

· 综述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.18.022

CRISPR/Cas9 系统的脱靶效应及其介导的非编码 RNA 编辑在人类癌症中的应用*

吴家栋 综述, 肖 瑞[△] 审校

(内蒙古医科大学分子病理学重点实验室, 呼和浩特 050059)

[摘要] 成簇规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)/CRISPR 蛋白 9(Cas9)系统作为细菌对抗外源入侵 DNA 的防御机制已经被成功开发应用于真核生物基因组编辑,该系统具有高效准确且可以编辑任意 DNA 位点的特点,同时也存在较为严重的脱靶效应。癌症目前对于人类依然是严峻挑战,癌症治疗过程中的不良反应使患者十分痛苦,CRISPR/Cas9 系统可能实现在基因水平治疗癌症。本文旨在探讨 CRISPR/Cas9 系统的脱靶效应,为肿瘤治疗的深入研究提供新思路。

[关键词] 肿瘤;CRISPR/Cas9 系统;脱靶效应;非编码 RNA

[中图分类号] R730.5;R979

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)18-2480-04

成簇规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)/CRISPR 蛋白 9(Cas9)是一种多功能的基因组编辑技术,被称为分子剪刀,广泛应用于遗传因子功能的研究、遗传疾病的临床前研究、癌症研究、药物发现、精神疾病研究及植物应用等领域。CRISPR/Cas9 系统被发现于多种细菌和古细菌物种中,已经成功地被用于编辑真核生物基因组^[1-2]。目前,越来越多的数据表明 CRISPR/Cas9 系统不仅可以靶向蛋白质编码基因组,而且可以靶向人类的非编码 RNA(noncoding RNA, ncRNA)^[3-5]。然而,CRISPR/Cas9 系统也有其局限性,它存在严重的脱靶效应,这可能导致基因组不稳定性并破坏其他正常基因的功能^[6-7]。癌症是导致人类死亡的主要原因之一^[8],尽管肿瘤的综合治疗已取得了令人振奋的成果,但是肿瘤的复发及化疗过程中出现的不良反应等问题大大降低了癌症患者的生活质量^[9],而 CRISPR/Cas9 系统可以纠正导致癌症的突变,并且是一种可以在基因水平保护患者的治疗技术^[3],因此,CRISPR/Cas9 系统的出现拉开了癌症治疗的新序幕。本文通过总结 CRISPR/Cas9 系统的脱靶效应及其在 ncRNA 相关基因组编辑中的最新应用,旨在为肿瘤治疗的深入研究甚至临床治疗提供新思路。

1 CRISPR/Cas9 系统的概述

迄今为止,已经开发了 3 种可编程核酸酶用于基因组编辑,包括锌指核酸酶(ZFN)^[10],转录激活剂样效应子因子核酸酶(TALEN)^[11-12]和 CRISPR 相关蛋白(Cas)系统^[13]的 RNA 引导的核酸酶(RGNs)。在这些核酸酶中,根据其指导 RNA 和 DNA 之间的 Watson-Crick 碱基配对识别目标 DNA 的 Cas9 核酸酶实施最简单,并且迅速成为基因组工程中最流行和有力的工具。CRISPR/Cas9 系统是来细菌和古细菌的适应性免疫系统,可检测和降解来自噬菌体和质粒的侵染性 DNA^[14]。1987 年末,ISHINO 等^[15]在大

肠杆菌中首次发现了聚类重复片段被一系列间隔序列中断,该现象后被称为 CRISPR。到目前为止,研究人员已经发现了 10 多种不同的 CRISPR/Cas 系统,根据其不同的机制将其分为 3 类(I、II 和 III 型)和许多亚型^[16-17]。其中 CRISPR/Cas9 是一种在化脓链球菌中应用的 II 型 CRISPR 系统,由于其具有高效率和高准确性,是哺乳动物中使用最广泛的系统^[18]。Cas9 介导的基因组编辑有 3 个要求:(1)单链向导 RNA (single guide RNA, sgRNA)序列,CRISPR/Cas9 系统是第一个用于基因组编辑的 CRISPR/Cas 系统,部分原因是它含有一个相关的易编程的 sgRNA,只有 20 个核苷酸长的识别序列^[1-2,19]。sgRNA 由具有与靶位点互补序列的 CRISPR RNA(crRNA)和分别转录并部分与 crRNA 互补的反式激活的 crRNA(transactivating crRNA, tracrRNA)组成^[1,20-21]。(2)具有核定位信号的 Cas9 蛋白,为了发挥基因组编辑功能,CRISPR/Cas9 系统还需要与这两种 RNA 组分紧密相关的关键酶组分 Cas9 核酸酶^[18],这些 RNA 需要将 Cas9 蛋白引导到靶位点并激活 Cas9 核酸酶。(3)前间区序列邻近基序(proto-spacer adjacent motif, PAM),sgRNA 与 Cas9 蛋白结合形成复合物,sgRNA 与 Cas9 蛋白结合形成复合物,并严格识别位于靠近 PAM 的 3'末端侧翼的靶向互补 DNA 序列,其通常由 NGG 或 NAG(N 可为 A, T, G 或 C)组成,然后启动 DNA 双链断裂(DSBs)^[9]。从理论上讲,带有 PAM 的任何基因组序列都可以由 Cas9 用特定的 sgRNA 进行编辑,由于基因组中 PAM 的高发生率,CRISPR/Cas9 系统中的 sgRNA 几乎可以靶向所有的基因。

2 CRISPR/Cas9 系统的脱靶效应

虽然 CRISPR/Cas9 系统与 ZFN、TALEN 等其他基因组编辑技术相比有许多优势,但它仍有一些严重的缺点亟待解决,例如脱靶效应,也就是说 Cas9

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(31260260);内蒙古自然科学基金(2015MS0372)。 作者简介:吴家栋(1992-),在读硕士,主要从事分子生物学研究。△ 通信作者,E-mail:xiaorui79@hotmail.com。

可能会错误地结合到目标位点之外的序列内并产生突变,引起一些严重的后果^[5,22-23]。SCHAEFER 等^[24]采用全基因组测序检测经 CRISPR 处理的小鼠细胞的脱靶情况,结果显示,在经 CRISPR/Cas9 体内编辑后诱导出高数目的突变,该研究表明 CRISPR/Cas9 系统的脱靶效应是一个广泛存在的现象。这种脱靶效应已经通过不同的体内和体外方法进行了彻底分析^[8-9,25],主要是由于 sgRNA 的识别序列与非靶点 DNA 发生了局部匹配,主要原因有:(1)一般情况下,sgRNA 不能识别和编辑任何邻近 PAM 的非靶点 DNA 位点(长度为 10~12 bp),发生碱基错配,且不能识别 3 个以上的非靶点 DNA 位点。经典的通过体外筛选结合高通量测序的方法检测 CRISPR/Cas9 系统在 HEK293T 细胞的脱靶情况的研究表明,Cas9 的 sgRNA 有多达 5 个错配^[25]。(2)当脱靶位点 DNA 序列长度比 sgRNA 多或少几个碱基时会形成 DNA 凸起或 RNA 凸起,从而完成其他碱基的正确配对。即使脱靶位点 DNA 序列长度比 sgRNA 的识别序列的长度差 5 bp,仍能通过形成多个凸起的形式进行碱基配对并介导 CRISPR/Cas9 系统进行 DNA 切割^[26]。

2.1 CRISPR/Cas9 系统脱靶效应的影响因素

2.1.1 sgRNA

虽然 Cas9 的靶点特异性地被 sgRNA 的 20nt 引导的序列区严格控制着,但几项初步研究表明,sgRNA 邻近 PAM 的 10~12 bp 的碱基配对更能决定 Cas9 的靶点特异性,并且通常比其余的向导 RNA(gRNA)序列更重要^[2,18]。此外,sgRNA 的 GC 含量也与特异性密切相关。在一项 CRISPR/Cas9 介导诱变的研究中观察到,sgRNAs 的 PAM 序列的最近端区域其诱变效率与 GC 含量呈正相关^[27]。研究表明,在最接近 PAM 序列的 6 个碱基对的序列中,具有至少 4 个 GC 的 sgRNA 具有超过 60% 的可遗传突变率,这提示可以根据 PAM 附近序列的 GC 含量选择有效的 sgRNA。

2.1.2 PAM

CRISPR/Cas9 系统进行切割的必要条件就是 PAM 序列区,也就是说即使靶点序列与 sgRNA 序列完全匹配,如果没有 PAM 序列,Cas9 也不能进行切割^[28],而 DNA 的切割效率也取决于 PAM 序列^[29]。NGG(N 可为 A,T,C 或 G)是 PAM 的既定序列。然而,最近的研究表明,尽管与 NGG 相比只有约五分之一的结合效率,II 型 CRISPR 系统也可以使用 NRG(其中 R 为 G 或 A)作为 PAM 序列。几项研究报告,NRG 序列是人 EMX 基因座中 CRISPR/Cas9 介导的 DNA 切割的主要非既定 PAM^[9,30]。PAM 序列中每个碱基的结合频率不同。第 1 个核苷酸是最不固定的,其中 G 在接近 50% 的结合位点,而第 2 个位置,G 在大于 90% 的结合位点^[9,31],表明 NRG 不是 CRISPR/Cas9 序列设计的最佳 PAM。因此,NRG PAM 序列对 Cas9 DNA 切割的确切作用在很大程度上尚不清楚^[32]。

2.1.3 Cas9 蛋白和其他因素

研究显示,将纯化的 Cas9 蛋白和 sgRNA 直接输送到细胞中,可导致脱靶效应降低,这是因为 Cas9-sgRNA 核糖核蛋白复合物

在分娩后几乎立即切割染色体 DNA 并在细胞中迅速降解^[33-34]。脱靶效应还可能与细胞型特异性有关,并且高度取决于特定细胞类型的 DNA 双链断裂(DBS)修复途径的完整性^[35]。此外,CpG 位点的 DNA 甲基化也可能阻碍 Cas9 在细胞中的结合效率^[36]。

2.2 降低脱靶效应的策略

2.2.1 改变 sgRNA 序列

通过截短 sgRNA 的 3' 末端、缩短与 sgRNA 的 5' 末端的靶点互补区域 3nt 或添加 2 个鸟嘌呤核苷酸到 sgRNA 的 5' 末端,可以大大降低脱靶反应,并可在一些脱靶位点减少约 5 000 倍突变的可能^[25,37]。同时,RNA 引导的内切核酸酶(RNA-guided endonuclease,RGEN)使用这些改变的 sgRNA 也可以降低脱靶效应。

2.2.2 控制 Cas9/sgRNA 复合物的浓度

如果增加转染的 DNA 量,则增加了 Cas9/sgRNA 复合物的浓度,虽然增加了正确靶点的结合率,但也增加了脱靶效应;如果减少转染的 DNA 的量,则减少了 Cas9/sgRNA 复合物的浓度,通过增加靶点专一性导致靶内切割减少,即脱靶效应减少,但正确靶点的结合率也随之降低^[38]。因此,必须考虑靶内切割效率和脱靶效应之间的平衡。所以未来对 Cas9 和 sgRNA 的优化设计需要考虑在提高 Cas9 特异性的同时而不牺牲靶内切割效率^[9,25,39]。

2.2.3 应用双切口措施

尽管可以设计高度特异性的 sgRNA,但是 Cas9 的脱靶活性却降低了其靶向位点的数量,为了克服这个缺陷,有研究者将 Cas9 蛋白修饰得到其突变型 D10ACas9 切口酶(Cas9n),Cas9n 替换野生型 Cas9 蛋白^[40-41]。这些 Cas9n 需要一对 sgRNA 编辑 1 个位点,由于 Cas9n 只有 1 个结构域,只能通过切割 DNA 单链产生 1 个切口,因此 Cas9n 会在每个 sgRNA 结合的位置形成单链切口,两个相邻的单链切口会引起 DBS,DBS 形成后细胞会进行修复。而在脱靶位点处,单链切口则无法形成 DBS。因此,该方法在保持基因切割效率的同时,具有最小程度的脱靶效应。目前,该方法已经被其他许多实验室广泛应用^[39-40,42]。

2.2.4 fCas9 系统

为了进一步提高 DNA 的切割特异性,研究者已经合成了具有 FokI 核酸酶结构域(fCas9)的无催化活性的 Cas9(dCas9)的融合物(FokI-dCas9),FokI-dCas9 编辑目标 DNA 位点的特异性比野生型 Cas9 高 140 倍以上^[43-44]。fCas9 系统要求当两个 FokI-dCas9 彼此靠近形成二聚体时才可进行 DNA 切割。该方法在很大程度上降低了非靶向位点的 DNA 切割^[44]。

3 CRISPR/Cas9 系统介导的 ncRNA 编辑在人类癌症中的应用

3.1 CRISPR/Cas9 系统中的微 RNA(miRNA)编辑

目前,许多研究已经表明 CRISPR/Cas9 系统是 ncRNA 相关基因组编辑或调控的最佳选择^[45-52]。miRNA 作为主要的 ncRNA 之一在 CRISPR/Cas9 相关领域已被广泛研究。CHANG 等^[45]证明了 CRISPR/Cas9 系统在初级 miRNA 结构上产生的改变可导致成

熟的 miRNA 在体内和体外下调,同时,这项研究还表明正确设计 CRISPR/Cas9 中 sgRNA 可显著将同一家族中具有高度保守序列的 miRNA 的脱靶效应最小化。ZHOU 等^[53]的研究中利用 CRISPR/Cas9 系统成功敲除了肝癌细胞系中的 miRNA-3188,发现 miRNA-3188 KO 能有效地抑制细胞生长、侵袭和迁移,并抑制裸鼠中的异种移植物肿瘤生长。另一项研究表明,慢病毒 CRISPR/Cas9 载体在将插入和缺失引入前体 miRNA 序列中是高效的,通过使用该方法研究者成功地破坏了 miRNA-21 的表达,并发现前体 miRNA-21 序列的破坏可导致卵巢癌细胞的增殖、迁移和侵袭的减少。除了编辑或调节上述的 miRNA 之外,CRISPR/Cas9 系统在各种癌细胞或生物体中也显示出对其他 miRNA 如 miRNA-137、miRNA-93、miRNA-309、miRNA-126a/b 等的广泛应用^[47-51]。

3.2 CRISPR/Cas9 系统中的长链非编码 RNA (lncRNA) 编辑 除了 miRNA 之外,另一种主要调控多种生物学过程的 ncRNA,即 lncRNA 已经被 CRISPR/Cas9 系统成功调控。尿路上皮癌抗原 1 (UCA1) 是膀胱癌中上调的 lncRNA,可以通过特定设计的 CRISPR/Cas9 的 gRNA 来靶向,并在体内和体外有效地被抑制^[54]。可见,CRISPR/Cas9 系统可调节 lncRNA 的表达,并可为临床治疗癌症提供新方法。微小的基因的缺失或插入可能不一定使某个非编码基因的功能丧失,这可能是将 CRISPR/Cas9 系统应用于非编码基因的限制之一。为了克服这个障碍,HO 等^[55]采用同源重组技术,将标记基因整合到基因组中,通过 CRISPR/Cas9 系统成功地将 UCA1、lncRNA-21 及 AK023948 分别在 HTC-116 和 MCF-7 细胞中敲除。在 SHECHNER 等^[56]的研究中,研究者开发了 CRISPR-Display (CRISP-Disp) 法,一种使用 Cas9 将大分子 RNA 载体部署到 DNA 基因座的有目标性的定位方法,研究者发现至少长 4.8 bp 的功能性 RNA 结构域可以插入 CRISPR gRNA 的多个位点中,从而允许构建具有天然 lncRNA 的 Cas9 复合物,这种方法可能为癌症领域中的 lncRNA 研究开辟一条途径。

4 小 结

目前 CRISPR/Cas9 系统作为第 3 代基因编辑技术,由于其经济、易操作,研究者们可以在其工作包中通过获得更好的选择而轻松地编辑感兴趣的基因组等优点已成为科学界的研究热点。虽然 CRISPR/Cas9 系统的优势不言而喻,但它仍面临着许多问题与挑战。

CRISPR/Cas9 系统的脱靶效应可能会是造成不良遗传改变的原因,从而导致癌症或其他棘手的问题,成为 CRISPR/Cas9 系统的瓶颈。虽然研究者们已经投入了很多努力改进对脱靶效应的预测和降低脱靶效应,但为了能更精确有效地编辑目标序列,需要研究者们开发更多的技术和算法。以往地研究认为,脱靶效应是一个不常见的现象,然而 SCHAEFER 等^[24]的研究表明脱靶效应是广泛存在的,尽管这个观

点对以往的结论提出了挑战,但这不是 CRISPR/Cas9 系统的危机,相反,这是研究者在使用新技术时检测脱靶效应的助力。

伦理问题是研究者在实际应用 CRISPR/Cas9 相关技术之前无法避免的问题。迄今为止,大多数国家都允许研究者编辑基因组,用于提高粮食产量其他生物用途。然而,关于操纵人类的卵子和精子等仍然非常具有争议。首先,CRISPR/Cas9 技术仍是一个尚不成熟的基因编辑技术,遗传改造对后代的长期影响知之甚少,一旦发生错误或脱靶效应,将导致严重的后果。其次,CRISPR/Cas9 技术可以编辑想要的任何基因组,如果将 CRISPR/Cas9 技术应用于反进化和反人类,将会带来巨大的社会冲突。尽管存在分歧,但笔者乐观地认为,研究者将会就这个问题与伦理学家和法律达成共识。

尽管 CRISPR/Cas9 系统仍然存在各种各样的局限性和障碍,但相信将来随着技术的逐渐成熟,能够有助于药物发现、癌症治疗及基因疾病的治愈。

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.
- [2] CONG L E, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823.
- [3] 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.
- [4] ZHUO C, HOU W, HU L, et al. Genomic editing of non-coding RNA genes with CRISPR/Cas9 ushers in a potential novel approach to study and treat schizophrenia[J]. *Front Mol Neurosci*, 2017, 10: 28.
- [5] CANVER M C, BAUER D E, ORKIN S H. Functional interrogation of non-coding DNA through CRISPR genome editing[J]. *Methods*, 2017(121/122): 118-129.
- [6] MALI P, AACH J, STRANGES P B, et al. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering[J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 833-838.
- [7] HSU P D, SCOTT D A, WEINSTEIN J A, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases[J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 827-832.
- [8] JEMAL A, BRAY F, CENTER M M, et al. Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.
- [9] STUPP R, HEGI M E, MASON W P, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial[J]. *Lancet Oncol*, 2009, 10(5): 459-466.
- [10] PABO C O, PEISACH E, GRANT R A. Design and selection of novel Cys2His2 Zinc finger proteins[J]. *Annu Rev Biochem*, 2001, 70: 313-340.
- [11] BOCH J, SCHOLZE H, SCHORNACK S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III ef-

- factors[J]. *Science*, 2009, 326(5959): 1509-1512.
- [12] MOSCOU M J, BOGDANOVA A J. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors[J]. *Science*, 2009, 326(5959): 1501.
- [13] VAN DER OOST J. Molecular biology. New tool for genome surgery[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 768-770.
- [14] FINERAN P C, CHARPENTIER E. Memory of viral infections by CRISPR-Cas adaptive immune systems; acquisition of new information[J]. *Virology*, 2012, 434(2): 202-209.
- [15] 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]. *J Bacteriol*, 1987, 169(12): 5429-5433.
- [16] HAFT D H, SELENGUT J, MONGODIN E F, et al. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes[J]. *PLoS Comput Biol*, 2005, 1(6): e60.
- [17] 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.
- [18] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. *Science*, 2012, 337(696): 816-821.
- [19] JINEK M, EAST A, CHENG A, et al. RNA-programmed genome editing in human cells[J]. *Elife*, 2013, 2(2): e00471.
- [20] 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.
- [21] BROUNS S J, JORE M M, LUNDGREN M A, et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes[J]. *Science*, 2008, 321(5891): 960-964.
- [22] WOLLEBO H S, BELLIZZI A, KAMINSKI R, et al. CRISPR/Cas9 system as an agent for eliminating polyomavirus JC infection[J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0136046.
- [23] YANG L, GRISHIN D, WANG G, et al. Targeted and genome-wide sequencing reveal single nucleotide variations impacting specificity of Cas9 in human stem cells[J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 5507.
- [24] SCHAEFER K A, WU W H, COLGAN D F, et al. Unexpected mutations after CRISPR-Cas9 editing in vivo[J]. *Nat Methods*, 2017, 14(6): 547-548.
- [25] PATTANAYAK V, LIN S, GUILINGER J P, et al. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity[J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 839-843.
- [26] LIN Y, CRADICK T J, BROWN M T, et al. CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences[J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(11): 7473-7485.
- [27] 沈崇灵. 现代西方法理学[M]. 北京: 北京大学出版社, 1994: 51-52.
- [28] STERNBERG S H, REDDING S, JINEK M, et al. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9[J]. *Nature*, 2014, 507(7490): 62-67.
- [29] 郑武, 谷峰. CRISPR/Cas9 的应用及脱靶效应研究进展[J]. *遗传*, 2015, 37(10): 1003-1010.
- [30] JIANG W, BIKARD D, COX D, et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems[J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 233-239.
- [31] KUSCU C, ARSLAN S, SINGH R, et al. Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease[J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(7): 677-683.
- [32] ZHANG Y, GE X, YANG F, et al. Comparison of non-canonical PAMs for CRISPR/Cas9-mediated DNA cleavage in human cells[J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 5405.
- [33] KIM S, KIM D, CHO S W, et al. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins[J]. *Genome Res*, 2014, 24(6): 1012-1019.
- [34] RAMAKRISHNA S, KWAKU DAD A B, BELOOR J, et al. Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA[J]. *Genome Res*, 2014, 24(6): 1020-1027.
- [35] DUAN J, LU G, XIE Z, et al. Genome-wide identification of CRISPR/Cas9 off-targets in human genome[J]. *Cell Res*, 2014, 24(8): 1009-1012.
- [36] YU C, LIU Y, MA T, et al. Small molecules enhance CRISPR genome editing in pluripotent stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 16(2): 142-147.
- [37] PAULIS M, CASTELLI A, LIZIER M, et al. A pre-screening FISH-based method to detect CRISPR/Cas9 off-targets in mouse embryonic stem cells[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 12327.
- [38] 尹坤, 贺桂芳, 赖方稔, 等. CRISPR/Cas9 系统的脱靶效应[J]. *生物技术通报*, 2016, 32(3): 31-37.
- [39] FU Y, FODEN J A, KHAYTER C, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells[J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 822-826.
- [40] RAN F A, HSU P D, LIN C Y, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity[J]. *Cell*, 2013, 154(6): 1380-1389.
- [41] TREVINO A E, ZHANG F. Genome editing using Cas9 nickases[J]. *Methods Enzymol*, 2014, 546: 161-174.
- [42] SHEN B, ZHANG W, ZHANG J, et al. Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects[J]. *Nat Methods*, 2014, 11(4): 399-402.
- [43] GUILINGER J P, THOMPSON D B, LIU D R. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification[J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(6): 577-582.
- [44] TSAI S Q, WYVEKENS N, KHAYTER C, et al. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing[J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(6): 569-576.
- [45] CHANG H, YI B, MA R, et al. CRISPR/cas9, a novel genomic tool to knock down microRNA in vitro and in vivo[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 22312.
- [46] HUO W, ZHAO G, YIN J, et al. Lentiviral CRISPR/Cas9 vector mediated miR-21 gene editing inhibits(下转第 2486 页)

- [13] CHUNG S J, KIM M J, KIM J, et al. Association of type 2 diabetes GWAS loci and the risk of Parkinson's and Alzheimer's diseases [J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2015, 21(12):1435-1440.
- [14] LOCKE J M, WEI F Y, TOMIZAWA K, et al. A cautionary tale: the non-causal association between type 2 diabetes risk SNP, rs7756992, and levels of non-coding RNA, CDKAL1-v1 [J]. *Diabetologia*, 2015, 58(4):745-748.
- [15] GADGIL M D, OZA-FRANK R, KANDULA N R, et al. Type 2 diabetes after gestational diabetes mellitus in south Asian women in the United States [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2017, 33(5). (2017-02-22)[2018-03-21]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/dmrr.2891>.
- [16] 杨丽颖. 妊娠期糖尿病产后 2 型糖尿病的发生状况及行为干预的探讨 [D]. 大连: 大连医科大学, 2011.
- [17] TANASE-NAKAO K, ARATA N, KAWASAKI M, et al. Potential protective effect of lactation against incidence of type 2 diabetes mellitus in women with previous gestational diabetes mellitus; a systematic review and meta-analysis [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2017, 33(4):e2875.
- [18] 张丽红. SLC30A8 基因, CDKAL1 基因与妊娠糖尿病的相关性研究 [D]. 北京: 中国协和医科大学, 2011.
- [19] KWAK S H, KIM S H, CHO Y M, et al. A genome-wide association study of gestational diabetes mellitus in Korean women [J]. *Diabetes*, 2012, 61(2):531-541.
- [20] 武玉莲, 李素萍, 张泽, 等. CDKAL1 基因多态性与妊娠期糖尿病及其临床特点的相关性研究 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2015, 23(6):501-504.
- [21] YIN X, WARNER D R, ROBERTS E A, et al. Novel interaction between nuclear co-activator CBP and the CDK5 activator binding protein-C53 [J]. *Int J Mol Med*, 2005, 16(2):251-256.
- [22] MIRANDA-PEREZ M E, ORTEGA-CAMARILLO C, DEL CARMEN ESCOBAR-VILLANUEVA M, et al. Cucurbita ficifolia Bouché increases insulin secretion in RINm5F cells through an influx of Ca²⁺ from the endoplasmic reticulum [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 188:159-166.
- [23] STADLBAUER K, LEHNER Z, STAMENKOVIC N, et al. Dissection of mechanisms that account for imidazoline-induced lowering of blood glucose in mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 741:178-185.
- [24] BRAMBILLASCA S, ALTKRUEGER A, COLOMBO S F, et al. CDK5 regulatory subunit-associated protein 1-like 1 (CDKAL1) is a tail-anchored protein in the endoplasmic reticulum (ER) of insulinoma cells [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(50):41808-41819.
- [25] TORKKO J M, PRIMO M E, DIRKX R, et al. Stability of proICA512/IA-2 and its targeting to insulin secretory granules require β 4-sheet-mediated dimerization of its ectodomain in the endoplasmic reticulum [J]. *Mol Cell Biol*, 2015, 35(6):914-927.
- [26] WEI F Y, TOMIZAWA K. Development of type 2 diabetes caused by a deficiency of a tRNA (lys) modification [J]. *Islets*, 2012, 4(1):71-73.

(收稿日期:2018-01-10 修回日期:2018-03-18)

(上接第 2483 页)

- the epithelial to mesenchymal transition in ovarian cancer cells [J]. *J Cancer*, 2017, 8(1):57-64.
- [47] LI X, CHEN W, ZENG W, et al. MicroRNA-137 promotes apoptosis in ovarian cancer cells via the regulation of XIAP [J]. *Br J Cancer*, 2017, 116(1):66-76.
- [48] ZHANG Y, ZHAO B, ROY S, et al. MicroRNA-309 targets the homeobox gene SIX4 and controls ovarian development in the mosquito *Aedes aegypti* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(33):E4828-4836.
- [49] CHEN J, ZHU R F, LI F F, et al. MicroRNA-126a directs lymphangiogenesis through interacting with chemokine and Flt4 signaling in zebrafish [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016, 36(12):2381-2393.
- [50] NARAYANAN A, HILL-TERAN G, MORO A, et al. In vivo mutagenesis of miRNA gene families using a scalable multiplexed CRISPR/Cas9 nuclease system [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:32386.
- [51] WALLACE J, HU R, MOSBRUGER T L, et al. Genome-wide CRISPR-Cas9 screen identifies microRNAs that regulate myeloid leukemia cell growth [J]. *PLoS One*, 2016, 11(4):e0153689.
- [52] HO T T, ZHOU N, HUANG J, et al. Targeting non-coding RNAs with the CRISPR/Cas9 system in human cell lines [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(3):e17.
- [53] ZHOU S J, DENG Y L, LIANG H F, et al. Hepatitis B virus X protein promotes CREB-mediated activation of miR-3188 and Notch signaling in hepatocellular carcinoma [J]. *Cell Death Differ*, 2017, 24(9):1577-1587.
- [54] 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.
- [55] HO T T, ZHOU N, HUANG J, et al. Targeting non-coding RNAs with the CRISPR/Cas9 system in human cell lines [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(3):e17.
- [56] SHECHNER D M, HACISULEYMAN E, YOUNGER S T, et al. Multiplexable, locus-specific targeting of long RNAs with CRISPR-display [J]. *Nat Methods*, 2015, 12:664-670.

(收稿日期:2018-01-02 修回日期:2018-03-10)