

## 综述

## 基因编辑在构建抗凋亡工程细胞中的应用

李泓健 严铃禹 陈玉园 冯韵宇 胡汶星 吴星云 仝爱平\*

(四川大学生物治疗国家重点实验室, 成都 610041)

**摘要** 21世纪以来,人们在生物科技领域取得了长足进步。一方面,基因编辑技术的问世为精确修饰目的基因带来可能,即能够在活细胞中完成特定DNA片段的插入、删除、替换、激活、抑制等任务;另一方面,越来越多的新型重组蛋白药物被开发并应用于对抗肿瘤等人类重大疾病,相比于传统化学药物,它具有高特异性和低副作用等显著优势,治疗效果得到普遍认可。目前用于生产治疗性重组蛋白的工程细胞株主要来源于哺乳动物,然而,由于生产过程中任何环境因素的改变都可能使工程细胞凋亡,严重影响蛋白的表达水平,因此大大提高了生产成本。研究人员在明确工程细胞的生长与死亡相关机制后,利用基因编辑技术对其进行了定向改造,提高了其表达水平。该文就对该方面研究成果进行了综述。

**关键词** 基因编辑; CRISPR/Cas系统; 重组蛋白; 哺乳动物细胞; 细胞凋亡

## The Application of Genome Editing in the Construction of Anti-Apoptotic Engineering Cells

Li Hongjian, Yan Qianyu, Chen Yuyuan, Feng Yunyu, Hu Wenxing, Wu Xingyun, Tong Aiping\*

(State Key Laboratory of Biotherapy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**Abstract** Since the 21st century, people have made great progress in the field of biotechnology. The advent of genome editing technology brings possibility to precisely modify target genes, which means we can perform certain tasks in living cells like inserting, deleting, replacing, activating or suppressing specific DNA fragments. Furthermore, more and more new recombinant protein drugs have been developed for combating severe diseases such as cancers. Compared with traditional chemical drugs, it has significant advantages such as high specificity and low side effects. Besides, its therapeutic effect has been widely recognized. Currently, the engineering cell lines used for the production of therapeutic recombinant proteins are mainly derived from mammal cells. However, due to various environmental factors in the production process, the apoptosis rate of engineering cell is extremely high, which seriously affects the expression level of the proteins, resulting in greatly increasing the production costs. After clarifying the mechanisms involved in the growth and death of cells, researchers, by utilizing genome editing technology, modified cells to improve the expression level. Here we attempt to summarize the research results in this field.

**Keywords** genome editing; CRISPR/Cas system; recombinant protein; mammal cell; apoptosis

收稿日期: 2018-07-12 接受日期: 2018-09-12

国家自然科学基金(批准号: 31471286)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 13438456486, E-mail: aipingtong@scu.edu.cn

Received: July 12, 2018 Accepted: September 12, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31471286)

\*Corresponding author. Tel: +86-13438456486, E-mail: aipingtong@scu.edu.cn

网络出版时间: 2018-11-27 16:57:17

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20181127.1650.004.html>

锌指核酸酶技术(zink-finger nucleases, ZFNs)、转录激活样效应因子核酸酶(transcription activator-like effectors nucleases, TALENs)、CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated nucleases)系统是目前较为成熟的三种基因编辑技术,但现在实验室内已经很少采用ZFNs或TALENs技术,原因包括其前期工具质粒构建麻烦、成本高且适用范围不大以及靶位点的识别效率十分低下。CRISPR/Cas系统作为最新一代的基因编辑技术<sup>[1]</sup>,因其构造简单、易于操控和改造以及价格低廉等优势,迅速成为基因编辑领域的主要研究技术<sup>[2-3]</sup>。

基因工程细胞,即将携带目标外源基因的重组子,重组到靶细胞基因组内,形成遗传稳定的新基因组细胞,并且可正常表达目标外源基因的重组细胞。用于重组蛋白表达的工程细胞可分为原核细胞、植物细胞、昆虫细胞、酵母细胞、哺乳动物细胞。由于表达产物主要用于疾病的治疗,其安全性必须得到保证,而哺乳动物细胞生产的蛋白质能够完成较为复杂的糖基化修饰与蛋白质折叠,其抗原性较低,治疗效果更加理想,故哺乳动物细胞是治疗性蛋白质药物生产的首选细胞。目前,FDA批准的治疗性蛋白质药物绝大多数由哺乳动物工程细胞生产。在这类工程细胞中,最具代表性的是中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞和人胚肾HEK293细胞。CHO细胞具有不易感染人类病毒、易于无血清驯化、生长性质优秀、产量较高等优点<sup>[4-5]</sup>,常用于生产各种重组蛋白,如治疗性单克隆抗体<sup>[6-7]</sup>。HEK293细胞凭借其易转染、高表达、天然糖基化修饰、允许蛋白正确折叠和相关翻译后修饰等优点,也被广泛用于实验室和工厂生产重组蛋白<sup>[8]</sup>。但由于哺乳动物细胞对微环境甚为敏感<sup>[9]</sup>,在大规模培养生产时,各种轻微的不利条件,如溶氧过高或过低、营养或血清不足、有害代谢产物积累等,即可引起细胞凋亡,据报道,其凋亡率可高达50%<sup>[10-13]</sup>。以CHO细胞为例,随着连续传代培养代次的增加,CHO细胞发生内部凋亡途径介导的凋亡,同时对凋亡诱导剂的反应更为敏感,导致生产效率低下。目前的重组蛋白表达量取决于总活细胞密度和单位细胞生产率,为提高总活细胞密度,人们针对宿主细胞的改造着眼于抑制细胞凋亡、加快细胞增殖、增加细胞生长速率和提高最

大活细胞密度<sup>[14]</sup>,这类改造多直接针对细胞的基因进行相应改造;为提高单位细胞生产率,人们试图通过改造表达培养基、多次传代驯化细胞等方式以达到目的。这方面已有相关专利申请并用于实际生产,但仅靠优化这些外部培养条件,并未发现生产效率有较大提升,很难根治针对工程细胞凋亡的问题。相反,若对细胞的基因进行改造,使其对外界微环境敏感性降低或内部凋亡途径适当受到抑制,理论上可以达到从根本上抑制工程细胞凋亡的目的。因此,改造细胞相比于改善培养条件等方式更为彻底且更能提高产出效率。本文将着重介绍通过基因编辑技术直接敲除促凋亡基因或直接添加促增殖基因的研究进展。

## 1 CRISPR/Cas基因编辑系统介绍

### 1.1 基因编辑原理

以化脓性链球菌的II型系统为例,这一系统只有一个效应蛋白Cas9(spCas9),Cas9蛋白有两个功能单位,可在人工设计的sgRNA引导下切割特定位点的DNA双链,形成双链DNA断裂(double stranded DNA break, DSB)<sup>[15]</sup>。一般情况下,生物体可通过两种机制参与修复这类DSB<sup>[2]</sup>,一种是非同源末端连接,其结果是DNA上碱基的随机缺失或插入,最终可能导致移码突变,从而达到基因敲除的目的<sup>[16]</sup>;另一种是同源末端连接,主要用于有模板存在的情况,研究人员可通过添加外源模板实现基因的定向插入。由spCas9构成的CRISPR/Cas系统相对成熟,是目前最受研究人员青睐的基因编辑技术。

### 1.2 CRISPR/Cas系统概述

spCas9已被广泛用于基因编辑,同时,科学家们还在探索更多相关功能的酶。一方面,科学家们发现了更多天然的酶类。例如,比spCas9更小、更简单的金黄色葡萄球菌的Cas9(saCas9)蛋白<sup>[17]</sup>和Cpf1<sup>[18]</sup>,它们可降低多基因编辑的难度。此外,人们还发现了Cas12a蛋白,它甚至不需要通过tracrRNA的识别即可达到目的<sup>[19]</sup>,这种蛋白可减少外源基因的导入长度。另一方面,为了满足日益增长的基因编辑需求和克服现有基因编辑脱靶率高等瓶颈,人们试图对已发现的酶进行改造。通过突变3到4个碱基,spCas9突变体可以高效精确地靶向不同的PAM(protospacer-adjacent motif),例如NGA、NGAG和NGCG<sup>[20]</sup>。Kleinstiver等<sup>[21]</sup>设计了一种saCas9的

变体,降低了它对PAM序列的要求,由NNGRRT变成了NNNRRT。为了降低脱靶率,研究人员设计了一种切口酶突变的Cas9(Cas9n),这种Cas9只会导致靶基因单链断裂,需要一对sgRNA同时靶向一个位点并引导Cas9n进行切割,这使基因编辑的脱靶率降低了50~1 000倍<sup>[22]</sup>。在Cas9n的基础上,人们构建了内切酶活性缺失的dCas9(dead Cas9)<sup>[23]</sup>。与普通的Cas9一样,dCas9也会在sgRNA的引导下与靶序列结合,但它却无法切割靶序列,其有两个应用价值:一,它可阻止转录因子或RNA聚合酶与靶序列靠近,从而达到抑制转录的目的<sup>[24]</sup>;二,dCas9的N和C末端具有可修饰的区域,连接转录激活因子后,可用于增强靶序列的表达<sup>[25]</sup>。最近,有研究人员介绍了一种筛选SpCas9突变体的方法——酵母报告菌株筛选法。他们利用易错突变在SpCas9的REC3结构域处制造随机突变并构建突变体库,进行筛选并鉴别出较优的突变体<sup>[26]</sup>。近乎同时,David Liu团队<sup>[27]</sup>为了更快速获得理想的SpCas9突变体,采用了一种新的方法——PACE(phage-assisted continuous evolution)定向进化技术,其诱导效率远高于传统方法,向新型Cas蛋白的出现迈进了一大步。很快,突变体xCas9问世,给基因编辑的应用发展带来了历史性的变革。它不仅具有极低的脱靶率,还能广泛地识别不同的PAM,从而使得Cas9的识别能力增加了至少4倍<sup>[27]</sup>。最后需要指出的是,每一种CRISPR核酸酶都有其独特大小、PAM要求以及引入DBS的位置。在最近的一篇综述中,Komor等<sup>[28]</sup>对这一问题进行了详细介绍。CRISPR/Cas基因编辑技术日趋成熟,这为构建新型重组蛋白工程细胞系奠定了基础。

## 2 细胞凋亡

### 2.1 细胞凋亡机制概述

目前普遍认为的细胞程序性死亡有三种方式,即凋亡、程序性坏死、焦亡。由于细胞凋亡机制相对明了,且凋亡是重组蛋白生产过程中细胞死亡的主要方式,在此主要讨论凋亡机制。目前有两种凋亡途径较为清晰,分别是外源性途径和内源性途径。前者由与细胞表面死亡受体结合的细胞外配体激活,导致死亡诱导信号复合物形成;而在内源性途径中,细胞在自身受到应激时产生信号后激活,并依赖于线粒体膜间隙蛋白质的释放<sup>[29]</sup>。热、辐射、饥饿、缺氧、病毒感染、糖皮质激素与核受体的

结合、胞内钙离子浓度增加等因素都能触发细胞内凋亡信号的激活<sup>[30-31]</sup>。由于重组蛋白工程细胞仅用于在生物体外人工培养,使内源性途径成为导致细胞死亡的关键,接下来我们主要讨论内源性途径的具体机制。

在真核细胞的有氧呼吸过程中,线粒体发挥着关键作用,其功能障碍将会直接导致细胞死亡。这一事实构成了一些凋亡途径的基础。以线粒体为靶点的凋亡蛋白通过各种不同的方式影响着它们的功能。它们可能通过形成膜孔的方式来引起线粒体肿胀,亦或增加线粒体膜的通透性,导致凋亡的发生<sup>[32]</sup>。例如,Bcl-2蛋白家族通过直接作用于线粒体衍生的半胱天冬蛋白酶激活剂(mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC),促进或抑制细胞凋亡,其中Bax和Bak通过在线粒体膜上形成膜孔的方式来引发凋亡,而Bcl-2、Bcl-xL、Mcl-1则抑制其形成。线粒体蛋白被称为是第二类线粒体衍生的半胱天冬蛋白酶激活剂(second mitochondria-derived activator of Caspases, SMACs)。随着线粒体膜通透性的增加,SMACs被释放到细胞的胞质中。SMAC与抑制凋亡的蛋白质(proteins that inhibit apoptosis, IAPs)<sup>[33]</sup>结合,从而使其失活。MAC或SMAC激活后,凋亡小体形成,前Caspase被切割成活性形式的Caspase-9,而Caspase-9则激活效应因子Caspase-3、Caspase-6、Caspase-7,它们作用于特定底物导致细胞凋亡。

后来的研究发现,有一种Caspase非依赖性凋亡途径,由AIF介导发生<sup>[34]</sup>。AIF是一种黄素蛋白<sup>[35]</sup>,在细胞内触发染色质凝聚和DNA断裂,以诱导细胞凋亡的发生。

### 2.2 凋亡抑制通路概述

正常情况下,细胞若要生存,就必须主动地抑制凋亡发生,此处将简要介绍细胞如何抑制凋亡蛋白的表达。对于正常细胞,PI3K/AKT/mTOR这一信号通路在细胞周期的调控中发挥着非常重要的作用。一些生长因子、存活因子可激活PI3K,导致AKT的激活<sup>[36]</sup>,而AKT在细胞存活信号转导中发挥重要作用。AKT可以磷酸化并抑制促凋亡基因Bax、Caspase-9等,同时可抑制TSC1/TSC2的表达,促进mTOR表达,mTOR表达量增加可提高蛋白表达量。对于癌细胞,它们有着自己独特的抗凋亡方式。研究发现,survivin作为凋亡抑制因子在胚胎期细胞和



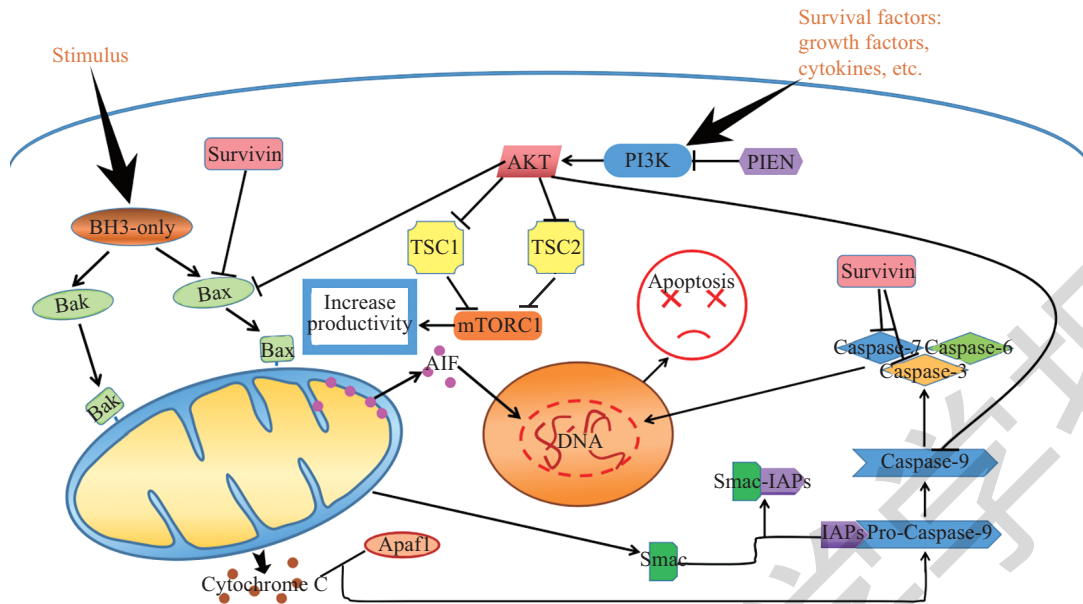


图1 重组蛋白工程细胞相关信号分子示意图

Fig.1 Relevant signal molecules in recombinant protein engineering cells

绝大多数癌细胞中高表达,却在完全分化的细胞中不表达<sup>[37]</sup>。研究发现, survivin主要通过影响Bax、Caspase-3、Caspase-7的活性和阻止细胞色素C的释放来抑制细胞凋亡<sup>[38]</sup>。目前已有科学家利用基因编辑技术对这与survivin相关的细胞凋亡通路进行调节,从而提高了工程细胞的蛋白生产量,具体研究内容将在后文谈到。最后,我们对重组蛋白表达相关信号分子进行了总结(图1)。

### 2.3 细胞凋亡与程序性坏死的联系

最近的研究发现,细胞内存在一种受到基因调控的细胞死亡机制,其形态学特征类似坏死,故该死亡机制被称为细胞程序性坏死<sup>[39]</sup>。该发现表明,细胞可以程序化的方式进行坏死,而细胞在选择死亡方式时,凋亡有时并不是细胞的首选。从二者本质上来说,程序性坏死是凋亡的“替补”死亡方法,当细胞凋亡不能正常发生而细胞必须死亡时,细胞将会启动程序性坏死。从二者的发生机制来说,细胞凋亡与程序性坏死存在较多的联系。一方面,二者信号通路之间可以相互调节: Caspase-8可通过切割RIPK1来抑制坏死小体形成;相反, RIPK1可以通过抗凋亡蛋白cFIP阻止Caspase-8对坏死的抑制作用,该蛋白能使Caspase-8形成异源二聚体而失活<sup>[40]</sup>。另一方面,两条通路也共用一些信号分子: TNF受体可同时作为凋亡和程序性坏死的信号分子;通过其他信号蛋白介导的翻译后修饰, RIPK1也可以同时作

为凋亡和程序性坏死的信号分子<sup>[41]</sup>。若通过基因编辑技术敲除细胞各条通路的促凋亡基因,细胞是否会通过程序性坏死途径死亡还值得研究人员进一步研究。

## 3 基因编辑技术在新型重组蛋白工程细胞构建中的应用

### 3.1 通过敲除促程序性死亡基因来构建抗凋亡细胞系

早在ZFNs技术盛行的时代,就已有科学家发现该技术能够用于改造重组蛋白工程细胞,他们对凋亡通路进行了深入调查,决定对细胞凋亡中的内源性凋亡途径上游蛋白Bax、Bak对应的基因下手,以阻止它们渗透线粒体外膜,从而抑制Caspase蛋白的激活,试图达到抗凋亡的目的。实验结果显示,所构建抗凋亡细胞生产蛋白能力、细胞活力、活细胞数量均高于对照组,细胞中Caspase-3表达量远低于对照组<sup>[42]</sup>。这一方法针对的是CHO细胞,且阻断了凋亡的上游信号,结果较为理想,但由于ZFNs技术的局限性,其构造过程复杂,因而需消耗较多人力、物力、财力。为降低构造成本、改进基因敲除效率, Grav等<sup>[43]</sup>利用CRISPR/Csa9技术再次敲除了Bax、Bak基因,所得细胞系在凋亡诱导剂放线霉素D的作用下,凋亡率与对照组有明显差异,实验效果整体优于利用ZFNs技术构造的细胞系。后来,我国科学家

表1 利用CRISPR系统对哺乳动物工程细胞的改造效果

Table 1 The results of improved mammal engineering cells using CRISPR system

目的基因 Gene	实验细胞系 Cell line	实验结果 Result	参考文献 References
<i>Bax, Bak</i> (knockout)	CHO	Protein expression level increases 3-4 times	[43]
<i>TSC2</i> (knockout)	CHO	Protein expression level increases 2 times	[47]
<i>Caspase-3, Caspase-6, Caspase-7, AIF1</i> (knockout)	HEK293	Virus production and protein expression level increase 3-4 times	[44]
<i>Survivin</i> (knockin)	CHO	Anti-apoptosis ability increases 6.4 times and protein expression level increases 5.50times	[45]
<i>OAZ1</i> (knockout)	HEK293	Protein expression level increases 1.5-3.5 times	[49]

采用类似的思路构造了抗凋亡HEK293细胞系,不同的是,我国科学家对凋亡通路的阻断更加全面,在内源性凋亡途径的下游通路中, *Caspase-3*、*Caspase-6*、*Caspase-7*、*AIF1*均被称为凋亡的执行人,他们将这四个蛋白对应基因全部敲除,以达到全面阻碍凋亡的执行<sup>[44]</sup>。采用抗凋亡细胞和野生型HEK293细胞转染*Bax*表达载体和阿霉素处理两种方法试图诱导细胞凋亡,结果显示,抗凋亡细胞存活率和生长状态明显优于野生型细胞;所构建抗凋亡细胞几乎无*Caspase-3*、*Caspase-6*、*Caspase-7*、*AIF1*蛋白的表达;抗凋亡细胞在蛋白表达、腺病毒包装、腺相关病毒、慢病毒包装均优于野生型细胞<sup>[44]</sup>。上述两种设计方案均未考虑到细胞程序性坏死这一“替补”死亡通路,在未来的抗凋亡细胞设计中,该通路亦应该被考虑。例如:在上述促凋亡基因敲除的前提下,可以进一步敲除*Caspase-8*、*RIPK3*来阻拦细胞采用程序性坏死来“自杀”。

### 3.2 通过改造其他基因来构建抗凋亡工程细胞

为了让工程细胞能够更好地为人类服务,人们还想到了另一种改造思路。通过敲除促凋亡基因来增强细胞抗凋亡能力的方法已奏效,那敲入抗凋亡基因是否可以达到同样的目的,答案是肯定的。就在今年,我国科学家成功将*survivin*基因通过CRISPR/Cas9技术定点敲入到CHO细胞中<sup>[45]</sup>。实验数据表明,相比野生型细胞,其构建细胞系抗凋亡能力增强了6.4倍,蛋白表达能力也增强了5.5倍<sup>[45]</sup>。以往,研究人员常常直接通过慢病毒转染引入外源基因,结果是基因插入位点不明、无法推断插入后是否会对细胞的功能造成不良影响、外源基因表达量

通常十分低下。相反,本实验采用基因编辑技术,利用同源末端连接方式插入目的基因,结果更加可靠,细胞生产的蛋白用于临床治疗的安全性更高。除此之外,有科学家希望直接通过影响细胞调控蛋白表达的基因来提高重组蛋白生产量, *mTOR*即是其中之一,但它受上游基因*TSC1*、*TSC2*调控。有研究已明确,二者任一表达量的下降都会大幅提高*mTOR*的活性<sup>[46]</sup>,于是该位科学家直接通过CRISPR/Cas9技术敲除*TSC2*,实验结果显示, *TSC2*基因敲除后细胞体积更大,重组蛋白表达量高于野生型细胞,且在第八天高于野生型细胞近一倍。有趣的是,该组人员还试图敲除了抑制*AKT*表达的*PTEN*,试图增强细胞的增殖能力,但结果却并非理想<sup>[47]</sup>。这说明,在工程细胞生产重组蛋白的过程中, *PTEN*可能本身就未抑制*AKT*通路,由于该通路十分复杂,亦可能是其他原因导致*PTEN*缺失细胞系未能达到改造目的。最近,有文献给出了在CHO细胞中同时过表达多基因的方法,可用于靶向细胞增殖相关基因,例如针对*AKT*、*PI3K*的激活<sup>[48]</sup>。除此之外,仍可通过转染方式转入细胞生长因子相关基因,以增强细胞增殖能力。我们将前人对重组蛋白工程细胞的改造效果进行了对比,结果如表1所示。

## 4 总结与展望

截止目前,人们对哺乳动物工程细胞已经进行了诸多的基因改造,取得了巨大进展,但是利用这类表达系统表达重组蛋白尚不能满足数量和质量上的需求,所构建的全新细胞系优势仍然不明显,仅有少数可用于工业生产和实验室研究,还存在改进空

间。我们将从以下六个方面进行总结。第一, 应该将细胞程序性坏死途径纳入考虑范围。虽然已有多位学者构造抗凋亡工程细胞, 但在构造的过程中, 均未考虑细胞程序性坏死途径, 由于凋亡与该途径联系较为紧密, 细胞很有可能在外界条件恶劣且无法凋亡的情况下, 选择程序性坏死途径死亡, 若后来的研究人员考虑同时抑制这两条死亡途径, 结果可能会更加理想。第二, 利用CRISPR技术进行多基因编辑。随着CRISPR/CAS技术的高速发展, 新的基因编辑技术已经能让多基因编辑更加方便, 我们可以从多角度增强工程细胞表达量。例如, 我们可以在敲除凋亡和程序性坏死关键基因的前提下, 敲除*TSC2/TSC1*, 以提高*mTOR*活性, 从而提高蛋白表达效率。另外, 突变的CAS9蛋白已经能够允许我们精确激活一些目的基因, 研究人员可尝试针对一些促增殖基因进行激活, 例如上文提到的IAP家族基因或一些生长信号对应基因。除此之外, 若在基因被CAS蛋白剪切的同时, 引入外源模板, 我们可以定点添加诸如*survivin*基因。第三, 重视细胞种间差异。由于每种工程细胞对自身生长的调控机制并非完全相同, 因此并非每一次改造尝试都能奏效, 这需要研究者们更全面的理论分析和更多的实验尝试。第四, 降低工程细胞培养成本。目前, 工程细胞培养仍然需要较高的培养成本, 除了细胞凋亡率高之外, 无血清表达培养基的价格本身也十分昂贵。在未来, 新型细胞系的构建也应当考虑到如何解决此类问题。第五, HEK293细胞系值得作为下一个改造的细胞系。目前, 针对哺乳动物细胞的改造多涉及CHO细胞系, 而对人源细胞系HEK293的研究报道较少。这里必须指出的是, HEK293细胞可以实现更复杂的翻译后修饰和糖基化, 人源程度也更高, 在临床试验方面具有显著优势, 在今后的研究中, HEK293应当被给予更多的关注。第六, 为提高细胞蛋白生产量, 还可将转录、翻译等过程的调控基因作为靶点, 对其敲除或激活。目前, 针对该方面的研究较少, 但在最近, 有文献报道通过CRISPR技术构建了*OAZ1*基因敲除的HEK293细胞系, *OAZ1*可抑制鸟氨酸脱羧酶的活性, 从而抑制多胺的生物合成, 影响细胞的转录与翻译过程。在相同实验条件下, 该细胞系的存活率与野生型细胞相当且蛋白表达量高出了野生型细胞三倍<sup>[49]</sup>。该报道也间接说明了调控细胞的转录与翻译过程可以达到提高蛋白表达量的目的。

随着人们对细胞生命活动探索的深入和基因编辑技术的发展, 人们将不断地完善重组蛋白表达工程细胞手段, 相信在未来, 定会有高质、高量、低成本的表达系统出现, 也将有更优质、更廉价的重组蛋白药物造福广大患者。

### 参考文献 (References)

- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 2013; 339(6121): 819-23.
- Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 2014; 157(6): 1262-78.
- Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 2014; 346(6213): 12580961-9.
- Cho MS, Yee H, Brown C, Mei B, Mirenda C, Chan S. Versatile expression system for rapid and stable production of recombinant proteins. *Biotechnol Prog* 2003; 19(1): 229-32.
- Zhu J. Mammalian cell protein expression for biopharma-ceutical production. *Biotechnol Adv* 2012; 30(5): 1158-70.
- Jayapal KP, Wlaschin KF, Hu WS, Yap MG. Recombinant protein therapeutics from CHO cells 20 years and counting. *Chem Eng Prog* 2007; 103(10): 40-7.
- Noh SM, Sathyamurthy M, Lee GM. Development of recombinant Chinese hamster ovary cell lines for therapeutic protein production. *Curr Opin Chem Eng* 2013; 2(4): 391-7.
- Vink T, Oudshoorn DM, Roza M, Reitsma JJ, de Jong RN. A simple, robust and highly efficient transient expression system for producing antibodies. *Methods* 2014; 65(1): 5-10.
- Lucas D, Frenette PS. Stem cells: Reprogramming finds its niche. *Nature* 2014; 511(7509): 301-2.
- Chisti Y. Animal-cell damage in sparged bioreactors. *Trends Biotechnol* 2000; 18(10): 420-32.
- Mercille S, Massie B. Induction of apoptosis in nutrient-deprived cultures of hybridoma and myeloma cells. *Biotechnol Bioeng* 1994; 44(9): 1140-54.
- Ryu JS, Lee GM. Application of hypoosmolar medium to fed-batch culture of hybridoma cells for improvement of culture longevity. *Biotechnol Bioeng* 1999; 62(1): 120-3.
- Goswami J, Sinskey AJ, Steller H, Stephanopoulos GN, Wang DI. Apoptosis in batch cultures of Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng* 1999; 62(6): 632-40.
- 李国坤, 高向东, 徐晨. 哺乳动物细胞表达系统研究进展. *中国生物工程杂志*(Li Guokun, Gao Xiangdong, Xu Chen. *Advances on mammalian cell expression system. China biotechnology*) 2014; 34(1): 95-100.
- 栗晓飞, 曹英秀, 宋浩. CRISPR/Cas9系统研究进展. *中国生物工程杂志*(Li Xiaofei, Cao Yingxiu, Song Hao. *CRISPR/CAS9 system: A recent progress. China Biotechnology*) 2017; 37(10): 86-92.
- Bao D, Ma Y, Zhang X, Guan F, Chen W, Gao K, *et al.* Preliminary characterization of a leptin receptor knockout rat created by CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep* 2015; 5: 1-10.
- Ran FA, Cong L, Yan WX, Scott DA, Gootenberg JS, Kriz AJ,



- et al.* *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature* 2015; 520(7546): 186-91.
- 18 Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, *et al.* Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class2 CRISPR-Cas system. *Cell* 2015; 163(3): 759-71.
- 19 Makarova KS, Zhang F, Koonin EV. SnapShot: Class 2 CRISPR-Cas systems. *Cell* 2017; 168(1/2): 328.
- 20 Kleinstiver BP, Prew MS, Tsai SQ, Nguyen NT, Topkar VV, Zheng Z, *et al.* Broadening the targeting range of *Staphylococcus aureus* CRISPR-Cas9 by modifying PAM recognition. *Nat Biotechnol* 2015; 33(12): 1293-8.
- 21 Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* 2013; 8(11): 2281-308.
- 22 Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino E, *et al.* Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* 2013; 154(6): 1380-9.
- 23 Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Oudna JA, Weissman JS, Arkin AP, *et al.* Repurposing CRISPR as an RNA guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell* 2013; 152(5): 1173-83.
- 24 Choudhary E, Thakur P, Pareek M, Agarwal N. Gene silencing by CRISPR interference in mycobacteria. *Nat Commun* 2015; 6(2): 6267.
- 25 Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, Joung J, Abudayyeh OO, Barcena C, *et al.* Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature* 2015; 517(7536): 583-8.
- 26 Casini A, Olivieri M, Petris G, Montagna C, Reginato G, Maule G, *et al.* A highly specific SpCas9 variant is identified by *in vivo* screening in yeast. *Nat Biotechnol* 2018; 36(3): 265-71.
- 27 Johnny HH, Shannon MM, Maarten H, Tang WX, Chen LW, Sun N, *et al.* Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature* 2018; 556(7699): 57-63.
- 28 Komor AC, Badran AH, Liu DR. CRISPR-based technologies for the manipulation of eukaryotic genomes. *Cell* 2017; 168(1/2): 20-36.
- 29 Green DR. Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell* 1998; 94(6): 695-8.
- 30 Mattson MP, Chan SL. Calcium orchestrates apoptosis. *Nat Cell Biol* 2003; 5(12): 1041-3.
- 31 Uguz AC, Naziroglu M, Espino J, Bejarano I, González D, Rodríguez AB, *et al.* Selenium modulates oxidative stress-induced cell apoptosis in human myeloid HL-60 cells through regulation of calcium release and Caspase-3 and -9 activities. *J Membrane Biol* 2009; 232(1): 15-23.
- 32 Pariente JA. Oxidative stress-induced Caspases are regulated in human myeloid HL-60 cells by calcium signal. *Curr Signal Transd T* 2010; 5(2): 181-6.
- 33 Fesik SW, Shi Y. Controlling the Caspases. *Science* 2001; 294(5546): 1477-8.
- 34 Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; 397(6718): 441-6.
- 35 Joza N, Pospisilik JA, Hangen E, Hanada T, Modjtahedi N, Penninger JM, *et al.* AIF: not just an apoptosis-inducing factor. *Ann Ny Acad Sci* 2009; 11711(1): 2-11.
- 36 King D, Yeomanson D, Bryant HE. PI3King the lock: Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway as a novel therapeutic strategy in neuroblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol* 2015; 37(4): 245-51.
- 37 Sah NK, Khan Z, Khan GJ, Bisen PS. Structural, functional and therapeutic biology of survivin. *Cancer Lett* 2006; 244(2): 164-71.
- 38 Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltsersdorf T, *et al.* IAP-family protein survivin inhibits Caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, Caspases and anticancer drugs. *Cancer Res* 1998; 58(23): 5315-20.
- 39 Wei W, Peng L, Jianyong L. Necroptosis: An emerging form of programmed cell death. *Crit Rev Oncol Hemat* 2012; 82: 249-58.
- 40 Linkermann A, Green DR. Necroptosis. *N Engl J Med* 2014; 370(5): 455-65.
- 41 Vanden BT, Linkermann A, Jouan LS, Walczak H, Vandenabeele P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15(2): 135-47.
- 42 Macaraeg NF, Reilly DE, Wong AW. Use of an antiapoptotic CHO cell line for transient gene expression. *Biotechnol Prog* 2013; 29(4): 1050-8.
- 43 Grav LM, Lee JS, Gerling S, Kallehauge TB, Hansen AH, Kol S, *et al.* One-step generation of triple knockout CHO cell lines using CRISPR/Cas9 and fluorescent enrichment. *Biotechnol J* 2015; 10: 1446-56.
- 44 Zhang WF, Xiao D, Shan LL, Zhao J, Mao Q, Xia H. Generation of apoptosis-resistant HEK293 cells with CRISPR/Cas mediated quadruple gene knockout for improved protein and virus production. *Biotechnol Bioeng* 2017; 114(11): 2539-49.
- 45 Wang WP, Zheng WY, Hu FZ, He X, Wu D, Zhang W, *et al.* Enhanced biosynthesis performance of heterologous proteins in CHO-K1 cells using CRISPR-Cas9. *ACS Synth Biol* 2018; 7(5): 1259-68.
- 46 Tee AR, Fingar DC, Manning BD, Kwiatkowski DJ, Cantley LC, Blenis J. Tuberous sclerosis complex-1 and -2 gene products function together to inhibit mammalian target of rapamycin(mTOR)-mediated downstream signaling. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99(21): 13571-6.
- 47 Duncan M, Michael A, Giovanni R, Cowan A, Scott C, Megill J. CHO cells knocked out for TSC2 display an improved productivity of antibodies under fed batch conditions. *Biotechnol Bioeng* 2016; 13(9): 1942-52.
- 48 Peter E, Gerald K, Marcus W, Laurenz B, Vaibhav J, Daniel I, *et al.* A CRISPR/Cas9 based engineering strategy for overexpression of multiple genes in Chinese hamster ovary cells. *Metab Eng* 2018; 48: 72-81.
- 49 Laura A, Joseph S. Knocking out Ornithine Decarboxylase antizyme 1 (OAZ1) improves recombinant protein expression in the HEK293 cell line. *Med Sci* 2018; 6(48): 1-12.