

· 医药生物技术 ·

基于 CRISPR 转录激活系统构建内源性着丝粒蛋白 F 稳定过表达的肝细胞癌细胞模型

齐赛平, 李潇瑾, 周冬虎*, 黄坚*

首都医科大学附属北京友谊医院 北京市临床医学研究所, 北京 100050

齐赛平, 李潇瑾, 周冬虎, 黄坚. 基于 CRISPR 转录激活系统构建内源性着丝粒蛋白 F 稳定过表达的肝细胞癌细胞模型[J]. 生物工程学报, 2023, 39(9): 3738-3746.

QI Saiping, LI Xiaojin, ZHOU Donghu, HUANG Jian. Construction of a stable centromere protein F overexpression cell model of hepatocellular carcinoma using CRISPR activation system[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(9): 3738-3746.

摘要: 临床研究表明着丝粒蛋白 F (centromere protein F, CENPF) 与肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 的发生相关。由于 CENPF 蛋白的分子量高达 358 kDa, 目前有关 CENPF 致癌机制研究使用的体内外模型主要基于 CENPF 表达敲低, 尚缺乏将 CENPF 过表达以探究其与癌变因果关系的研究, CENPF 过表达改变到底是“因”还是“果”仍不清楚。本研究旨在利用包括 lentiMPHv2 和 lentiSAMv2 两个载体的 CRISPR/dCas9 转录激活协同激活介体 (synergistic activation mediator, SAM) 系统构建内源性 CENPF 稳定过表达的细胞模型, 为阐明 CENPF 过表达与 HCC 发生发展的因果关系提供有效工具。首先设计并合成能够特异性识别 CENPF 基因转录起始位点的单向导核糖核酸 (single guide RNAs, sgRNA), 并将其插入 lentiSAMv2 质粒中。利用慢病毒载体将 lentiMPHv2 质粒导入 Huh-7 和 HCCLM3 细胞株中, 用潮霉素 B 筛选后再用慢病毒载体将连接好的携带 sgRNA 序列的 lentiSAMv2 质粒导入细胞中, 并用杀稻瘟菌素 S 继续筛选。对 2 种抗生素筛选获得的 Huh-7 和 HCCLM3 细胞株样品进行 CENPF mRNA 和蛋白表达水平的检测, 结果显示 sgRNA1 和 sgRNA4 序列均能够激活内源 CENPF 的表达, 其中 sgRNA4 诱导转录效果更加明显。本研究利用 CRISPR/dCas9 系统成功构建内源性 CENPF 稳定过表达的 HCC 细胞模型, 为研究 CENPF 过表达与肿瘤发生的因果关系奠定基础, 并为构建大分子量蛋白过表达的细胞模型提供参考方案。

关键词: CRISPR/dCas9 系统; 稳定过表达; 内源性着丝粒蛋白 F; 肝细胞癌

资助项目: 国家自然科学基金(81602032, 81071973); 国家科技重大专项课题(2017ZX10201201007002)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81602032, 81071973) and the National Major Science and Technology Projects of China (2017ZX10201201007002).

*Corresponding authors. E-mail: ZHOU Donghu, donghuzhou@ccmu.edu.cn; HUANG Jian, huangj1966@hotmail.com

Received: 2022-08-18; Accepted: 2023-03-17

Construction of a stable centromere protein F overexpression cell model of hepatocellular carcinoma using CRISPR activation system

QI Saiping, LI Xiaojin, ZHOU Donghu*, HUANG Jian*

Beijing Institute of Clinical Medicine, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China

Abstract: Current studies have shown that centromere protein F (CENPF) was overexpressed in hepatocellular carcinoma (HCC) and might be involved in the pathogenesis of HCC. Specifically, due to the very large molecular weight (358 kDa) of CENPF full length protein, only CENPF knock-down, but not overexpression models, were applied currently to explore the carcinogenicity of CENPF in HCC. Whether CENPF overexpression is a cause or an effect in HCC remains to be illustrated. We aimed to establish a CENPF overexpression cell model using CRISPR/dCas9 synergistic activation mediator (SAM) system with lentiMPHv2 and lentiSAMv2 vectors to explore the role of CENPF overexpression in HCC. Single guide RNAs (sgRNAs) that specifically identify the transcription initiation site of CENPF gene were synthesized and inserted into the lentiSAMv2 plasmid. Huh-7 and HCCLM3 cells were first transduced with lentiMPHv2 and then selected with hygromycin B. The cells were then transduced with lentiSAMv2 carrying specific sgRNA for CENPF gene, followed by blasticidin S selection. The mRNA and protein detection results of Huh-7 and HCCLM3 cells screened by hygromycin B and blasticidin S showed that the endogenous overexpression of CENPF can be induced by sgRNA1 and sgRNA4, especially by sgRNA4. By using the CRISPR/dCas9 technique, stable cell models with overexpressed CENPF were successfully constructed to explore the role of CENPF in tumorigenesis, which provides a reference for the construction of cell models overexpressing large molecular weight protein.

Keywords: CRISPR/dCas9 system; stable overexpression; endogenous centromere protein F; hepatocellular carcinoma

着丝粒蛋白 F (centromere protein F, CENPF) 是一种动粒相关蛋白,其参与纺锤体检查点蛋白的募集、控制有丝分裂进程并调节细胞周期^[1]。据目前研究报道, CENPF 在多种恶性肿瘤中呈现过表达状态,与肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC)、乳腺癌、前列腺癌和胃癌等多种肿瘤的恶性程度和不良预后密切相关,是一个潜在的诊断和预后标志物^[2-5]。前期本实验室采用血清免疫蛋白质组学结合蛋白芯片技术进行了 HCC 早期诊断血清自身抗体标志物的筛选与

分析研究,筛选出具有较好的诊断早期 HCC 价值的 CENPF 自身抗体,其对早期 HCC 的诊断价值显著高于甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP),尤其是 AFP 阴性的早期 HCC 患者中有 73.58% 呈现 CENPF 自身抗体阳性,此外,自身抗体的产生可能与 CENPF 过表达相关^[6]。进一步的自身抗体产生机制研究显示,过表达及异常定位的 CENPF 蛋白转位介导其自身抗体产生的机制与肿瘤细胞凋亡小体产生以及树突状细胞的吞噬抗原提呈作用相关^[7]。但 CENPF 在 HCC 发生过

程中的作用及机制尚不完全清楚。CENPF 蛋白的分子量高达 358 kDa, 并且在肿瘤细胞中呈现高表达状态, 目前 CENPF 在肿瘤方面的相关研究使用的体内外模型主要为 CENPF 敲低。CENPF 过表达与肿瘤的发生具有显著相关性, 但问题是, CENPF 的过表达导致了肿瘤的发生, 还是肿瘤的发生导致了 CENPF 的过表达? 因此, 亟需基于正常细胞或相对低表达细胞建立 CENPF 过表达细胞模型, 以探究 CENPF 过表达与癌变的因果关系。

目前 CRISPR 技术已广泛应用于基因敲除及突变等领域, 随着人们对 CRISPR 技术的深入研究, 这项技术被期望应用于更多的领域, 例如转录激活与转录抑制^[8]。在转录调控系统中, 研究者将 Cas9 突变后形成 dCas9 (dead-Cas9), 它只具有结合 DNA 的能力, 而不具备切割 DNA 的能力^[9]。CRISPR/dCas 系统依赖于单向导核糖核酸(single guide RNA, sgRNA)靶向目的序列, 结合靶序列后, CRISPR/dCas 转录激活系统招募转录起始复合物以激活目的基因表达^[10]。不同 CRISPR 转录激活系统招募转录起始复合物的方式各不相同: 一些系统依赖于融合蛋白, 而另一些则对 Cas 系统本身的组件进行了优化。协同激活介体(synergistic activation mediator, SAM)、SunTag、VPR 等系统相比最初的 dCas9-VP64 系统在招募转录起始复合物方式上都做出了显著的改进^[11-14]。SAM 系统通过改造 sgRNA 实现转录激活, 改造后的 sgRNA 既可以靶向目的序列, 又可以通过 MS2 蛋白与转录激活因子间接结合。相较于其他 CRISPR 转录激活系统, SAM 系统在靶向单个基因时始终显示出最高水平的基因激活, 这也使得其成为 CRISPR 转录激活系统最受欢迎的方法之一^[15]。

本研究旨在通过 CRISPR 转录激活内源 CENPF 的表达以建立 CENPF 过表达的细胞模

型, 为阐明 CENPF 过表达与 HCC 发生发展的因果关系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌细胞株 Huh-7、人胚肾细胞 293T 购于中国科学院细胞库。人肝癌细胞株 HCCLM3 购于武汉大学中国典型培养物保藏中心。Stbl3 感受态细胞购于博迈德公司。LentiSAMv2、lentiMPHv2、psPAX2 和 pMD2.G 质粒均来自于 Addgene 平台。BsmBI 酶、T4 PNK 酶、快速连接酶均购自 NEB 公司。潮霉素 B 和杀稻瘟菌素 S 购于索莱宝公司。氨苄青霉素购自上海碧云天生物技术有限公司。青链霉素购自 Sigma 公司。DMEM 培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自于 Gibco 公司。含 EDTA 的胰蛋白酶购自于 BI 公司。1×磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered saline, PBS)购自于普诺赛公司。JetPRIME 转染试剂购自 Polyplus 公司。CENPF 特异性 sgRNA 序列、实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time polymerase chain reaction, real-time PCR)引物合成于北京天一辉远生物技术公司。慢病毒浓缩试剂购自合生生物公司。RNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒均购自于康为世纪生物技术股份有限公司。10×RIPA 裂解缓冲液购自 Millipore 公司。磷酸酶抑制剂、蛋白酶抑制剂购自 Roche 公司。逆转录试剂盒购自 TaKaRa 公司。Real-time PCR 酶购自于 ABI 公司。CENPF 抗体购自于 Abcam 公司。

1.2 方法

1.2.1 CENPF 特异性 sgRNA 的设计选取

利用 <http://crispr-era.stanford.edu/index.jsp> 网站, 设计 4 条适用于 CRISPR 转录激活内源 CENPF 表达的 sgRNA 序列(表 1)。

表 1 *CENPF* 基因特异性的 sgRNA 和 real-time PCR 引物序列

Table 1 The *CENPF* gene-specific sgRNA and real-time PCR primers sequence

<i>CENPF</i>	Sequence (5'→3')
sgRNA-1F	CACCGAGAACAGTAAACTCCGGCGC
sgRNA-1R	AAACGCGCCGGAGTTTACTGTTCTC
sgRNA-2F	CACCGACCACGCCTTCCTAATCAG
sgRNA-2R	AAACCTGATTAGGAAGGCGTGTC
sgRNA-3F	CACCGCAGTCTGAGTGCGCAGGCG
sgRNA-3R	AAACCGCCTGCGCACTCAGACTGC
sgRNA-4F	CACCGCGCAGGCACCTCCAGTAGA
sgRNA-4R	AAACTCTACTGGAGGTGCCTGCGC
primer-F	GACCAGGCGTCAACCAAGTA
primer-R	ACGGGAGAGCTCCTCTTGAA

1.2.2 sgRNA 与 lentiSAMv2 质粒载体的连接及阳性克隆的筛选

利用 *BsmB* I 酶将 lentiSAMv2 质粒在 37 °C 下孵育酶切 30 min, 酶切结束之后进行琼脂糖凝胶电泳, 回收目的片段; 在 PCR 仪中使用 T4 PNK 酶将每对 *CENPF* 特异性 sgRNA 序列进行磷酸化和退火: 37 °C 孵育 30 min, 95 °C 孵育 5 min, 然后以 5 °C/min 的速度降温至 25 °C。将退火的 sgRNA 以 1:200 稀释, 并使用快速连接酶在室温下与酶切后的 lentiSAMv2 载体连接 10 min。将连接产物转化到 *Stbl3* 感受态细胞中。转化产物的菌液均匀涂于含有氨苄青霉素的 LB 琼脂培养皿上。37 °C 培养 12–16 h, 挑取单克隆接种至 1 mL 含有氨苄青霉素的 LB 培养液中, 以 200 r/min 的速度 37 °C 培养 3–5 h, 取 600 μL 菌液小量提取质粒后测序鉴定阳性克隆。

1.2.3 病毒的包装和感染

将 lentiMPHv2 质粒和连接好的 lentiSAMv2 质粒包装为慢病毒。将 293T 细胞接种于 10 cm 培养皿中, 待细胞密度达到 70%–80% 时即可进行转染。转染前将培养基更换为新鲜的 DMEM 完全培养基。将载体质粒(含有病毒的 LTRs 和目的基因序列结构)、psPAX2 质粒(包装质粒, 载

有病毒 *gag*、*pol*、*rev* 和 *tat* 基因)、pMD2.G 质粒(包膜质粒, 含有病毒 VSV-G 基因序列)以 4:3:1 的比例转染到 293T 细胞以包装重组慢病毒。转染约 12 h 进行换液, 加入 10 mL DMEM 培养基, 收集病毒的时间分别是转染后 48 h 和 72 h。48 h 收集的培养上清暂于 4 °C 冰箱保存, 并在细胞培养皿中更换新鲜培养基。72 h 第 2 次收集上清, 将 2 次收集得到的上清液混合, 4 000×g、4 °C 离心 10 min, 弃沉淀后上清通过 0.45 μm 过滤器进行过滤, 然后用慢病毒浓缩试剂盒进行慢病毒浓缩。浓缩后的病毒分装后于 -80 °C 保存备用。

将 Huh-7 和 HCCLM3 细胞接种于 6 孔板, 37 °C 培养 16–24 h 至细胞汇合度为 20%–30%。更换新鲜培养基后各加入适量 lentiMPHv2 浓缩慢病毒, 感染 12–16 h 后更换新鲜培养基。72 h 后用潮霉素 B 筛选 14 d。然后再用空载和带有 *CENPF* 特异性 sgRNA 序列的 lentiSAMv2 慢病毒感染潮霉素 B 筛选后的细胞, 72 h 后用杀稻瘟菌素 S 筛选 14 d^[16]。

1.2.4 CRISPR 转录激活内源 *CENPF* 效应的鉴定

收集部分经潮霉素 B、杀稻瘟菌素 S 筛选后的 Huh-7 和 HCCLM3 细胞系。用 RNA 提取试剂盒和逆转录试剂盒获得细胞总 RNA 及 cDNA。Real-time PCR 实验检测内源 *CENPF* mRNA 水平的转录激活效果。Real-time PCR 所用 *CENPF* 引物具体序列见表 1。用 RIPA 裂解液提取总蛋白, Western blotting 法检测 *CENPF* 蛋白水平的转录激活效果。

2 结果与分析

2.1 *CENPF*-sgRNA 阳性克隆的验证

分别从 4 条 *CENPF*-sgRNA 表达的系列克隆中随机选取 2 个单克隆菌落, 培养并获取菌液, 小量提取质粒。各选取 1 个质粒进行测序分析(北京天一辉远生物技术公司)。结果显示 *CENPF*

基因特异性的 sgRNA1-4 序列均正确插入 lentiSAMv2 载体, 插入 sgRNA 的序列、方向及位置与预期相符(图 1), 证明 lentiSAMv2-sgRNA 表达载体构建完全正确。

2.2 CENPF 的表达水平检测

潮霉素 B 和杀稻瘟菌素 S 筛选完成后, 继续培养 14 d, 收取筛选获得的 Huh-7 和 HCCLM3 细胞株样品, 利用 real-time PCR 检测 CENPF 转录激活效果, 结果表明, sgRNA1 和 sgRNA4 均能够激活 CENPF 的 mRNA 转录, 其中 sgRNA4 诱导转录效果更为明显(图 2)。同时利用 Western blotting 检测 CENPF 蛋白表达水平, 结果与 real-time PCR 一致(图 3)。继续培养至第 35 天, CENPF mRNA 表达量有所减少, 因此利用潮霉素 B 和杀稻瘟菌素 S 再次同时筛选 14 d (至第 49 天, 图 2)。再次筛选后, 2 种细胞系的 CENPF 过表达水平显著提高。继续培养至第 60 天, sgRNA4 组过表达效果依然显著(图 2, 图 3)。因此, 稳定过表达内源性 CENPF 蛋白的 HCC 细胞株构建成功(图 4)。

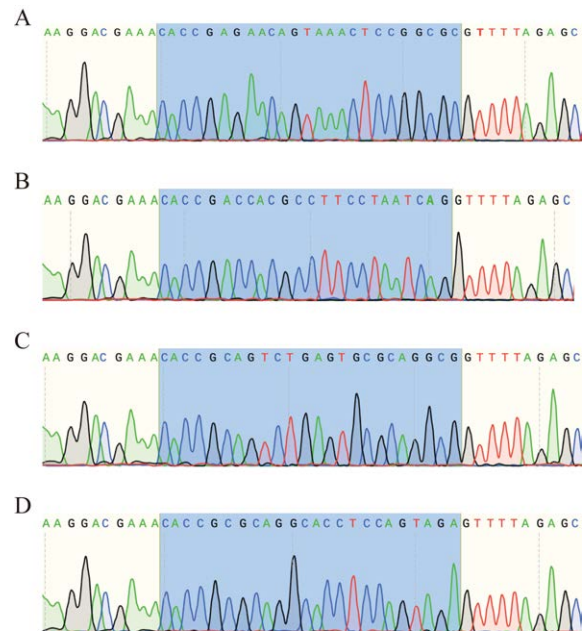


图 1 LentiSAMv2-sgRNA 测序图 A: CENPF-sgRNA1-lentiSAMv2. B: CENPF-sgRNA2-lentiSAMv2. C: CENPF-sgRNA3-lentiSAMv2. D: CENPF-sgRNA4-lentiSAMv2

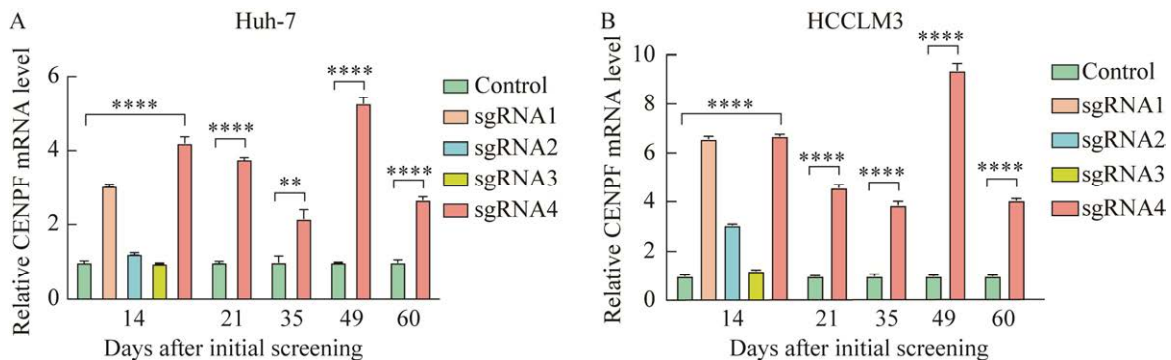


图 2 mRNA 水平检测 CENPF 的转录激活效果 潮霉素 B 和杀稻瘟菌素 S 筛选完成的第 14、21、35、49、60 天, Huh-7 和 HCCLM3 细胞中 CENPF mRNA 的表达均显著增加

Figure 2 Detection of the CENPF transcriptional activation effect. The expression levels of CENPF mRNA in Huh-7 and HCCLM3 cells were significantly elevated at 14, 21, 35, 49 and 60 days after hygromycin B and blasticidin S screening. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism software. **: $P < 0.01$, ****: $P < 0.0001$.

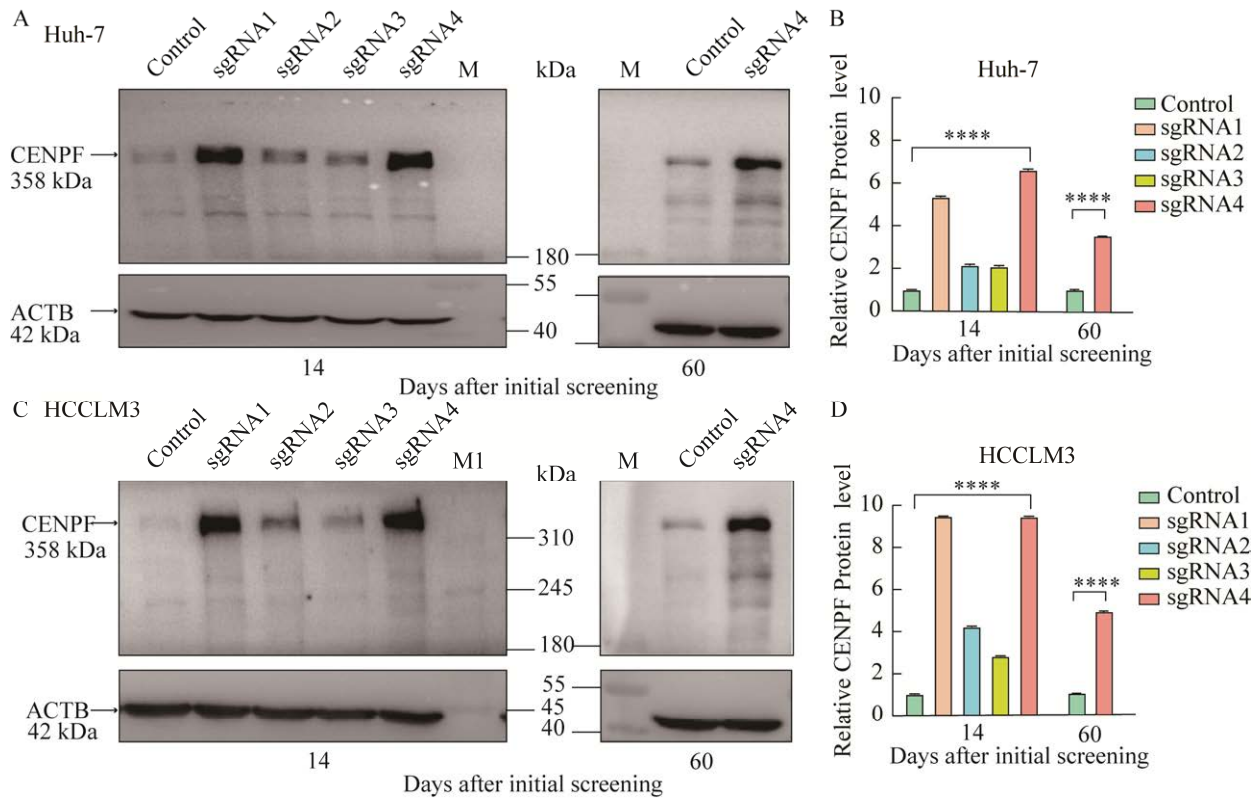


图 3 蛋白水平检测 CENPF 的转录激活效果 潮霉素 B 和杀稻瘟菌素 S 筛选完成的第 14 天和 60 天, Huh-7 和 HCCLM3 细胞中 CENPF 蛋白表达均显著增加

Figure 3 Detection of the CENPF transcriptional activation effect. The expression levels of CENPF protein in Huh-7 and HCCLM3 cells were significantly elevated at 14 and 60 days after hygromycin B and blasticidin S screening. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism software. M: Protein marker (No. 26616, 10–180 kDa, Thermo Fisher Scientific); M1: Protein marker (No. PM2800, 10–310 kDa, SMOBIO); ****: $P < 0.0001$.

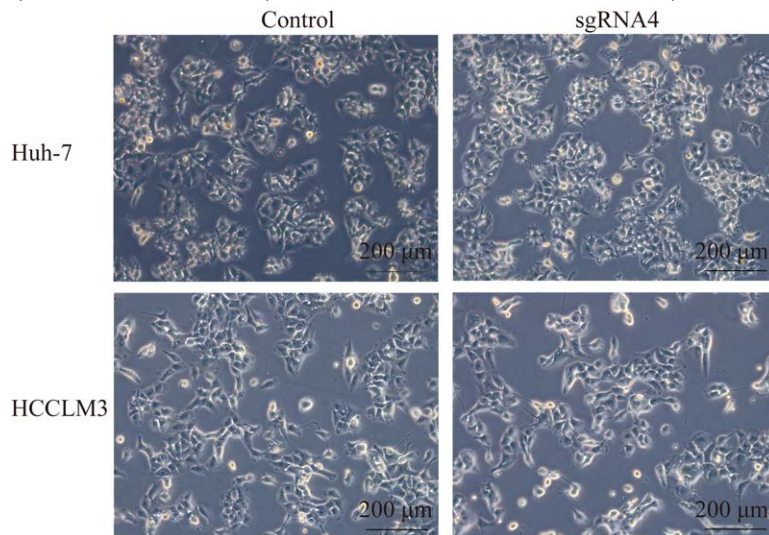


图 4 经潮霉素 B 和杀稻瘟菌素 S 筛选后的 Huh-7 和 HCCLM3 细胞株图片 细胞状态尚好, 无明显异常形态改变

Figure 4 Photos of Huh-7 and HCCLM3 cells after hygromycin B and blasticidin S screening. The cells are in good condition and no obvious morphological changes are observed.

究结果显示, CENPF 基因扩增频率在乙型肝炎病毒阳性的 HCC 组织中显著高于乙型肝炎病毒阴性的 HCC 组织(未发表数据), 这表明 HCC 组织中存在的高频率基因扩增可能与乙型肝炎病毒感染相关。但 CENPF 在恶性肿瘤中的过表达状态是否由基因扩增引起还有待进一步研究。由于 CENPF 蛋白分子量过大, 还没有研究成功构建 CENPF 过表达细胞模型, 以阐明 CENPF 过表达与肿瘤发生的因果关系, 这严重阻碍了 CENPF 在肿瘤治疗领域的应用。

本研究利用 CRISPR/dCas9 转录激活 SAM 系统, 首先设计 4 条 CENPF 特异性的 sgRNA 并与 lentiSAMv2 载体连接。将 lentiMPHv2、lentiSAMv2 质粒包装为慢病毒后感染 Huh-7、HCCLM3 细胞, 经潮霉素 B、杀稻瘟菌素 S 筛选后获得内源性 CENPF 高表达的 HCC 细胞模型, 其 mRNA 及蛋白水平均显著提高, 为阐明 CENPF 过表达与 HCC 发生发展的因果关系奠定基础, 并为构建大分子量蛋白过表达的细胞模型提供参考方案。

REFERENCES

- [1] HUANG YG, LI D, WANG L, SU XM, TANG XB. CENPF/CDK1 signaling pathway enhances the progression of adrenocortical carcinoma by regulating the G2/M-phase cell cycle[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2022, 20(1): 78.
- [2] CHEN EB, QIN X, PENG K, LI Q, TANG C, WEI YC, YU S, GAN L, LIU TS. HnRNPR-CCNB1/CENPF axis contributes to gastric cancer proliferation and metastasis[J]. *Aging*, 2019, 11(18): 7473-7491.
- [3] LIN SC, KAO CY, LEE HJ, CREIGHTON CJ, ITTMANN MM, TSAI SJ, TSAI SY, TSAI MJ. Dysregulation of miRNAs-COUP-TFII-FOXM1-CENPF axis contributes to the metastasis of prostate cancer[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 11418.
- [4] CHEN Q, XU HC, ZHU J, FENG KH, HU CL. LncRNA MCM3AP-AS1 promotes breast cancer progression via modulating miR-28-5p/CENPF axis[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 128: 110289.
- [5] CHEN HJ, WU FB, XU HJ, WEI GQ, DING M, XU FG, DEIVASIGAMANI A, ZHOU GR, HUI KM, XIA HP. Centromere protein F promotes progression of hepatocellular carcinoma through ERK and cell cycle-associated pathways[J]. *Cancer Gene Therapy*, 2022, 29(7): 1033-1042.
- [6] HONG Y, LONG J, LI H, CHEN SH, LIU QQ, ZHANG B, HE XM, WANG Y, LI HY, LI YM, ZHANG T, LU CZ, YAN H, ZHANG ML, LI Q, CAO BW, BAI ZG, WANG J, ZHANG ZT, ZHU ST, et al. An analysis of immunoreactive signatures in early stage hepatocellular carcinoma[J]. *EBioMedicine*, 2015, 2(5): 438-446.
- [7] LI XJ, LI YM, XU AJ, ZHOU DH, ZHANG B, QI SP, CHEN ZB, WANG XM, OU XJ, CAO BW, QU CF, HUANG J. Apoptosis-induced translocation of centromere protein F in its corresponding autoantibody production in hepatocellular carcinoma[J]. *OncoImmunology*, 2021, 10(1): 1992104.
- [8] WANG SW, GAO C, ZHENG YM, YI L, LU JC, HUANG XY, CAI JB, ZHANG PF, CUI YH, KE AW. Current applications and future perspective of CRISPR/Cas9 gene editing in cancer[J]. *Molecular Cancer*, 2022, 21(1): 57.
- [9] GILBERT LA, LARSON MH, MORSUT L, LIU ZR, BRAR GA, TORRES SE, STERN-GINOSSAR N, BRANDMAN O, WHITEHEAD EH, DOUDNA JA, LIM WA, WEISSMAN JS, QI LS. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes[J]. *Cell*, 2013, 154(2): 442-451.
- [10] PEREZ-PINERA P, DEWRAN KOCOK D, VOCKLEY CM, ADLER AF, KABADI AM, POLSTEIN LR, THAKORE PI, GLASS KA, OUSTEROUT DG, LEONG KW, GUILAK F, CRAWFORD GE, REDDY TE, GERSBACH CA. RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 973-976.
- [11] TANENBAUM ME, GILBERT LA, QI LS, WEISSMAN JS, VALE RD. A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging[J]. *Cell*, 2014, 159(3): 635-646.
- [12] JOUNG J, KONERMANN S, GOOTENBERG JS, ABUDAYYEH OO, PLATT RJ, BRIGHAM MD, SANJANA NE, ZHANG F. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout and transcriptional activation screening[J]. *Nature Protocols*, 2017, 12(4): 828-863.

- [13] BÖHM S, SPLITH V, RIEDMAYR LM, DOMINIK RÖTZER R, GASPARONI G, NORDSTRÖM KJV, ELISABETH WAGNER J, HINRICHSMEYER KS, WALTER J, WAHL-SCHOTT C, FENSKE S, BIEL M, MICHALAKIS S, BECIROVIC E. A gene therapy for inherited blindness using dCas9-VPR-mediated transcriptional activation[J]. *Science Advances*, 2020, 6(34): eaba5614.
- [14] LI ZX, ZHANG DD, XIONG XY, YAN BY, XIE W, SHEEN J, LI JF. A potent Cas9-derived gene activator for plant and mammalian cells[J]. *Nature Plants*, 2017, 3(12): 930-936.
- [15] 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[J]. *Nature*, 2015, 517(7536): 583-588.
- [16] DAI MO, YAN G, WANG N, DALIAH G, EDICK AM, POULET S, BOUDREAULT J, ALI S, BURGOS SA, LEBRUN JJ. *In vivo* genome-wide CRISPR screen reveals breast cancer vulnerabilities and synergistic mTOR/Hippo targeted combination therapy[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 3055.
- [17] SUN JB, HUANG JZ, LAN J, ZHOU K, GAO Y, SONG ZG, DENG YY, LIU LX, DONG Y, LIU LX. Overexpression of CENPF correlates with poor prognosis and tumor bone metastasis in breast cancer[J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19: 264.
- [18] HUANG YG, CHEN XW, WANG L, WANG TY, TANG XB, SU XM. Centromere protein F (CENPF) serves as a potential prognostic biomarker and target for human hepatocellular carcinoma[J]. *Journal of Cancer*, 2021, 12(10): 2933-2951.
- [19] YANG X, MIAO BS, WEI CY, DONG RZ, GAO PT, ZHANG XY, LU JC, GAO C, WANG XY, SUN HC, ZHOU J, FAN J, KE AW, SHI GM, CAI JB. Lymphoid-specific helicase promotes the growth and invasion of hepatocellular carcinoma by transcriptional regulation of centromere protein F expression[J]. *Cancer Science*, 2019, 110(7): 2133-2144.
- [20] DAI YD, LIU LL, ZENG TT, ZHU YH, LI JC, CHEN LL, LI Y, YUAN YF, MA S, GUAN XY. Characterization of the oncogenic function of centromere protein F in hepatocellular carcinoma[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2013, 436(4): 711-718.
- [21] KIM HE, KIM DG, LEE KJ, SON JG, SONG MY, PARK YM, KIM JJ, CHO SW, CHI SG, CHEONG HS, DOO SHIN H, LEE SW, LEE JK. Frequent amplification of *CENPF*, *GMNN* and *CDK13* genes in hepatocellular carcinomas[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e43223.

(本文责编 郝丽芳)