokine receptor7, CXCR7) 在前列腺癌中过度表达, 其通过增强表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 介导的促有丝分裂信号转导, 进而促进肿瘤细胞存活。AR 可以作用于 CXCR7 启动子从而抑制其转录, 而雄激素剥夺或 AR 抑制显著增加雄激素反应性前列腺癌细胞系中的 CXCR7 表达。研究人员运用 CRISPR/Cas9 基因编辑敲除 CXCR7 表达会导致细胞增殖停

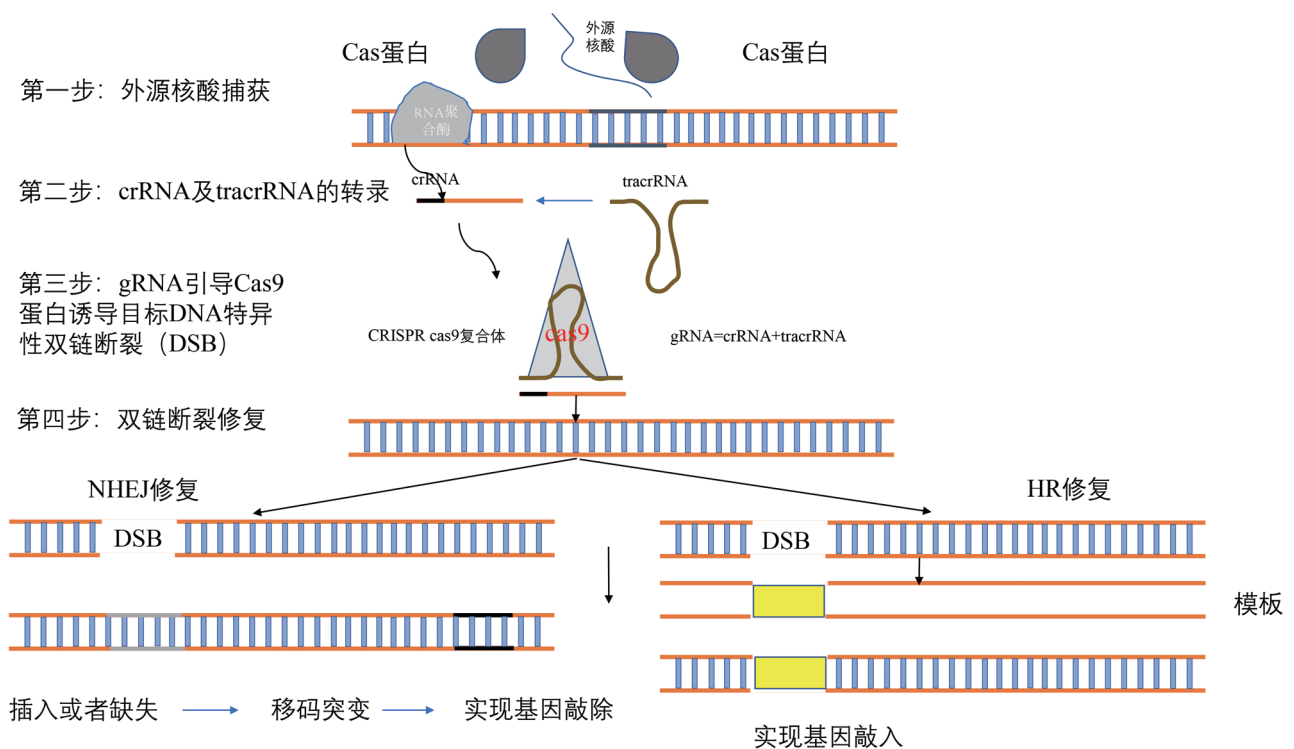


图1 CRISPR/Cas9系统工作原理图

表1 CRISPR/Cas9基因编辑技术在前列腺癌中的应用

作用方式	细胞类型	编辑基因	结果	参考文献
AR受体相关通路	LNCaP细胞	敲除AR基因	抑制雄激素敏感的前列腺癌细胞的生长	[35]
	C4-2B、LNCaP细胞	敲除CXCR7	细胞增殖停止, 诱发细胞衰老	[36]
	C4-2细胞	敲除ATM	细胞重新获得恩杂鲁胺治疗敏感性	[37]
肿瘤微环境通路	LNCaP、293T细胞	敲除PHF8	缺氧信号通路受到明显抑制	[39]
	22Rv1细胞	敲除ASIC1	显著降低前列腺癌细胞的侵袭能力和去势抵抗性	[41]
非编码RNA	PC-3细胞	敲除LINC01116	细胞的存活和增殖严重受损	[42]
	PC-3、LNCaP细胞	过表达PCAT14	过表达可以抑制PC-3和LNCaP细胞的侵袭能力	[43]
	DU145细胞	敲除TTY15	肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭能力均受到抑制	[44]
单核苷酸多态性	RWPE-1细胞	敲除染色体7p15.2 高危SNPs区域	HOXA13表达上调, 并进一步引起前列腺癌基因 (GATA2)过表达	[47]
	LNCaP细胞	敲除rs2742624区域	靶基因UPK3A的表达明显下调, 前列腺癌风险升高	[49]
	22Rv1细胞	编辑rs11672691的 基因型从G/A转 换为G/G或A/A	G等位基因增强PCAT19和CEACAM21的表达, 进 而增强肿瘤细胞侵袭能力	[50]

止,严重影响EGFR信号转导并且会诱发细胞衰老。这一结果提示了雄激素剥夺疗法后出现去势抵抗的潜在机制,靶向CXCR7并联合雄激素剥夺疗法将会起到预防雄激素非依赖性前列腺癌的作用。

然而,对于那些已经进展为扩散或复发的晚期去势抵抗前列腺癌的患者,其体内的前列腺癌细胞逐渐对去势治疗及恩杂鲁胺治疗表现出抗性。Yin等<sup>[37]</sup>研究发现,N-Myc通过下游信号通路(N-Myc/miR-421/ATM)驱动前列腺癌的治疗抗性。在这一通路调控下,雄激素应答阶段的前列腺癌细胞下调ATM(ataxia telangiectasia-mutated,共济失调毛细血管扩张突变基因)表达可以克服ADT诱导的衰老,并促进ADT抗性癌细胞的生长。当发展为雄激素非依赖性CRPC阶段时,上调ATM表达有助于癌细胞产生恩杂鲁胺抗性并促进CRPC细胞的迁移能力。他们运用CRISPR敲除ATM,使N-Myc过表达的CRPC细胞重新获得恩杂鲁胺治疗敏感性,这可能提示了ATM抑制剂联合恩杂鲁胺这一治疗策略在N-Myc过表达的去势抵抗前列腺癌治疗中的潜在价值。

## 2.2 CRISPR/Cas9基因编辑技术靶向前列腺癌肿瘤微环境相关通路

缺氧环境在肿瘤血管的生成、细胞凋亡抗性的改变、基因组不稳定以及代谢方式转变等方面起到重要作用<sup>[38]</sup>。缺氧信号通路的调控对前列腺癌的发生发展意义重大。PHD锌指蛋白8(plant homeodomain finger protein 8, PHF8)是一种组蛋白去甲基化酶,可以促进肿瘤细胞间质转化及细胞周期进程,并可

抑制细胞的凋亡。Maina等<sup>[39]</sup>研究发现,PHF8在前列腺癌缺氧信号通路中起到重要的调节作用。他们运用RNAi(RNA干扰)技术敲低LNCaP中PHF8的表达,运用CRISPR/Cas9系统敲除293T细胞中PHF8的表达,发现缺氧信号通路受到明显抑制。这项工作揭示了低氧信号的表现遗传机制,为进一步评估PHF8抑制剂在前列腺癌治疗中的作用奠定了基础。

肿瘤细胞的缺氧环境常常导致肿瘤细胞内酸性代谢产物的蓄积,细胞内pH降低,因而肿瘤细胞通过Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>离子交换通道及碳酸酐酶升高细胞内的pH,降低细胞外的pH值。Damaghi等<sup>[40]</sup>研究发现,胞外的酸性环境不仅没有抑制肿瘤细胞的生长,反而有助于其转移和侵袭。Chen等<sup>[41]</sup>发现,酸敏感离子通道1(acid-sensing ion channel 1, ASIC1)参与了前列腺癌细胞酸介导的信号通路(acidosis-induced cellular signaling),并且在前列腺癌细胞中表达升高,通过CRISPR/Cas9系统敲除ASIC1可以显著降低前列腺癌细胞的侵袭能力和去势抵抗性。上述研究提示,通过CRISPR/Cas9基因编辑技术调节前列腺癌肿瘤微环境相关的信号通路可能会起到治疗前列腺癌的作用,为前列腺癌的治疗提供新方向。

## 2.3 CRISPR/Cas9基因编辑技术靶向前列腺癌相关肿瘤标志物

### 2.3.1 靶向前列腺癌相关非编码RNA

非编码RNA是指生物体内不编码蛋白质的RNA,近年来研究人员发现非编码RNA异常表达

和肿瘤的发生发展有着密切的联系, 并且指出非编码 RNA 可作为前列腺癌的肿瘤标志物。利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术改变非编码 RNA 在肿瘤细胞中的表达, 极大地方便了肿瘤的机制研究。Beaver 等<sup>[42]</sup>为了验证蔬菜中的萝卜硫素 (sulforaphane) 可通过影响长链非编码 RNA (long-chain non-coding RNA, lncRNA) 的表达预防肿瘤的假设, 他们尝试使用 CRISPR/Cas9 编辑技术敲除前列腺癌 PC-3 细胞中的 LINC01116, 观察一段时间后发现这些细胞的存活和增殖严重受损; 进一步的实验证明萝卜硫素可以显著下调细胞中 LINC01116 表达, 从而揭示了萝卜硫素影响前列腺癌发生的重要机制, 提示 LINC01116 可以作为前列腺癌肿瘤标记物。Shukla 等<sup>[43]</sup>发现, lncRNA PCAT14 在晚期前列腺癌中的表达较低, 并且其表达预示更好的预后, 所以推测 PCAT14 可能具有肿瘤抑制作用。为了验证这一假设, 他们将 CRISPR/Cas9 协同活化介导复合物 (synergistic activation mediator, SAM) 转入细胞内构建了稳定高表达 PCAT14 的 PC-3 和 LNCaP 细胞。CRISPR/Cas9-SAM 是一种工程蛋白质复合物, 可用于内源基因的转录激活, 其通过特殊修饰的 sgRNA 靶向目的基因并帮助启动子招募人工转录因子, 进而促使基因的内源性过表达。构建了稳定表达 PCAT14 的 PC-3 和 LNCaP 细胞后, 他们发现 PCAT14 过表达对 PC-3 或 LNCaP 细胞增殖没有显著作用, 但 PCAT14 的过表达可以抑制 PC-3 和 LNCaP 细胞的侵袭能力, 表明 PCAT14 可以作为前列腺癌预后的重要标志物。随着对前列腺癌相关研究的深入, 越来越多的遗传因素已被证明与前列腺癌的发生和进展有关, 研究人员开始对 Y 染色体中与前列腺癌相关的非编码 RNA 产生兴趣。Sun 等<sup>[44]</sup>发现, Y 染色体 lncRNA TTTY15 在大多数前列腺癌组织中上调。他们使用两种 CRISPR/Cas9 策略, 一种直接敲除前列腺癌细胞系 DU145 中的大部分 TTTY15 序列, 另一种则是通过敲入“转录终止子”序列实现 TTTY15 敲除 (TTY15 knockout) 细胞克隆, 结果发现两组肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭能力均受到了抑制。这一结果说明 TTTY15 可能成为未来前列腺癌治疗的潜在靶点。

### 2.3.2 靶向前列腺癌相关单核苷酸多态性

单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 是基因组中单个核苷酸变异引起的 DNA 序列的多态性改变, 包括单个碱基的转换、颠换和缺失。SNPs 是前列腺癌易感性差异的重要因素<sup>[45]</sup>,

同时还可以作为前列腺癌诊断和预后的标志物<sup>[46]</sup>。Luo 等<sup>[47]</sup>发现人类染色体 7p15.2 中存在重要的前列腺癌风险区域, 这一区域存在重要的前列腺癌相关的 SNPs, 并且该区域与 HOXA13 基因座存在长程相互作用。他们使用 CRISPR/Cas9 系统敲除了这一包含有前列腺癌相关 SNPs 的 4 kb 区域, 发现 HOXA13 表达上调, 并可进一步引发下游前列腺癌基因的过表达, 进而影响前列腺癌的发生发展。Jin 等<sup>[48]</sup>猜测功能性 SNPs 可以存在于细胞特异的调控元件中, 这些调控元件介导关键转录因子 (transcription factors, TFs) 的结合, 继而导致靶基因表达的改变。UPK3A (Human uroplakin 3 A) 被认为是泌尿系肿瘤重要的分子标记物, 与前列腺癌的发生相关<sup>[49]</sup>, 而 rs2742624 可能存在于 UPK3A 上游的增强子区域中。研究人员为了验证 rs2742624 与 UPK3A 的关系, 使用 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术敲除了含有 rs2742624 的区域, 观察到其靶基因 UPK3A 的明显下调。这一结果提示 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术可以用于筛选前列腺癌相关的 SNPs 及其靶基因的研究。来自芬兰的一组研究人员发现, SNP rs11672691 与前列腺癌的侵袭性密切相关<sup>[50]</sup>, 他们运用 CRISPR/Cas9 基因组编辑方法成功将前列腺癌细胞系 22Rv1 中 rs11672691 的基因型从 G/A 转换为 G/G 或 A/A, 发现 rs11672691 的风险 G 等位基因有助于增强 PCAT19 和 CEACAM21 的表达, 而 CEACAM21 和 PCAT19 不仅是前列腺癌易感基因, 还与前列腺癌侵袭性表型密切相关, 这一结果提示, SNPs 有望成为前列腺癌患者风险分层管理的标志物。同时, 他们认为与早先 TALEN 改变 SNPs 的基因型相比<sup>[51]</sup>, CRISPR/Cas9 更有效、更准确, 并且更易于优化单核苷酸编辑。

## 3 CRISPR/Cas9基因编辑技术当前面临的阻碍

CRISPR/Cas9 基因编辑技术的应用仍需要克服几个关键问题。首先, CRISPR/Cas9 基因编辑的特异性尚待提高, 脱靶编辑时有报道<sup>[52]</sup>。尽管研究者们发现通过使用 Cas9 蛋白高特异性变体<sup>[53-54]</sup>, 以及寻找其他种系的 Cas9 蛋白<sup>[55]</sup>, 可以有效降低脱靶效应带来的问题, 但是为了达到更精确、更安全的编辑效果, 脱靶效应仍需要进一步地改进。再者, 将 CRISPR/Cas9 基因编辑用于体内治疗面临的问题是如何更高效、更有针对性地将 CRISPR/Cas9 系统相关组件转入体内。目前主要通过非病毒载体和病毒载体两种方式。腺相关病毒 (adeno-associated virus,

AAV) 载体虽然具有很高的转导效率, 并且与大部分人群血清学相容, 但是因为容量有限, Cas9 和 sgRNA 需要在不同的载体上编码<sup>[56]</sup>。非病毒载体则是通过纳米粒子作为载体<sup>[57-58]</sup>, 而通过脂质纳米粒子作为载体用于人体细胞尚处于实验阶段。Zhen 等<sup>[59]</sup>设计了一种灵活的适配体-脂质体-CRISPR/Cas9 嵌合体, 将阳离子脂质体与 RNA 适配体连接, 通过 RNA 适配体特异性地结合前列腺癌特异膜抗原, 进而将 CRISPR/Cas9 系统组件靶向运输至前列腺癌细胞中, 并发挥了其作用。该实验为脂质体呈递 CRISPR/Cas9 系统提供了新方法, 但是这种方法尚未得到普遍应用, 仍需要更进一步研究。

#### 4 总结与展望

CRISPR/Cas9 基因编辑技术已逐渐成为生命科学领域不可缺少的有力武器, 在前列腺癌相关机制的研究中也大放异彩。无论是单个核苷酸的编辑<sup>[50]</sup>, 还是大片段核苷酸序列的敲除与敲入<sup>[44]</sup>, 甚至在染色质环这一三维结构域中进行基因编辑进而改变基因组拓扑结构<sup>[60-61]</sup>, CRISPR/Cas9 基因编辑技术都展现出其独特的优势。尽管 CRISPR/Cas9 系统在前列腺癌中的应用主要集中在体外培养细胞中相关信号通路的研究, 但随着研究人员的不断探索, 未来会有更多的突破。运用 CRISPR/Cas9 技术探索前列腺癌相关基因在所涉及信号通路中的重要功能, 明确非编码 RNA 及单核苷酸多态性在前列腺癌发生发展中的作用, 极大地推动了前列腺癌的研究。虽然将 CRISPR/Cas9 基因编辑技术应用于前列腺癌的诊疗仍存在许多方面的困难, 但是随着研究的不断深入, 相信 CRISPR/Cas9 基因编辑技术会在前列腺癌的诊断、治疗、靶向药物的筛选以及耐药机制的探究等众多方面发挥巨大作用。

#### [参 考 文 献]

- [1] Bhakta MS, Henry IM, Ousterout DG, et al. Highly active zinc-finger nucleases by extended modular assembly. *Genome Res*, 2013, 23: 530-8
- [2] Joung JK, Sander JD. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14: 49-55
- [3] Sakuma T, Woltjen K. Nuclease-mediated genome editing: at the front-line of functional genomics technology. *Dev Growth Differ*, 2014, 56: 2-13
- [4] Schokrpur S, Hu J, Moughon DL, et al. CRISPR-mediated VHL knockout generates an improved model for metastatic renal cell carcinoma. *Sci Rep*, 2016, 6: 29032
- [5] Annunziato S, Kas SM, Nethe M, et al. Modeling invasive lobular breast carcinoma by CRISPR/Cas9-mediated somatic genome editing of the mammary gland. *Genes Dev*, 2016, 30: 1470-80
- [6] Zuckermann M, Hovestadt V, Knobbe-Thomsen CB, et al. Somatic CRISPR/Cas9-mediated tumour suppressor disruption enables versatile brain tumour modelling. *Nat Commun*, 2015, 6: 7391
- [7] Wallace J, Hu R, Mosbrugger TL, et al. Genome-wide CRISPR-Cas9 screen identifies microRNAs that regulate myeloid leukemia cell growth. *PLoS One*, 2016, 11: e0153689
- [8] Kim MY, Yu KR, Kenderian SS, et al. Genetic inactivation of CD33 in hematopoietic stem cells to enable CAR T cell immunotherapy for acute myeloid leukemia. *Cell*, 2018, 173: 1439-53.e19
- [9] Euquem J, Mansilla-Soto J, Giavridis T, et al. Targeting a CAR to the *TRAC* locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature*, 2017, 543: 113-7
- [10] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, et al. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*, 1987, 169: 5429-33
- [11] Mojica FJ, Diez-villasenor C, Garcia-Martinez J, et al. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol*, 2005, 60: 174-82
- [12] Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, et al. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 2005, 151: 2551-61
- [13] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007, 315: 1709-12
- [14] Brouns SJ, Jore MM, Lundren M, et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, 2008, 321: 960-4
- [15] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 2011, 471: 602-7
- [16] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337: 816-21
- [17] Cong L, RanF A, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339: 819-23
- [18] Mali P, Yang L, Esvert KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339: 823-6
- [19] Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 2013, 152: 1173-83
- [20] Kampmann M. CRISPRi and CRISPRa screens in mammalian cells for precision biology and medicine. *ACS Chem Biol*, 2018, 13: 406-16
- [21] Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev*

- Microbiol, 2011, 9: 467-77
- [22] Spiman M, Coccozaki A, Hale C, et al. Structure of an RNA silencing complex of the CRISPR-Cas immune system. *Mol Cell*, 2013, 52: 146-52
- [23] Heidrich N, Vogel J. Same same but different: new structural insight into CRISPR-Cas complexes. *Mol Cell*, 2013, 52: 4-7
- [24] Gottesman S. Microbiology: dicing defence in bacteria. *Nature*, 2011, 471: 588-9
- [25] Haurwitz RE, Jinek M, Widenheft B, et al. Sequence- and structure-specific RNA processing by a CRISPR endonuclease. *Science*, 2010, 329: 1355-8
- [26] Sapranaukas R, Gasiunas G, Fremaux C, et al. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39: 9275-82
- [27] Rath D, Amlinger L, Rath A, et al. The CRISPR-Cas immune system: biology, mechanisms and applications. *Biochimie*, 2015, 117: 119-28
- [28] Garneau JE, Dupuis ME, Villion NM, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 2010, 468: 67-71
- [29] Sternberg SH, Redding S, Jinek M, et al. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, 2014, 507: 62-7
- [30] Symington LS, Gautier J. Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu Rev Genet*, 2011, 45: 247-71
- [31] Ran FA, Hsu PD, Wright J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*, 2013, 8: 2281-308
- [32] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65: 87-108
- [33] Chen CD, Welsbie DS, Tran C, et al. Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nat Med*, 2004, 10: 33-9
- [34] Harris WP, Mostaghel EA, Nelson PS, et al. Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion. *Nat Clin Pract Urol*, 2009, 6: 76-85
- [35] Wei C, Wang F, Liu W, et al. CRISPR/Cas9 targeting of the androgen receptor suppresses the growth of LNCaP human prostate cancer cells. *Mol Med Rep*, 2018, 17: 2901-6
- [36] Liu XS, Brown M, Hoy JJ, et al. Inhibition of androgen receptor promotes CXCR4-chemokine receptor 7-mediated prostate cancer cell survival. *Sci Rep*, 2017, 7: 3058
- [37] Yin Y, Xu L, Chang Y, et al. N-Myc promotes therapeutic resistance development of neuroendocrine prostate cancer by differentially regulating miR-421/ATM pathway. *Mol Cancer*, 2019, 18: 11
- [38] Mimeault M, Batra SK. Hypoxia-inducing factors as master regulators of stemness properties and altered metabolism of cancer- and metastasis-initiating cells. *J Cell Mol Med*, 2013, 17: 30-54
- [39] Maina PK, Shao P, Jia X, et al. Histone demethylase PHF8 regulates hypoxia signaling through HIF1 $\alpha$  and H3K4me3. *Biochim Biophys Acta*, 2017, 1860: 1002-12
- [40] Damaghi M, Wojtkowiak JW, Gilles RJ. pH sensing and regulation in cancer. *Front Physiol*, 2013, 4:370
- [41] Chen B, Liu J, Ho TT, et al. ERK-mediated NF- $\kappa$ B activation through ASIC1 in response to acidosis. *Oncogenesis*, 2016, 5: e279
- [42] Beaver LM, Kuintzle R, Buchanan A, et al. Long noncoding RNAs and sulforaphane: a target for chemoprevention and suppression of prostate cancer. *J Nutr Biochem*, 2017, 42: 72-83
- [43] Shukla S, Zhang X, Niknafs YS, et al. Identification and validation of PCAT14 as prognostic biomarker in prostate cancer. *Neoplasia*, 2016, 18: 489-99
- [44] Xiao G, Yao J, Kong D, et al. The long noncoding RNA TTTY15, which is located on the Y chromosome, promotes prostate cancer progression by sponging let-7. *Eur Urol*, 2018 [Epub ahead of print]
- [45] Zhang P, Xia JH, Zhu J, et al. High-throughput screening of prostate cancer risk loci by single nucleotide polymorphisms sequencing. *Nat Commun*, 2018, 9: 2022
- [46] Zhou J, Yu Y, Zhu A, et al. Meta-analysis of association between rs1447295 polymorphism and prostate cancer susceptibility. *Oncotarget*, 2017, 8: 67029-42
- [47] Luo Z, Rhie SK, Lay FD, et al. A Prostate cancer risk element functions as a repressive loop that regulates HOXA13. *Cell Rep*, 2017, 21: 1411-7
- [48] Jin HJ, Jung S, Debroy AR, et al. Identification and validation of regulatory SNPs that modulate transcription factor chromatin binding and gene expression in prostate cancer. *Oncotarget*, 2016, 7: 54616-26
- [49] Kaufmann O, Volmerig J, Dietel M. Uroplakin III is a highly specific and moderately sensitive immunohistochemical marker for primary and metastatic urothelial carcinomas. *Am J Clin Pathol*, 2000, 113: 683-7
- [50] Gao P, Xia JH, Sipeky C, et al. Biology and clinical implications of the 19q13 aggressive prostate cancer susceptibility locus. *Cell*, 2018, 174: 576-89.e18
- [51] Spisak S, Lawrenson K, Fu Y, et al. CAUSEL: an epigenome- and genome-editing pipeline for establishing function of noncoding GWAS variants. *Nat Med*, 2015, 21: 1357-63
- [52] Cho SW, Kim S, Kim Y, et al. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res*, 2014, 24: 132-41
- [53] Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*, 2016, 529: 490-5
- [54] Slaymaker IM, Gao L, Zetzche B, et al. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*, 2016, 351: 84-8
- [55] Kleinstiver BP, Tsai SQ, Prew MS, et al. Genome-wide specificities of CRISPR-Cas Cpf1 nucleases in human cells. *Nat Biotechnol*, 2016, 34: 869-74
- [56] Ran FA, Cong L, Yan WX, et al. *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*, 2015, 520: 186-91
- [57] Yin H, Song CQ, Dorkin JR, et al. Therapeutic genome

- editing by combined viral and non-viral delivery of CRISPR system components *in vivo*. *Nat Biotechnol*, 2016, 34: 328-33
- [58] Kretzmann JA, Ho D, Evans CW, et al. Synthetically controlling dendrimer flexibility improves delivery of large plasmid DNA. *Chem Sci*, 2017, 8: 2923-30
- [59] 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. *Oncotarget*, 2017, 8: 9375-87
- [60] Guo Y, Perez AA, Hazelett DJ, et al. CRISPR-mediated deletion of prostate cancer risk-associated CTCF loop anchors identifies repressive chromatin loops. *Genome Biol*, 2018, 19: 160
- [61] GuoX, Dean A. CRISPR/Cas9 offers a new tool for studying the role of chromatin architecture in disease pathogenesis. *Genome Biol*, 2018, 19: 185