

# CRISPR/Cas9 基因组编辑技术在癌症研究中的应用

王大勇<sup>1,2,3</sup>, 马宁<sup>1,2,3</sup>, 惠洋<sup>1,2,3</sup>, 高旭<sup>1,2,3</sup>

1. 哈尔滨医科大学生物化学与分子生物学教研室, 哈尔滨 150086;
2. 哈尔滨医科大学北方转化医学研究合作中心, 哈尔滨 150086;
3. 黑龙江省医学科学院, 哈尔滨 150086

**摘要:** CRISPR/cas9 基因组编辑技术因其设计简单以及操作容易, 使其在基因编辑的研究中越来越受到欢迎。

利用该技术, 科研人员可以实现在碱基的水平对基因组进行定点修饰。CRISPR 系统现已经被广泛地应用到多个物种的基因组编辑以及癌症的相关研究中。本文在最新研究进展的基础上, 结合对癌症研究及基因组编辑技术的理解, 对 CRISPR/Cas9 技术在癌症研究中的应用进行了综述。

**关键词:** CRISPR; CRISPR/Cas9; 基因编辑; 癌症

## The application of CRISPR/Cas9 genome editing technology in cancer research

Dayong Wang<sup>1,2,3</sup>, Ning Ma<sup>1,2,3</sup>, Yang Hui<sup>1,2,3</sup>, Xu Gao<sup>1,2,3</sup>

1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Harbin Medical University, Harbin 150086, China;
2. Translational Medicine Research and Cooperation Center of Northern China, Harbin Medical University, Harbin 150086, China;
3. Heilongjiang Academy of Medical Sciences, Harbin 150086, China

**Abstract:** The CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein-9 nuclease) genome editing technology has become more and more popular in gene editing because of its simple design and easy operation. Using the CRISPR/Cas9 system, researchers can perform site-directed genome modification at the base level. Moreover, it has been widely used in genome editing in multiple species and related cancer research. In this review, we summarize the application of the CRISPR/Cas9 system in cancer research based on the latest research progresses as well as our understanding of cancer research and genome editing techniques.

**Keywords:** CRISPR; CRISPR/Cas9; gene editing; cancer

CRISPR(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)是在细菌中发现的适应性免疫

反应系统(Adaptive immune system), 能有效抵抗噬菌体(Bacteriophage)等对细菌造成的损伤。在这套系统

收稿日期: 2015-08-31; 修回日期: 2015-11-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 81270511, 81200827)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 81270511, 81200827)]

作者简介: 王大勇, 博士, 专业方向: 遗传改变模式动物的建立及复杂疾病机制研究。E-mail: 84dayong@163.com

通讯作者: 高旭, 博士, 教授, 研究方向: 遗传改变模式动物的建立及复杂疾病机制研究。E-mail: gaoxu\_671227@163.com

DOI: 10.16288/j.ycz.15-252

网络出版时间: 2015-12-4 13:47:14

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20151204.1347.003.html>

的基础上,科学家发展出一种新的基因组编辑技术—CRISPR/Cas 技术<sup>[1]</sup>。现在所广泛使用的 CRISPR/cas 9 系统是由 II 型 CRISPR 改造而来,并应用到分子生物学的相关研究中,成为一种可用于基因组编辑的分子生物学利器<sup>[2,3]</sup>。CRISPR/Cas9 系统由于没有物种的限制,已经成功在小鼠(*Mus musculus*)、大鼠(*Rattus norvegicus*)、水稻(*Oryza sativa*)等多种动物和植物中实现了基因的精确编辑<sup>[4-11]</sup>。近年来 CRISPR/Cas9 的应用得到更进一步的发展,如调控基因的转录激活和抑制等,丰富了分子生物学研究的方法并被应用到各种研究中<sup>[12-15]</sup>。

CRISPR/Cas9 系统由单链的 sgRNA 和有核酸内切酶活性的 Cas9 蛋白构成。当 Cas9 酶剪切基因组时可以在 PAM (Protospacer-adjacent motif) 序列前产生一个双链的切口(Double-strand breaks, DSBs),由于细胞基因组具有自我修复的功能,通过非同源末端连接(Nonhomologous end-joining, NHEJ)的方式可以使基因组发生随机的 INDEL 效应(Insertion and deletion)。当细胞内具有基因组同源臂的序列存在时,基因组会进行同源修复(Homology-directed repair, HDR),从而实现基因组任意位点的序列编辑<sup>[4,5]</sup>。基于此,科学家实现了对基因组的精确编辑并且将其应用于遗传病的治疗。对动物受精卵或者体细胞导入 Cas9 蛋白的 mRNA,以及包含特定靶点序列的 sgRNA(如果是基因组突变则需包含同源序列的模板),即可实现动物体内基因的失活或缺陷基因的修复<sup>[16]</sup>。

癌症一直是人类所面对的最主要的疾病之一,也是当前主要的研究领域之一。由于 CRISPR/Cas9 系统具有设计简单和易于操作的优点,研究者们将 CRISPR 系统创造性地应用于癌症的研究中。CRISPR 系统的应用不仅丰富了癌症研究的技术手段,更提供了癌症研究的新视角和新思路。本文对近期 CRISPR/Cas9 技术在癌症研究中的应用进行综述。

## 1 建立小鼠癌症模型的新方法

随着测序成本的降低及高通量测序结果的涌现,科学家们在肿瘤细胞基因组测序数据的分析中发现了大量与癌症相关的基因突变。建立携带突变基因的小鼠癌症模型是研究这些突变功能的最有效方法

之一,但是传统遗传改变模式动物的建立是一个费时费力的过程<sup>[17,18]</sup>。

2014 年,麻省理工学院的科研人员利用 CRISPR 基因编辑系统,通过尾静脉注射 CRISPR 系统导入到成年小鼠的肝脏中,对癌症相关基因进行突变,构建了癌症模型<sup>[18]</sup>。他们通过破坏 *p53* 和 *PTEN* 这两个重要的抑癌基因,使得成年小鼠肝脏生成了肿瘤,建立了肝肿瘤小鼠模型<sup>[18]</sup>。该小鼠模型出现了与传统的 *Cre-loxp* 基因打靶方法构建的 *PTEN*、*p53* 基因敲除小鼠相似的肿瘤表型,但是构建模型的成本更低、速度却更快<sup>[19]</sup>。此外在尾静脉注射带有 *-catenin* 靶点的 CRISPR 系统的同时,他们还注射了带有同源臂的模板序列,在小鼠的肝脏组织实现了重要的癌症相关基因 *-catenin* 的点突变,从而实现了该基因的精确编辑。此项研究标志着利用 CRISPR 系统可以快速有效地建立了一种基于遗传改变的癌症模型,为研究基因突变与肿瘤之间的关系提供了一种有效的研究工具。

上述研究采用尾静脉注射的方式使 CRISPR 质粒系统进入小鼠体内,然后通过血液流动运送到各个脏器从而发挥作用,但在这一过程中涉及两个可能影响系统效率的问题:(1)质粒只能在血液运输到的组织中发挥作用,并且受血液含量的限制;(2)质粒如何能有效地到达指定的脏器并进入细胞发挥作用,如何保证进入细胞的量来发挥有效的作用。2014 年,Platt 等<sup>[19]</sup>将慢病毒与 CRISPR 系统相结合实现了对特定脏器高效率的基因组编辑<sup>[20]</sup>。他们在小鼠基因组 *Rosa26* 位点敲入了 Cas9 蛋白,建立了 *Cas9* 基因敲入小鼠。之后将包含有特定基因 sgRNA 的病毒系统注射到多个脏器之中,实现了对多脏器(如脑、肾、肝、肺等)的基因编辑。*p53*、*Lkb1*、*Kras* 三个基因是肺癌相关的重要基因,有研究表明 *Lkb1* 基因突变可加剧肺癌发生<sup>[21]</sup>。Platt 等<sup>[20]</sup>将表达包含有 *p53*、*Lkb1*、*Kras* 基因靶点的 sgRNA 的病毒注射到 *Cas9* 基因敲入小鼠的肺中。注射后的小鼠肺组织中出现了明显的肿瘤结节并随着时间的延长显著增大,应用这一新方法建立了小鼠的肺癌模型<sup>[20]</sup>。本研究所建立的模型与传统的遗传改变小鼠模型相比,不仅能够实现多基因特定组织的基因敲除,而且也实现了多基因共同作用对肺癌表型影响的模型,

能更准确地反映癌症发生的机制和疾病的表型。

CRISPR 系统最大的特点之一是可以实现对多基因进行同时编辑。上文关于肺癌的研究应用已经为人们展示了多基因编辑的应用前景。2015 年, Matano 等<sup>[22]</sup>将多基因编辑建立癌症模型的理念应用到了结直肠癌的研究中<sup>[22]</sup>。结直肠癌是临床上常见的一种消化道恶性肿瘤, 在中国和美国都有很高的发病率。在结直肠癌的患者样本中 WNT、MAPK、TGF- $\beta$  及 TP53 和 PI3K 通路的基因有多发性的突变现象, 但是这些基因在癌症中的具体作用依然不是十分清楚<sup>[23]</sup>。Matano 等<sup>[22]</sup>应用 CRISPR 系统对肿瘤抑制基因 *APC*、*SMAD4* 和 *TP53*, 以及癌基因 *KRAS* 和 *PIK3CA* 进行突变, 发现表达全部 5 种基因突变的器官都出现了明显的肿瘤样的变化, 细胞移植到小鼠肾包膜下会形成肿瘤, 此研究揭示了多基因对癌症的共同作用, 是一种新的癌症研究方法和思路。2014 年, Heckl 等<sup>[24]</sup>将慢病毒载体与 CRISPR 相结合对造血干细胞中的多个基因 (*Tet2*, *Runx1*, *Dnmt3a* 和 *Nf1*) 进行编辑, 发生基因突变的细胞出现了明显的恶性髓系血液病的表型变化<sup>[24]</sup>。2014 年, Sanchez-Rivera 等<sup>[25]</sup>也将这种多基因编辑的方法应用到了肺癌的研究中。Sanchez-Rivera 等<sup>[25]</sup>使用表达 CRISPR 系统的慢病毒注入肺脏中条件性表达 *Kras* 癌基因的模型小鼠中。CRISPR 系统靶向不同基因 (*Pten*, *Nkx2-1*), 通过表型的分析研究每种基因是与 *Kras* 协同对肿瘤的影响。

癌症是一种复杂疾病, 具有复杂的机制和表型, 是多个基因和环境共同作用的结果。在上面介绍的研究中关注的是多个已知基因对癌症的共同作用, 那么反过来, 还可以分析癌症的表型是由哪些基因所导致。针对这个问题, 研究者将 DNA 测序和 CRISPR/Cas9 介导的基因敲除相结合, 研究基因功能的缺失与肿瘤生长和转移的表型间的相关性。2015 年张峰团队及 Phillip A. Sharp 团队的 Sidi Chen 等<sup>[26]</sup>将这种研究思路应用到了癌症的研究中, 使得 CRISPR 在癌症领域的应用提升到了一个新的层次<sup>[26]</sup>。首先作者使用了一个包含针对 20611 个编码基因、1175 个 miRNA 前体及 1000 个对照序列靶点的 67405 个 sgRNA 的 CRISPR 文库, 作用于一个不具有转移能力的肺癌细胞系。将处理后的细胞接种于免疫缺

陷小鼠后, 小鼠出现了明显的肿瘤转移表型。接着作者将原发肿瘤和转移灶的肿瘤进行测序分析, 发现转移肿瘤中有部分基因发生了突变而功能缺失, 因此这些突变的基因和肿瘤的表型间具有潜在的联系。文章中展示了 624 个 sgRNA 所造成的基因突变与肿瘤生长和转移的表型变化密切相关。与传统单一研究靶点的分子生物学实验相比, 这种高通量的挖掘疾病相关基因的研究方法更能反映基因与癌症间的关系, 揭示了复杂疾病的多基因调控的特性以及多基因对表型的共同作用及其对应关系。

## 2 癌症相关的染色体异构中的应用

染色体重排是人类癌症细胞的一个特征, 在多种癌症的发病机制及癌症的治疗方案的相关研究中具有重要的地位, 如造血系统肿瘤如白血病和淋巴瘤<sup>[28, 29]</sup>。染色体重排产生的主要过程之一是诱导 DNA 双链的断裂, 而 CRISPR 系统是通过断裂 DNA 的双链来实现基因编辑的, 因此可以在癌症细胞中分析染色体重排与癌症的关系。2014 年, Maddalo 等<sup>[30]</sup>应用 CRISPR 系统在小鼠体内进行了染色体重排肿瘤模型的建立, 建立在动物体内使用病毒介导的 CRISPR/Cas9 系统诱导特异性染色体重排细胞的有效方法<sup>[30]</sup>。在非小细胞肺癌中, 癌症细胞 2 号染色体断裂, DNA 序列发生反转后会使得 *EML4* 基因与 *ALK* 基因发生基因融合。*EML4-ALK* 融合基因会在癌症的发生过程具有潜在的作用, 是一个经典的染色体重排发生基因融合并对癌症产生重要作用的例子<sup>[31]</sup>。Maddalo 等<sup>[30]</sup>应用 CRISPR 系统实现了 *EML4-ALK* 融合基因肺癌小鼠模型。他们在肿瘤细胞中表达 *EML4-ALK* 融合基因, 建立了具有典型的 *ALK*<sup>+</sup> 人类非小细胞肺癌的病理表型和分子特征的模型。与传统的基因打靶的方法构建的模型相比, 此研究采用的实验方法成本更低速度更快<sup>[32]</sup>。2014 年, Torres 等<sup>[33]</sup>也进行了相似的工作, 应用 CRISPR 系统建立了细胞水平研究染色体重排的方案。尤文氏肉瘤中染色体异构生成 *EWSR1-FLI1* 融合基因及急性粒细胞性白血病中 *RUNX1* 与 *ETO* 生成的融合基因比较常见, Torres 等<sup>[33]</sup>在细胞系和原代细胞中建立了相应的染色体重排的模型, 用以研究染色体

重排与癌症的关系。以上的几项研究均采用 CRISPR 系统建立了癌症相关染色体重排模型,为癌症相关的染色体重排的研究提供了新的思路和方法。

### 3 癌症治疗中的应用

CRISPR 基因组编辑系统通过 sgRNA 上携带的靶点序列识别特定 DNA 序列,这种方式决定了 CRISPR 系统具有很强的特异性。应用该技术可以进行疾病基因突变位点的修复或者实现重要基因的功能缺失,目前该技术已经成功地应用到多种遗传病的治疗的研究中<sup>[34,35]</sup>。2015 年,Brandon 等<sup>[36]</sup>首次将 CRISPR 技术应用到了癌症相关的基因治疗研究,他们设计了一种慢病毒载体使 CRISPR 系统可以被 *doxycycline* 进行诱导表达,并高效地对细胞进行编辑<sup>[36]</sup>。应用这个系统,他们实现了对 *MCL-1* 基因在体内和体外的敲除。*MCL-1* 基因是人淋巴瘤细胞系生长所必须的,当这个基因被敲除后,癌症细胞出现了明显的死亡。为验证体内实验的有效性,他们对皮下移植瘤的小鼠模型接种 21d 后连续 5d 在饲料中加入诱导剂诱导 CRISPR 系统发挥作用,结果显示小鼠体内的肿瘤出现了明显的退化和生长速度减慢的表型变化。实验结果表明,慢病毒 CRISPR/Cas9 系统高效地实现了体内 CRISPR/Cas9 介导的基因组编辑,通过癌基因的敲除,可以作为一种潜在的新的癌症治疗方案。

### 4 癌症相关药物靶点的筛选

寻找癌症新的治疗靶点一直是癌症研究的主要目标之一。CRISPR 基因组编辑技术与基因组测序相结合的突变靶点的选择方法在癌症的研究中具有重要的意义,但是如果突变位点在非编码区或者外显子 5'端,功能结构域依然保留,有可能即使发生突变也不会对癌症的表型产生作用,因此在结果分析的过程中会失去大量有用的信息<sup>[37-39]</sup>。2015 年,Shi 等<sup>[40]</sup>将这种方法进行了改进,应用到基于 CRISPR 系统癌症相关药物靶点的筛选中。他们将 CRISPR 的靶点序列设计到基因外显子中编码蛋白功能结构域的序列区域,因此基因突变发生在编码重要的结

构域的序列中,使蛋白失去这些结构。利用这个方法,提高了高通量分析基因与疾病关系的准确性。他们将这个方法应用到小鼠急性粒细胞性白血病细胞中,对维持癌细胞生长存活及发育等过程具有重要作用的蛋白及结构域进行检测和分析。通过对 192 个染色体区域进行分析,发现了 6 个新的疾病相关的功能结构域和 19 个疾病相关的位点。该方法作为有效的药物靶点选择与分析的有力工具,对于寻找合适的药物作用靶点,开发癌症治疗药物具有重要意义。

### 5 结语与展望

CRISPR 系统使研究者可以快速简单地对基因组进行精确的编辑,自该方法建立以来被广泛应用于分子生物学研究中。图 1 展示了现阶段 CRISPR/Cas9 系统在肿瘤研究中的应用。除了前文提到的应用外,该技术还可以实现 DNA 的定点突变、基因敲入、Mb 级别的片段删除、miRNA 及长链非编码 RNA 的敲除、激活或抑制内源性的基因表达、分子的标记示踪等<sup>[4, 5, 12, 27, 41-45]</sup>。由此发展出几种组织特异性编辑的方案,如应用病毒将 CRISPR 系统导入特定的组织或细胞,或使用特殊的组织特异性启动子等方法,更加适用于疾病机制及治疗的研究<sup>[46, 47]</sup>。而这些方法可有效应用于癌症相关的分子机制的研究,可以使机制更加的丰满及可信。

CRISPR 系统方便快捷,近年来发展迅速。但是由于 CRISPR 系统的特异性是由碱基配对所决定的,由此带来的脱靶问题依然是这个系统面临的最主要问题。已有研究将 Cas9 蛋白的结构域(D10A)进行突变建立了 CRISPR 配对切口酶系统,从而大大提高了 CRISPR 系统的特异性减少了脱靶的发生,同时也更有利于基因编辑的准确性<sup>[48, 49]</sup>。最近研究表明改变 miRNA 的表达可使肿瘤细胞恶性程度降低<sup>[50]</sup>。因此对重要的基因或者 miRNA 进行编辑或者突变具有潜在的治疗癌症的作用。CRISPR 系统不但可以对基因组进行编辑,而且还可以实现内源性调控基因的表达,如使用突变的 dCas9 蛋白并且融合了转录激活结构域,可以在 sgRNA 的引导下结合到特定基因的启动子区域实现基因的内源性调控<sup>[12]</sup>。

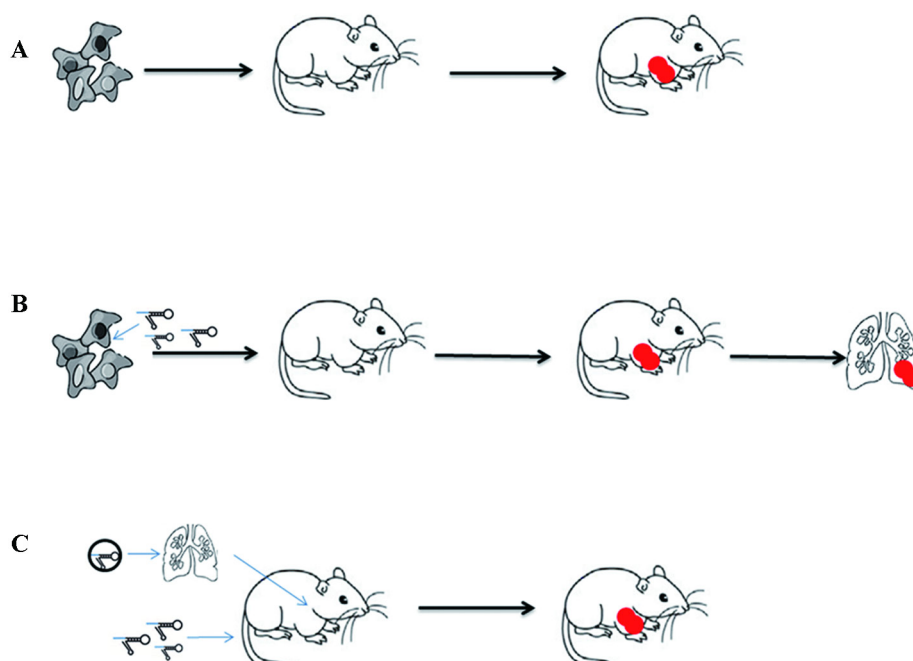


图 1 CRISPR/Cas9 在癌症研究中的应用

Fig. 1 The application of the CRISPR-Cas9 system in cancer research

A: 传统癌症动物模型; B: 应用 CRISPR/Cas9 编辑细胞的一个或多个基因, 之后应用编辑后的癌细胞建立癌症细胞模型, 分析基因与癌症表型间的关系; C: 鼠尾静脉注射 CRISPR/Cas9 系统或者在动物组织注射病毒包裹的 CRISPR/Cas9 系统实现动物体细胞或组织特异性的基因编辑, 建立癌症小鼠模型。

因此随着 CRISPR 在临床上的逐步应用, 未来很有可能针对癌症实现基因治疗, 对癌症细胞的基因组进行修复, 如突变、染色体变异、拷贝数变异、调控肿瘤细胞基因的表达等, 从而最终实现癌症的基因治疗。

本文综述了目前 CRISPR/Cas9 技术在癌症方面的研究进展。相信在不久的将来 CRISPR 技术将像 PCR 技术一样很快融入到分子生物学的各项研究中, 可以帮助研究者快速地进行动物体基因组的编辑, 构建基因敲除以及精确的基因突变的小鼠, 进行全面的基因功能研究以及遗传性疾病的基因治疗<sup>[51~53]</sup>。

## 参考文献(References):

- [1] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. 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(12): 5429–5433. [DOI]
- [2] Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 2014, 346(6213): 1258096. [DOI]
- [3] Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 2014, 157(6): 1262–1278. [DOI]
- [4] Wang HY, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, 153(4): 910–918. [DOI]
- [5] Yang H, Wang HY, Shivalila CS, Cheng AW, Shi LY, Jaenisch R. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, 154(6): 1370–1379. [DOI]
- [6] Zhou XQ, Xin JG, Fan NN, Zou QJ, Huang J, Ouyang Z, Zhao Y, Zhao BT, Liu ZM, Lai SS, Yi XL, Guo L, Esteban MA, Zeng YZ, Yang HQ, Lai LX. Generation of CRISPR/Cas9-mediated gene-targeted pigs via somatic cell nuclear transfer. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(6): 1175–1184. [DOI]
- [7] Wan HF, Feng CJ, Teng F, Yang SH, Hu BY, Niu YY, Xiang AP, Fang WZ, Ji WZ, Li W, Zhao XY, Zhou Q. One-step generation of p53 gene biallelic mutant Cynomolgus monkey via the CRISPR/Cas system. *Cell*

- Res, 2015, 25(2): 258–261. [DOI]
- [8] Zhao P, Zhang Z, Ke HM, Yue YR, Xue D. Oligonucleotide-based targeted gene editing in *C. elegans* via the CRISPR/Cas9 system. *Cell Res*, 2014, 24(2): 247–250. [DOI]
- [9] Hruscha A, Krawitz P, Rechenberg A, Heinrich V, Hecht J, Haass C, Schmid B. Efficient CRISPR/Cas9 genome editing with low off-target effects in zebrafish. *Development*, 2013, 140(24): 4982–4987. [DOI]
- [10] Hwang WY, Fu YF, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, Peterson RT, Yeh JRJ, Joung JK. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 227–229. [DOI]
- [11] Shan QW, Wang YP, Li J, Zhang Y, Chen KL, Liang Z, Zhang K, Liu JX, Xi JZJ, Qiu JL, Gao CX. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 686–688. [DOI]
- [12] Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, Joung J, Abudayyeh OO, Barcena C, Hsu PD, Habib N, Gootenberg JS, Nishimasu H, Nureki O, Zhang F. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*, 2015, 517(7536): 583–588. [DOI]
- [13] Bikard D, Jiang WY, Samai P, Hochschild A, Zhang F, Marraffini LA. Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(15): 7429–7437. [DOI]
- [14] Liu T, Li YJ, Wang XD, Ye Q, Li H, Liang YX, She QX, Peng N. Transcriptional regulator-mediated activation of adaptation genes triggers CRISPR *de novo* spacer acquisition. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(2): 1044–1055. [DOI]
- [15] Zhou JW, Xu QB, Yao J, Yu SM, Cao SZ. CRISPR/Cas9 genome editing technique and its application in site-directed genome modification of animals. *Hereditas (Beijing)*, 2015, 37(10): 1011–1020.  
周金伟, 徐绮斌, 姚婧, 余树民, 曹随忠. CRISPR/Cas9 基因组编辑技术及其在动物基因组定点修饰中的应用. *遗传*, 2015, 37(10): 1011–1020. [DOI]
- [16] Kraft K, Geuer S, Will AJ, Chan WL, Paliou C, Borschiwer M, Harabula I, Wittler L, Franke M, Ibrahim DM, Kragestein BK, Spielmann M, Mundlos S, Lupiáñez DG, Andrey G. Deletions, inversions, duplications: engineering of structural variants using CRISPR/Cas in mice. *Cell Rep*, 2015, 10(5): 833–839, doi: 10.1016/j.celrep. 2015.01.016. [DOI]
- [17] Stell A, Biserni A, Della Torre S, Rando G, Ramachandran B, Ottobriani L, Lucignani G, Maggi A, Ciana P. Cancer modeling: modern imaging applications in the generation of novel animal model systems to study cancer progression and therapy. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39(7–8): 1288–1296. [DOI]
- [18] van Dyke T, Jacks T. Cancer modeling in the modern era: progress and challenges. *Cell*, 2002, 108(2): 135–144. [DOI]
- [19] Xue W, Chen SD, Yin H, Tammela T, Papagiannakopoulos T, Joshi NS, Cai WX, Yang G, Bronson R, Crowley DG, Zhang F, Anderson DG, Sharp PA, Jacks T. CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. *Nature*, 2014, 514(7522): 380–384. [DOI]
- [20] Platt RJ, Chen SD, Zhou Y, Yim MJ, Swiech L, Kempton HR, Dahlman JE, Parnas O, Eisenhaure TM, Jovanovic M, Graham DB, Jhunjhunwala S, Heidenreich M, Xavier RJ, Langer R, Anderson DG, Hacohen N, Regev A, Feng GP, Sharp PA, Zhang F. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell*, 2014, 159(2): 440–455. [DOI]
- [21] Ji HB, Ramsey MR, Hayes DN, Fan C, McNamara K, Kozłowski P, Torrice C, Wu MC, Shimamura T, Perera SA, Liang MC, Cai DP, Naumov GN, Bao L, Contreras CM, Li DN, Chen L, Krishnamurthy J, Koivunen J, Chirieac LR, Padera RF, Bronson RT, Lindeman NI, Christiani DC, Lin XH, Shapiro GI, Jänne PA, Johnson BE, Meyerson M, Kwiatkowski DJ, Castrillon DH, Bardeesy N, Sharpless NE, Wong KK. LKB1 modulates lung cancer differentiation and metastasis. *Nature*, 2007, 448(7155): 807–810. [DOI]
- [22] Matano M, Date S, Shimokawa M, Takano A, Fujii M, Ohta Y, Watanabe T, Kanai T, Sato T. Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. *Nat Med*, 2015, 21(3): 256–262. [DOI]
- [23] The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, 2012, 487(7407): 330–337. [DOI]
- [24] Heckl D, Kowalczyk MS, Yudovich D, Belizaire R, Puram RV, McConkey ME, Thielke A, Aster JC, Regev A, Ebert BL. Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(9): 941–946. [DOI]

- [25] Sánchez-Rivera FJ, Papagiannakopoulos T, Romero R, Tammela T, Bauer MR, Bhutkar A, Joshi NS, Subbaraj L, Bronson RT, Xue W, Jacks T. Rapid modelling of cooperating genetic events in cancer through somatic genome editing. *Nature*, 2014, 516(7531): 428–431. [DOI]
- [26] Chen SD, Sanjana NE, Zheng KJ, Shalem O, Lee K, Shi X, Scott DA, Song J, Pan JQ, Weissleder R, Lee H, Zhang F, Sharp PA. Genome-wide CRISPR screen in a mouse model of tumor growth and metastasis. *Cell*, 2015, 160(6): 1246–1260. [DOI]
- [27] Chen SD, Xue Y, Wu XB, Le C, Bhutkar A, Bell EL, Zhang F, Langer R, Sharp PA. Global microRNA depletion suppresses tumor angiogenesis. *Genes Dev*, 2014, 28(10): 1054–1067. [DOI]
- [28] Tsai AG, Lieber MR. Mechanisms of chromosomal rearrangement in the human genome. *BMC Genomics*, 2010, 11(Suppl.1): S1. [DOI]
- [29] Holland AJ, Cleveland DW. Chromoanagenesis and cancer: mechanisms and consequences of localized, complex chromosomal rearrangements. *Nat Med*, 2012, 18(11): 1630–1638. [DOI]
- [30] Maddalo D, Manchado E, Concepcion CP, Bonetti C, Vidigal JA, Han YC, Ogrodowski P, Crippa A, Rekhtman N, de Stanchina E, Lowe SW, Ventura A. *In vivo* engineering of oncogenic chromosomal rearrangements with the CRISPR/Cas9 system. *Nature*, 2014, 516(7531): 423–427. [DOI]
- [31] Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, Fujiwara SI, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Bando M, Ohno S, Ishikawa Y, Aburatani H, Niki T, Sohara Y, Sugiyama Y, Mano H. Identification of the transforming *EML4-ALK* fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*, 2007, 448(7153): 561–566. [DOI]
- [32] Taki T, Taniwaki M. Chromosomal translocations in cancer and their relevance for therapy. *Curr Opin Oncol*, 2006, 18(1): 62–68. [DOI]
- [33] Torres R, Martin MC, Garcia A, Cigudosa JC, Ramirez JC, Rodriguez-Perales S. Engineering human tumour-associated chromosomal translocations with the RNA-guided CRISPR-Cas9 system. *Nat Commun*, 2014, 5: 3964. [DOI]
- [34] Wu YX, Liang D, Wang YH, Bai MZ, Tang W, Bao SM, Yan ZQ, Li DS, Li JS. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(6): 659–662. [DOI]
- [35] Long CZ, McAnally JR, Shelton JM, Mireault AA, Bassel-Duby R, Olson EN. Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. *Science*, 2014, 345(6201): 1184–1188. [DOI]
- [36] Aubrey BJ, Kelly GL, Kueh AJ, Brennan MS, O'Connor L, Milla L, Wilcox S, Tai L, Strasser A, Herold MJ. An inducible lentiviral guide RNA platform enables the identification of tumor-essential genes and tumor-promoting mutations *in vivo*. *Cell Rep*, 2015, 10(8): 1422–1432. [DOI]
- [37] Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen TS, Heckl D, Ebert BL, Root DE, Doench JG, Zhang F. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*, 2014, 343(6166): 84–87. [DOI]
- [38] Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science*, 2014, 343(6166): 80–84. [DOI]
- [39] Zhou YX, Zhu SY, Cai CZ, Yuan PF, Li CM, Huang YY, Wei WS. High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells. *Nature*, 2014, 509(7501): 487–491. [DOI]
- [40] Shi JW, Wang E, Milazzo JP, Wang ZH, Kinney JB, Vakoc CR. Discovery of cancer drug targets by CRISPR-Cas9 screening of protein domains. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(6): 661–667. [DOI]
- [41] Malina A, Mills JR, Cencic R, Yan YF, Fraser J, Schippers LM, Paquet M, Dostie J, Pelletier J. Repurposing CRISPR/Cas9 for *in situ* functional assays. *Genes Dev*, 2013, 27(23): 2602–2614. [DOI]
- [42] Nihongaki Y, Yamamoto S, Kawano F, Suzuki H, Sato M. CRISPR-Cas9-based photoactivatable transcription system. *Chem Biol*, 2015, 22(2): 169–174. [DOI]
- [43] Essletzbichler P, Konopka T, Santoro F, Chen D, Gapp BV, Kralovics R, Brummelkamp TR, Nijman SMB, Bürckstümmer T. Megabase-scale deletion using CRISPR/Cas9 to generate a fully haploid human cell line. *Genome Res*, 2014, 24(12): 2059–2065. [DOI]
- [44] Han JX, Zhang J, Chen L, Shen B, Zhou JK, Hu B, Du YN, Tate PH, Huang XX, Zhang WS. Efficient *in vivo* deletion of a large imprinted lncRNA by CRISPR/Cas9. *RNA Biol*, 2014, 11(7): 829–835. [DOI]
- [45] Ho TT, Zhou NJ, Huang JG, Koirala P, Xu M, Fung R, Wu FT, Mo YY. Targeting non-coding RNAs with the CRISPR/Cas9 system in human cell lines. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(3): e17. [DOI]
- [46] Ablain J, Durand EM, Yang S, Zhou Y, Zon LI. A CRISPR/Cas9 vector system for tissue-specific gene disruption in zebrafish. *Dev Cell*, 2015, 32(6): 756–764. [DOI]

- [47] Swiech L, Heidenreich M, Banerjee A, Habib N, Li YQ, Trombetta J, Sur M, Zhang F. *In vivo* interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(1): 102–106. [DOI]
- [48] Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, Scott DA, Inoue A, Matoba S, Zhang Y, Zhang F. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 2013, 154(6): 1380–1389. [DOI]
- [49] Shen B, Zhang WS, Zhang J, Zhou JK, Wang JY, Chen L, Wang L, Hodgkins A, Iyer V, Huang XX, Skarnes WC. Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nat Methods*, 2014, 11(4): 399–402. [DOI]
- [50] Kourtidis A, Ngok SP, Pulimeno P, Feathers RW, Carpio LR, Baker TR, Carr JM, Yan IK, Borges S, Perez EA, Storz P, Copland JA, Patel T, Thompson EA, Citi S, Anastasiadis PZ. Distinct E-cadherin-based complexes regulate cell behaviour through miRNA processing or Src and p120 catenin activity. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(9): 1145–1157. [DOI]
- [51] Bai M, Li Q, Shao YJ, Huang YH, Li DL, Ma YL. Generation of site-specific mutant mice using the CRISPR/Cas9 system. *Hereditas(Beijing)*, 2015, 37(10): 1029–1035. 白敏, 李崎, 邵艳姣, 黄元华, 李大力, 马燕琳. 利用 CRISPR/Cas9 技术构建定点突变小鼠品系. *遗传*, 2015, 37(10): 1029–1035. [DOI]
- [52] Qu L, Li HS, Jiang YH, Dong CS. The molecular mechanism of CRISPR/Cas9 system and its application in gene therapy of human diseases. *Hereditas(Beijing)*, 2015, 37(10): 974–982. 璩良, 李华善, 姜运涵, 董春升. CRISPR/Cas9 系统的分子机制及其在人类疾病基因治疗中的应用. *遗传*, 2015, 37(10): 974–982. [DOI]
- [53] Yin LJ, Hu SQ, Guo F. The application of CRISPR-Cas9 gene editing technology in viral infection diseases. *Hereditas(Beijing)*, 2015, 37(5): 412–418. 殷利誉, 胡斯奇, 郭斐. CRISPR-Cas9 基因编辑技术在病毒感染疾病治疗中的应用. *遗传*, 2015, 37(5): 412–418. [DOI]

(责任编辑: 杨中州)