

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.05.013

· 综述 ·

CRISPR/Cas9 基因编辑技术在精准肿瘤学研究中的应用

Application of CRISPR/Cas9 gene editing technology in the research of precision oncology

王琳琳 综述; 李红玲 审阅(甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730000)

[摘要] CRISPR/Cas9 基因编辑技术通过精准定位和修改基因序列, 可以识别与细胞增殖、迁移、侵袭和化疗耐药性相关的基因, 不仅为理解肿瘤发生发展的分子机制奠定了基础, 还为实现肿瘤的精准治疗提供了一种方便、高效的方法。由于其具有低成本、高效率的优点, 被广泛地应用于精准肿瘤学的基础和临床研究当中, 包括用于探寻抗肿瘤药物耐药靶点、筛查驱动基因、优化 CAR-T 和 TCR-T 细胞, 以及筛选肿瘤靶向基因等。目前, 已开展了十余项使用 CRISPR/Cas9 技术治疗肿瘤的临床试验, 策略多为利用 CRISPR/Cas9 技术敲除 T 细胞中的免疫检查点基因后回输患者, 以达到免疫激活的效果, 大多数研究仍处于 I 期和 II 期阶段。管 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在肿瘤研究与治疗领域展现出了巨大潜力, 但仍需面对脱靶效应, 以及永久编辑可能带来的弊端等瓶颈, 其实际临床效用仍有待更多的深入研究和大规模临床试验的严格验证。

[关键词] CRISPR/Cas9; 基因编辑技术; 精准肿瘤学; 抗肿瘤药物; 药物敏感性

[中图分类号] R730.54; Q78 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024)05-0519-09

现今针对肿瘤的常规疗法包括手术切除、化疗、放疗以及靶向治疗和免疫疗法等多种手段, 但普遍伴随不同程度的不良反应, 这在一定程度上阻碍了患者生存期的延长和生活质量的实质性改善^[1-3]。癌症的特征主要包括 DNA 和 RNA 改变^[4]。CRISPR/Cas9 筛选技术能够对生物基因组进行全面探查, 尽可能完整地展示生物体的基因组信息。这种筛选技术是基于 CRISPR/Cas9 对于基因的敲除功能, 并通过小向导 RNA (small guide RNA, sgRNA) 和 Cas9 靶向生物体中成千上万个不同的基因, 在某种条件的压力筛选下, 对存活的细胞或者死亡的细胞进行 sgRNA 测序, 将基因组信息转化为可视化筛选的大数据形式, 从而革命性地改变了肿瘤治疗的方式。并且, CRISPR 基因编辑技术不仅有基因敲除功能, 还衍生出碱基敲入、替换、基因干扰等功能。

1 CRISPR/Cas9 基因编辑技术概述

当下, 基因编辑技术正以前所未有的广度渗透进生物医学研究的核心地带, 借助此类先进技术, 研究者得以在体内及体外环境中实施精细的遗传调节操控, 如基因敲除等实验设计^[5-6]。CRISPR/Cas9 系统因其基因编辑方面展现出巨大的潜力, 引发了全球科研界的深度探索。

1.1 CRISPR/Cas9 基因编辑的原理及优势

CRISPR/Cas9 基因编辑, 最初在 1987 年由科学家们在细菌与古菌中发现^[7-8]。这一自然现象被巧妙地转化为基因编辑的强大工具, 并逐步演变为现代

生物技术^[9-10]。该工具可以识别与细胞增殖、迁移、侵袭和化疗耐药性相关的基因^[11-13]。追溯至 2012 年的开创性研究, 学者们首度证实了 CRISPR/Cas9 系统内含的成熟 CRISPR RNA (crRNA) 与互补的反式激活 crRNA (tracrRNA) 能够协同构建一个稳定的双 RNA 复合体架构, 并可以指导 CRISPR 相关蛋白 Cas9 精确锚定并切割靶向 DNA 序列^[10]。当 sgRNA 与目标 DNA 互补结合且具备适当的前间隔相邻基序 (protospacer adjacent motif, PAM) 时, Cas9 蛋白将在该位置切断基因组的双链^[14]。接下来, 细胞会利用两种不同的机制来修复断裂, 即非同源末端连接和同源重组。通过诱导这两种机制, CRISPR/Cas9 技术可以用来删除、替换或插入特定的基因序列^[15]。

相比于其他基因编辑技术, 例如巨核酸酶 (meganuclease, MN)、锌指核酸酶 (zinc-finger nuclease, ZFN) 和转录激活样效应因子核酸酶 (transcription activator-like effector nuclease, TALEN) 技术, CRISPR/Cas9 技术在成本效益和高效率方面更具优势。CRISPR/Cas9 技术不仅可以编辑单个基因组位点, 还可以利用多个 sgRNA 来同时编辑多个基因组位点, 这也被称为多重编辑^[12-14, 16]。此外, 与需要

[基金项目] 甘肃省科技厅国际合作项目 (No.20YF8WA096); 甘肃省科学技术厅联合科研基金项目 (No.23JRRA1545); 国家卫健委重点实验室硕博基金项目 (No.NHCDP2022005), 甘肃省人民医院重点项目 (No.19SYPYA-3)

[作者简介] 王琳琳 (1997—), 女, 硕士生, 主要从事肿瘤生物治疗相关研究。E-mail: wanglinlin19970213@163.com

[通信作者] 李红玲, E-mail: lihongling1969@126.com

持续输送的小干扰RNA相比,仅仅瞬时输送Cas9和sgRNA就足以永久改变目标基因^[17]。因此,CRISPR/Cas9系统已经成为首选的基因组编辑方法^[18]。

1.3 编辑技术的新拓展

CRISPR/Cas9技术的起始阶段主要依赖Cas9核酸酶与sgRNA的独特搭配,实现对特定基因的精准剔除。而在2013年,研究人员成功开发出了失去核酸酶活性的Cas9突变体dCas9,该突变体具有内切酶活性^[19]。接下来,将dCas9蛋白与能够激活或抑制基因转录的转录调控因子结合,从而开发出了CRISPR激活(CRISPRa)^[20-21]和干扰(CRISPRi)^[22]工具。CRISPRa是一种有效的内源性基因选择性上调工具,优于传统的过表达技术^[23]而CRISPRi则是通过瞄准细胞内特定转录区域,当Cas9-sgRNA复合物与sgRNA互补的目标DNA序列精确结合时,能够有效阻碍RNA聚合酶沿DNA模板的转录过程,在1~2周内可以快速抑制基因^[24]。

当前进行基因校正的第一步是利用基因组编辑技术在目标点引入双链(ds)DNA断裂^[25]。但是现有的点突变校正方法效率低下,且通常会在目标点引起大量随机插入和缺失。为了解决这一问题,KOMOR等^[26]将APOBEC(胞嘧啶脱氨酶)与CRISPR/Cas9技术相结合,在保留sgRNA编辑功能的同时避免引发dsDNA断裂,诱导胞昔直接转化为尿昔,进而实现C→T(或G→A)突变(图1)。除此之外,还开发了腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editor, ABE),可以将A-T碱基对转换为G-C碱基对^[27]。与基于Cas9核酸酶的方法相比,ABE能够更高效、更精准地实现点突变,且更少出现脱靶现象。因此,在遗传疾病的研究中,ABE的使用受到了广泛的推广^[27](图1)。实际上,遗传疾病和肿瘤的共同之处在于它们都可能涉及基因突变。因此,虽然目前该技术还未得到肿瘤研究领域的应用,但可以将这一技术与肿瘤治疗联系起来,以期在肿瘤领域获得突破性进展。

除了在单个基因的处理中使用,CRISPR/cas9技术还可以用于全基因组文库筛选。这种筛选方法可以高通量地进行基因敲除或调控,以研究特定生物学过程或鉴定与疾病相关的关键基因^[28-32]。筛选的一般步骤:(1)构建包含全基因组的CRISPR/Cas9文库,首先需要设计和合成大量的sgRNA,每个sgRNA对应一个基因,并确保其具有特异性,每个基因对应2~4个sgRNA以确保足够的覆盖率^[33]。(2)选择适当的细胞株。(3)递送CRISPR/Cas9文库,可以使用物理递送、病毒载体和非病毒载体^[34]。物理递送方法包括显微注射、电穿孔、流体动力学尾静脉注射、超声微

气泡和激光^[34],但物理方法并不适用于体内。病毒递送的选项包括慢病毒、腺病毒和腺相关病毒^[35],其中后者具有低致病性、高安全性和低遗传毒性的特点^[36]。非病毒递送的方法包括无机纳米颗粒^[37]、脂质纳米颗粒^[38]、外泌体和新开发的病毒样颗粒^[39]。(4)设定筛选标准,设定适当的筛选标准来评估基因编辑对细胞或生物体的影响。(5)筛选过程,将基因特异性敲除细胞暴露于选择性干扰条件,然后提取其基因组DNA。通过扩增和测序整合的sgRNA盒,确定敲除特定基因的细胞数量^[40],评估其表型变化。(6)基因识别,通过对细胞/生物体sgRNA进行高通量测序分析,可以确定与所关注的生物学过程或疾病相关的关键基因^[41]。(7)确认和验证,通过进一步的实验验证来确定观察到的效应是否与特定基因的敲除或调控相关。(8)功能研究,对确认的基因进行功能研究,以更深入地了解其在生物学过程或疾病中的作用(图2)。

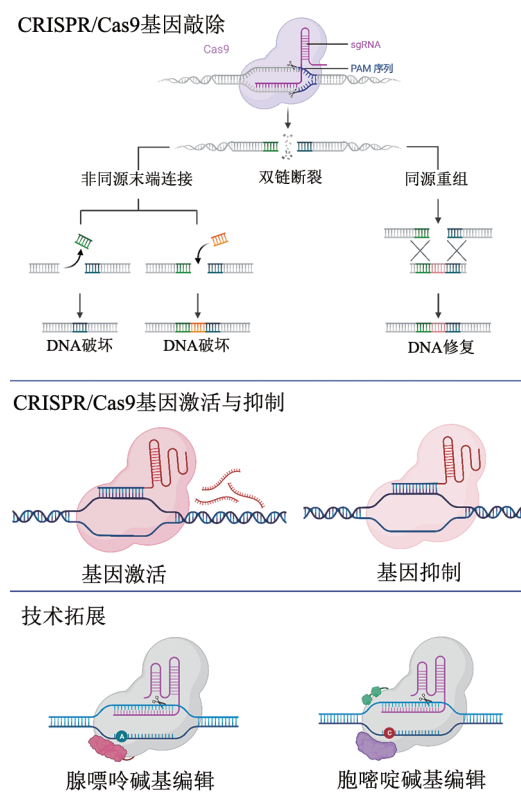


图1 基因编辑及其技术拓展

当前,多种CRISPR/Cas9筛选文库诸如GeCKOv1、GeCKOv2及Brunello等已在科研领域投入使用,它们作为强有力的工具丰富了基因编辑的可能性^[41]。大部分基于CRISPR/Cas9的筛选实验通常在体外实验中开展,这种方式有助于识别潜在的药物靶标并对细胞信号通路进行解析^[42]。不过,体外筛选虽具有一定的实用性,但在反映原发性肿瘤细

细胞的真实行为以及模拟复杂的体内肿瘤微环境等方面仍存在局限性^[42]。相比之下,体内筛选可以直接编辑活体生物的基因,在疾病模型中观察其对整体生物学过程的影响。为了更接近临床情况, GHALANDARY 等^[42]将急性髓系白血病患者

的原发性肿瘤细胞移植到免疫功能低下的 NSG 小鼠中,并成功建立了可连续移植的 PDX 模型,随后应用 CRISPR/Cas9 技术对此类模型进行基因编辑实验,力求揭示更为贴近人体实际状况的基因功能及其在疾病发生发展中的作用。

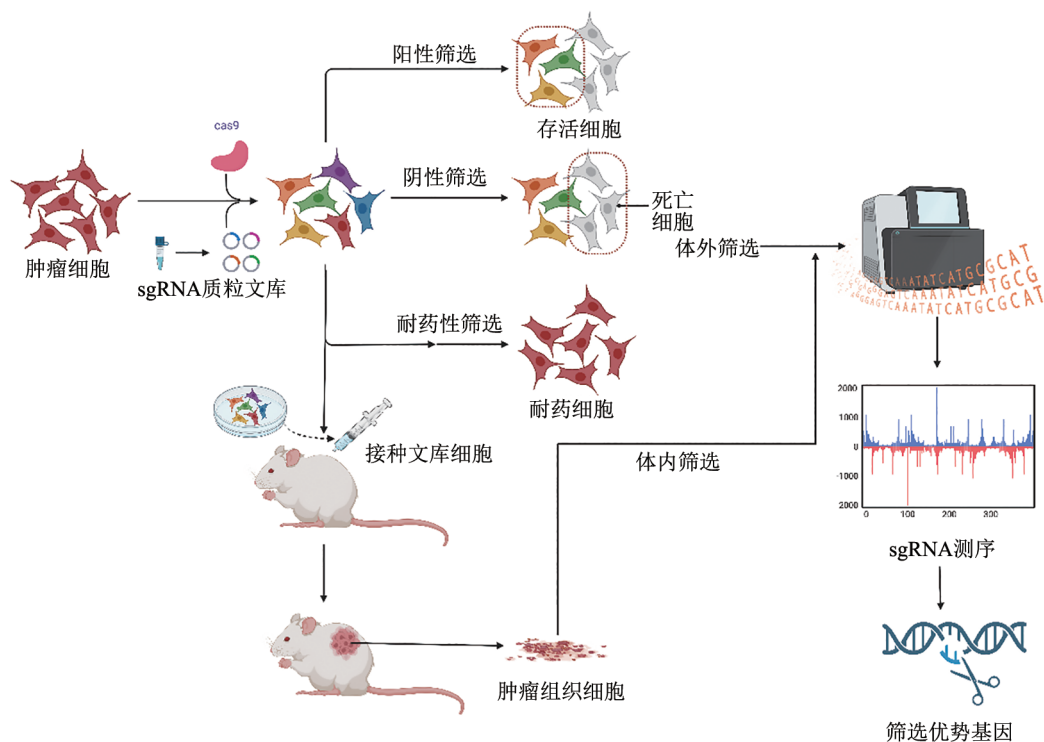


图2 CRISPR/Cas9文库筛选流程

2 在精准肿瘤学基础研究中的应用

CRISPR/Cas9 技术在肿瘤研究和治疗领域中受到广泛关注,在肿瘤研究和应用中可以细分为四类:(1)探寻抗肿瘤药物耐药靶点;(2)筛查驱动基因抗癌;(3)增强免疫功能抗肿瘤;(4)筛选肿瘤靶向基因。

2.1 探寻抗肿瘤药物耐药靶点

肿瘤细胞产生耐药性是导致抗肿瘤药物治疗失败的主要原因之一,深入挖掘并充分利用肿瘤组织与正常组织之间的特异性差异,筛选耐药相关基因,成了迈向更高精度、更具靶向性的治疗方案的关键所在^[43-45]。

利用全基因组 CRISPR/Cas9 技术可以筛选出与抗肿瘤药物耐药相关的候选基因。筛选方法包括阴性筛选和阳性筛选,前者在活细胞中进行,后者在死细胞中进行。IPSEN 等^[46]发现,前列腺癌中缺失的基因与奥拉帕尼耐药相关,为了验证这些候选基因,研究人员构建了基因敲除的稳转细胞系,并证实了 PARP1、ARH3、YWHAE 等基因

的缺失导致奥拉帕尼耐药性。相反地,李春燕^[47]利用 CRISPR/Cas9 激酶文库筛选,在舌鳞状细胞癌细胞中发现了丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 19 (STK19),该基因的敲除增加了细胞对顺铂的敏感性,为顺铂耐药或不敏感患者提供了新的治疗方案。在肺癌细胞异种移植小鼠模型中,通过 CRISPR/Cas9 介导的 NRF2 敲低,增强了肿瘤对顺铂和卡铂的敏感性^[20,48]。

2.2 筛查驱动基因

肿瘤的大部分特征与基因改变有关,包括激活癌基因、失活抑癌基因及其他表观遗传学改变。这些改变可以增加肿瘤细胞的增殖和侵袭能力,但同时也可以作为靶点来特异性地杀死肿瘤细胞^[49]。KIM 等^[17]利用 CRISPR/Cas9 破坏了突变的 KRAS 基因,结果导致肿瘤细胞在体内外的生长被抑制。然而在表达野生型 KRAS 的细胞中,Cas9 和 sgRNA 的表达在体内外均未改变细胞的存活或增殖。这项研究证明了 CRISPR/Cas9 可以用于治疗与驱动基因突变相关的肿瘤。

慢性髓系白血病(chronic myelogenous leukemia,

CML)的驱动因子是BCR/ABL融合致癌基因^[50]。在CML中,BCR/ABL具有多种功能,包括促进肿瘤细胞的存活^[50-52]和抑制细胞的凋亡^[53-54]等。2022年,VUELTA等^[50]通过CRISPR-Trap系统破坏了BCR/ABL序列,其表达水平降低了80%以上,然后将其注射到免疫缺陷小鼠中,可以强烈抑制肿瘤生长。在注射23 d后,与对照组相比,肿瘤体积减少了90%。此外,CRISPR/Cas9技术已经展现出在肿瘤治疗中修复失活的肿瘤抑制基因的潜力。通过将CRISPR/dCas9与反式激活剂VP64-p65-Rta结合使用,成功提高了黑色素瘤和TNBC细胞中PTEN基因的表达水平,抑制肿瘤的发展^[20,55]。

2.3 增强T细胞的抗肿瘤免疫功能

肿瘤免疫疗法可分为特异性免疫疗法和非特异性免疫疗法两种^[56](图3)。在特异性免疫治疗肿瘤中,T细胞起着关键作用。过继细胞疗法(adoptive cell therapy, ACT)是一种免疫治疗方法,可以利用并改造T细胞来对抗肿瘤细胞。目前,科学家正在研究两种主要的ACT方法:CAR-T细胞疗法和TCR-T细胞疗法。在ACT中,自体或同种异体免疫细胞从体内分离并激活^[57],随后对T细胞进行改造,包括表达TCR或CAR^[40,58]。改造后的T细胞在体外进行扩增,最后回输患者体内。然而,实施ACT时存在许多困难,如很难从晚期癌症患者和婴幼儿中分离出足够的可用T细胞。虽然CAR-T细胞可以MHC非依赖的方式识别抗原^[59],但TCR-T细胞必须通过MHC依赖的方式识别抗原。因此,一种解决临床难题的方法是从健康供体中分离和纯化原代T细胞,使用CRISPR/Cas9系统敲除人类白细胞抗原基因并设计TCR,以产生“通用”同种异体TCR-T细胞来攻击肿瘤细胞^[40],这可能会扩大ACT的临床应用。此外,CRISPR/Cas9基因编辑还能制造具有更好抗肿瘤效果的CAR-T细胞^[60]。一项meta分析发现,在急性白血病、胶质瘤、黑色素瘤和其他肿瘤动物模型中,使用CRISPR/Cas9技术优化的CAR-T细胞治疗可以缩小肿瘤体积并提高动物存活率,同时没有观察到不良反应^[60]。

由于肿瘤微环境的免疫抑制作用,如何使CAR-T细胞和TCR-T细胞保持活跃的肿瘤杀伤能力仍然面临挑战^[59]。因此,在免疫治疗中利用非特异性免疫疗法,如可通过诱导细胞因子(IFN- γ 、IL-2等)分泌^[56,61]和阻断免疫检查点来消除免疫抑制,增强T细胞的杀伤能力。研究人员从肿瘤患者身上分离和纯化原代T细胞,利用CRISPR/Cas9敲除T细胞中的免疫检查点基因,如PD-1^[62]和CTLA-4^[63],通过CD28/B7信号传导激活T细胞功

能。除了常见的免疫检查点,一些研究者还借助CRISPR/Cas9技术敲除二酰基甘油激酶(diacylglycerol kinase, DGK)来增加CD3信号传导,从而增强T细胞功能。敲除CAR-T细胞的DGK基因可增加其对可溶性免疫抑制因子如TGF- β 和前列腺素E2的抗性,即使在肿瘤持续存在的条件下仍能保持杀伤效应^[64]。此外,一些研究者将CD8⁺T细胞从人类或转基因小鼠中分离出来,然后在体外感染sgRNA文库。通过与肿瘤细胞共培养或将修饰过的CD8⁺T细胞注射到荷瘤小鼠,从而筛选出增强或抑制CD8⁺T功能的sgRNA^[10,65]。

2.4 筛选肿瘤靶向基因

精准医学的快速发展推动了肿瘤治疗的进步。找到适当的靶向治疗方案,可以提高晚期或转移性癌症患者的生存率^[66]。肿瘤转移是导致恶性肿瘤发展和死亡的重要原因之一^[67-68]。恶性肿瘤的治疗中,寻找抑制肿瘤转移的关键靶点是一种有效的手段。ZHANG等^[69]在SKOV3细胞系中利用全基因组CRISPR/Cas9敲除筛选,发现蛋白-L-异天冬氨酸(D-天冬氨酸)O-甲基转移酶(PCMT1)的高表达可增强肿瘤细胞的迁移、黏附和球状体的形成,并且在晚期转移性肿瘤中呈现高水平,同时也导致腹水形成和远处转移的增加。结直肠癌(colorectal cancer, CRC)的进展是由结直肠癌干细胞(colorectal cancer stem cell, CR-CSC)驱动的,而IL-30在CR-CSC活力和肿瘤进展中扮演着关键角色^[70]。D'ANTONIO等^[70]通过CRISPR/Cas9技术敲除IL-30基因并将其植入到NSG小鼠中,结果显示失活IL-30可以抑制CR-CSC的致瘤性和转移能力。

3 在精准肿瘤学临床研究中的应用

在一项CRISPR/Cas9编辑PD-1基因的T细胞在晚期非小细胞肺癌患者中进行的人体I期临床试验(NCT02793856)中,科研团队将携带Cas9和sgRNA编码信息的质粒导入患者的T细胞内,旨在实现PD-1基因的精准敲除,其中8例患者的病情呈现了明显的稳定态势^[71]。此外,相似的CRISPR/Cas9编辑T细胞疗法也在其他类型的恶性肿瘤患者群体中进行了尝试,包括多发性骨髓瘤、滑膜肉瘤以及黏液样脂肪肉瘤患者^[72],这些临床实践预示着基因编辑技术在多种实体瘤治疗领域中广阔的应用前景。

人乳头状瘤病毒(human papilloma virus, HPV)是导致宫颈上皮内癌变和宫颈癌的主要原因。在HPV驱动的致癌过程中,E6和E7基因扮演着重要角色,因此它们成为治疗干预的理想靶点。2017年,中

山大学开展了应用 TALEN 和 CRISPR/Cas9 技术治疗 HPV 相关宫颈上皮内癌变的安全性和有效性研究^[73], 结果表明, 使用 TALEN 和 CRISPR/Cas9 作为基因组

编辑工具可以破坏 HPV16 和 HPV18 E6/E7 DNA, 显著降低 E6/E7 的表达, 诱导细胞凋亡并抑制细胞增殖。

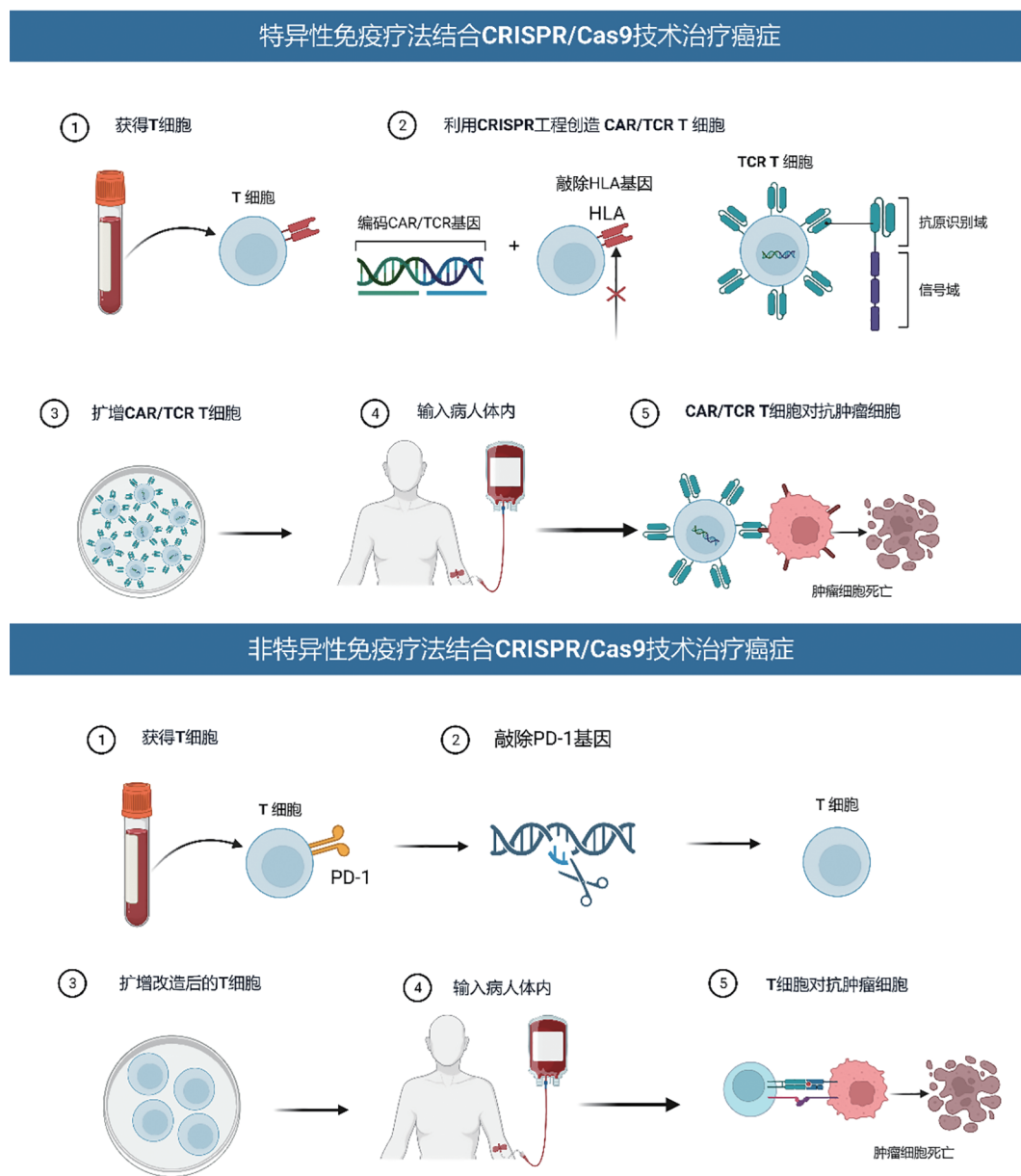


图3 特异性免疫治疗结合 CRISPR/Cas9 技术治疗癌症和非特异性免疫治疗结合 CRISPR/Cas9 技术治疗癌症的技术路线

根据 ClinicalTrials.gov (<https://classic.clinicaltrials.gov>) 公布的数据, 截至目前已完成了 2 项使用 CRISPR/Cas9 进行的临床试验, 还有 12 项正在进行 (详见表 1)。这些研究的主要目标是利用 CRISPR/Cas9 技术敲除 T 细胞中的免疫检查点, 再将其重新注入患者体内, 以达到免疫激活的效果。不过需要指出的是, 这些研究主要涵盖了 I 期和 II 期试验, 并且大多数仍处于未完成状态。因此, 真正将这些成果应用于临床实践, 还需要长期的努力。

4 瓶颈与对策

4.1 脱靶问题

脱靶效应一直被认为是 CRISPR/Cas9 技术的主要风险。尽管通过计算程序已经优化了 sgRNA 的设计, 但其特异性仍无法完全保证^[74]。为了解决脱靶效应问题, 使用 SpCas9-HF1150 和 eSpCas9151 被认为是可行的解决方案之一^[75-76]。此外, 相较于 Cas9, Cas12 和 Cas13 具有更高的编辑效率, 其中 CRISPR/Cas13 甚至能够直接靶向 RNA, 从而降低细胞中转录本的表达^[77]。这些新技术的发现为肿瘤治疗带来了更多可能性^[78]。

表1 应用 CRISPR/Cas9 技术治疗肿瘤的临床试验研究现状

肿瘤类型	NCT	分期	研究说明	参与人数	发布日期	招募情况
食管癌	NCT03081715	NA	PD-1 基因敲除的工程 T 细胞对晚期食管癌的治疗	16	2019年6月12日	已完成
B 细胞恶性肿瘤 非霍奇金淋巴瘤 B 细胞淋巴瘤	NCT04035434	I / II	一项评估 CTX110 对复发性或难治性 B 细胞恶性肿瘤(CARBON)受试者安全性和有效性的研究	227	2023年8月18日	招募中
B 细胞淋巴瘤 非霍奇金淋巴瘤 B 细胞恶性肿瘤 慢性淋巴细胞 白血病 小淋巴细胞淋巴瘤 滤泡淋巴瘤 套细胞淋巴瘤 边缘区淋巴瘤 大 B 细胞淋巴瘤	NCT05643742	I / II	一项评估 CTX112 对复发性或难治性 B 细胞恶性肿瘤受试者安全性和有效性的研究	120	2023年8月15日	招募中
肾透明细胞癌 宫颈癌 食管癌 胰腺癌 恶性胸膜癌 间皮瘤	NCT05795595	I / II	一项评估 CTX131 对成人复发性或难治性实体瘤患者安全性和有效性研究	250	2023年8月30日	招募中
T 细胞淋巴瘤	NCT04502446	I	一项评估 CTX130 在治疗复发性或难治性 T 细胞或 B 细胞恶性肿瘤患者中的安全性和有效性研究	45	2023年4月27日	招募中
转移性非小细胞肺癌	NCT02793856	I	PD-1 基因敲除的工程 T 治疗转移性非小细胞肺癌的研究	12	2021年1月12日	已完成
多发性骨髓瘤	NCT04244656	I	一项评估 CTX120 在治疗复发或难治性多发性骨髓瘤患者中安全性和有效性的研究	26	2023年8月30日	进行中
肾细胞癌	NCT04438083	I	一项评估 CTX130 对复发性或难治性肾细胞癌的安全性和有效性研究	107	2023年5月11日	进行中
胃肠道上皮癌 胃肠道肿瘤 结直肠癌 胰腺癌 胆囊癌 结肠癌 食管癌 胃癌	NCT04426669	I / II	一项利用 CRISPR 基因工程敲除免疫检查点 CISH, 治疗转移性胃肠癌的研究	20	2023年3月3日	招募中
非小细胞肺癌 转移性非小细胞肺癌 IV 期非小细胞肺癌 鳞状细胞肺癌 肺腺癌 大细胞肺癌	NCT05566223	I / II	CISH 失活的 TIL 治疗肺癌	70	2022年12月9日	暂未招募
晚期肝细胞癌	NCT04417764	I	TACE 与 PD-1 基因敲除的工程 T 细胞联合治疗晚期肝细胞癌	10	2023年2月9日	招募中
非霍奇金淋巴瘤	NCT06014073	I / II	TRAC 和 Power3 基因敲除的异体 CD19-靶向 CAR-T 细胞疗法治疗非霍奇金淋巴瘤	30	2023年9月11日	招募中
复发/难治性急性髓性白血病	NCT05662904	I	基因消融造血干细胞中的 CD33	12	2022年12月23日	暂未招募
急性 B 淋巴细胞白血病	NCT04557436	I	TT52CAR19 治疗急性 B 淋巴细胞白血病	10	2023年5月31日	进行中

4.2 永久编辑的弊端

尽管DNA靶向治疗可以提供持久的疗效,但完全敲除某些基因可能对细胞的健康产生负面影响^[14]。最近,出现了一种名为A-to-I(adenosine-to-inosine,腺苷-肌苷)的RNA编辑方法,这种方法主要基于作用于RNA的腺苷脱氨酶(adenosine deaminase acting on RNA, ADAR)。它可以对内源性RNA进行脱氨编辑,而不是将其敲除或过度表达。ADAR是一类酶,在双链RNA(dsRNA)中可以将腺苷(A)转变为肌苷(I)。细胞机制将肌苷识别为鸟苷(G)^[79],从而在不改变基因的情况下,改变蛋白质的结构和表达。与CRISPR/Cas9相比,RNA介导的改变是可逆的^[80],这为CRISPR/Cas9技术提供了一个重要的补充。

5 结 语

CRISPR/Cas9技术目前仍处于临床应用的开发阶段,并且面临着许多挑战。这些挑战包括确保准确性、安全性和有效性^[74]。为了提高CRISPR/Cas9技术的疗效,需要解决诸多问题,例如脱靶效应、编辑效率、编辑细胞的适应性、免疫反应和递送方法等^[81]。因此,尽管CRISPR/Cas9基因编辑技术在癌症研究与治疗领域展现出了巨大潜力,但其实际临床效用仍有赖于更多深入研究和大规模临床试验的严格验证。当前,运用CRISPR/Cas9技术强化现有抗肿瘤疗法的手段尚处于初步的临床探索阶段,距离在临床实践中广泛应用仍有一段必要的发展历程。

[参 考 文 献]

- [1] 李炫宗. B细胞与非小细胞肺癌免疫治疗疗效的相关性研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2022.
- [2] KHAN F A, PANDUPUSPITASARI N S, HUANG C J, *et al.* CRISPR/Cas9 therapeutics: a cure for cancer and other genetic diseases[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(32): 52541-52552. DOI: 10.18632/oncotarget.9646.
- [3] KHALAF K, JANOWICZ K, DYSZKIEWICZ-KONWIŃSKA M, *et al.* CRISPR/Cas9 in cancer immunotherapy: animal models and human clinical trials[J/OL]. *Genes*, 2020, 11(8): 921[2024-05-05]. <https://doi.org/10.3390/genes11080921>. DOI: 10.3390/genes11080921.
- [4] HANAHAN D. Hallmarks of cancer: new dimensions[J]. *Cancer Discov*, 2022, 12(1): 31-46. DOI: 10.1158/2159-8290.cd-21-1059.
- [5] SARKAR E, KHAN A. Erratic journey of CRISPR/Cas9 in oncology from bench-work to successful-clinical therapy[J/OL]. *Cancer Treat Res Commun*, 2021, 27: 100289[2024-05-05]. <https://doi.org/10.1016/j.ctarc.2020.100289>. DOI: 10.1016/j.ctarc.2020.100289.
- [6] THOMAS K R, CAPECCHI M R. Introduction of homologous DNA sequences into mammalian cells induces mutations in the cognate gene [J]. *Nature*, 1986, 324(6092): 34-38. DOI: 10.1038/324034a0.
- [7] YANG H, LIU B, LIU D X, *et al.* Genome-wide CRISPR screening identifies DCK and CCNL1 as genes that contribute to gemcitabine resistance in pancreatic cancer[J/OL]. *Cancers*, 2022, 14(13): 3152 [2024-05-05]. <https://doi.org/10.3390/cancers14133152>. DOI: 10.3390/cancers14133152.
- [8] KOH V, KWAN H Y, TAN W L, *et al.* Knockdown of POLA2 increases gemcitabine resistance in lung cancer cells[J/OL]. *BMC Genom*, 2016, 17(13): 1029 [2024-05-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28155658/>. DOI: 10.1186/s12864-016-3322-x.
- [9] MALI P, YANG L H, ESVELT K M, *et al.* RNA-guided human genome engineering via Cas9[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 823-826. DOI: 10.1126/science.1232033.
- [10] CONG L, RAN F A, COX D, *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/cas systems[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823. DOI: 10.1126/science.1231143.
- [11] YANG H, BAILEY P, PILARSKY C. CRISPR Cas9 in pancreatic cancer research[J/OL]. *Front Cell Dev Biol*, 2019, 7: 239[2024-05-05]. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00239>. DOI: 10.3389/fcell.2019.00239.
- [12] KANG J Y, PARK J W, HWANG Y, *et al.* The H3K4 methyltransferase SETD1A is required for proliferation of non-small cell lung cancer cells by promoting S-phase progression[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 561: 120-127. DOI: 10.1016/j.bbrc.2021.05.026.
- [13] CAI J, CHEN J F, WU T T, *et al.* Genome-scale CRISPR activation screening identifies a role of LRP8 in Sorafenib resistance in Hepatocellular carcinoma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 526(4): 1170-1176. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.04.040.
- [14] POTTS M A, MCDONALD J A, SUTHERLAND K D, *et al.* Critical cancer vulnerabilities identified by unbiased CRISPR/Cas9 screens inform on efficient cancer Immunotherapy[J]. *Eur J Immunol*, 2020, 50(12): 1871-1884. DOI: 10.1002/eji.202048712.
- [15] CHIOU S H, WINTERS I P, WANG J, *et al.* Pancreatic cancer modeling using retrograde viral vector delivery and *in vivo* CRISPR/Cas9-mediated somatic genome editing[J]. *Genes Dev*, 2015, 29(14): 1576-1585. DOI: 10.1101/gad.264861.115.
- [16] GAJ T, GERSBACH C A, BARBAS C F III. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering[J]. *Trends Biotechnol*, 2013, 31(7): 397-405. DOI: 10.1016/j.tibtech.2013.04.004.
- [17] KIM W, LEE S, KIM H S, *et al.* Targeting mutant KRAS with CRISPR-Cas9 controls tumor growth[J]. *Genome Res*, 2018, 28(3): 374-382. DOI: 10.1101/gr.223891.117.
- [18] LU X J, XUE H Y, KE Z P, *et al.* CRISPR-Cas9: a new and promising player in gene therapy[J]. *J Med Genet*, 2015, 52(5): 289-296. DOI: 10.1136/jmedgenet-2014-102968.
- [19] QI L S, LARSON M H, GILBERT L A, *et al.* Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression[J/OL]. *Cell*, 2021, 184(3): 844 [2024-05-05]. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.022>. DOI: 10.1016/j.cell.2013.02.022.
- [20] ZHANG H M, QIN C H, AN C M, *et al.* Application of the CRISPR/Cas9-based gene editing technique in basic research, diagnosis, and therapy of cancer[J/OL]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 126[2024-05-05]. <http://dx.doi.org/10.1186/s12943-021-01431-6>. DOI: 10.1186/s12943-021-01431-6.
- [21] MAEDER M L, LINDER S J, CASCIO V M, *et al.* CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes[J/OL]. *Nat Methods*, 2013, 10(10): 977-979[2024-05-05]. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2598>. DOI: 10.1038/nmeth.2598.
- [22] GILBERT L, LARSON M, MORSUT L, *et al.* CRISPR-mediated

- modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes[J]. *Cell*, 2013, 154(2): 442-451. DOI: 10.1016/j.cell.2013.06.044.
- [23] ZHANG B, REN Z Y, ZHENG H M, *et al.* CRISPR activation screening in a mouse model for drivers of hepatocellular carcinoma growth and metastasis[J/OL]. *iScience*, 2023, 26(3): 106099 [2024-05-05]. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.106099>. DOI: 10.1016/j.isci.2023.106099.
- [24] LARSON M H, GILBERT L A, WANG X W, *et al.* CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression[J]. *Nat Protoc*, 2013, 8(11): 2180-2196. DOI: 10.1038/nprot.2013.132.
- [25] COX D B T, PLATT R J, ZHANG F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges[J]. *Nat Med*, 2015, 21(2): 121-131. DOI: 10.1038/nm.3793.
- [26] KOMOR A C, KIM Y B, PACKER M S, *et al.* Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage[J]. *Nature*, 2016, 533(7603): 420-424. DOI: 10.1038/nature17946.
- [27] GAUDELLI N M, KOMOR A C, REES H A, *et al.* Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage [J]. *Nature*, 2017, 551(7681): 464-471. DOI: 10.1038/nature24644.
- [28] LANDER E S. Initial impact of the sequencing of the human genome[J]. *Nature*, 2011, 470(7333): 187-197. DOI: 10.1038/nature09792.
- [29] SHALEM O, SANJANA N E, HARTENIAN E, *et al.* Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells[J]. *Science*, 2014, 343(6166): 84-87. DOI: 10.1126/science.1247005.
- [30] BERNIS K, HIJMANS E M, MULLENDERS J, *et al.* A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway[J]. *Nature*, 2004, 428(6981): 431-437. DOI: 10.1038/nature02371.
- [31] RAD R, RAD L, WANG W, *et al.* PiggyBac transposon mutagenesis: a tool for cancer gene discovery in mice[J]. *Science*, 2010, 330(6007): 1104-1107. DOI: 10.1126/science.1193004.
- [32] CARETTE J E, GUIMARAES C P, VARADARAJAN M, *et al.* Haploid genetic screens in human cells identify host factors used by pathogens[J]. *Science*, 2009, 326(5957): 1231-1235. DOI: 10.1126/science.1178955.
- [33] 陈坤. 通过 CRISPR/Cas9 全基因组敲除技术筛选瑞戈非尼在肝癌治疗中产生的耐药基因[D]. 厦门: 厦门大学, 2021.
- [34] YANG W, YAN J Q, ZHUANG P Z, *et al.* Progress of delivery methods for CRISPR-Cas9[J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2022, 19(8): 913-926. DOI: 10.1080/17425247.2022.2100342.
- [35] YU W H, MOOKHERJEE S, CHAITANKAR V, *et al.* Nrl knockdown by AAV-delivered CRISPR/Cas9 prevents retinal degeneration in mice [J/OL]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14716[2024-05-05]. <https://doi.org/10.1038/ncomms14716>. DOI: 10.1038/ncomms14716.
- [36] NASO M F, TOMKOWICZ B, PERRY W L, *et al.* Adeno-associated virus (AAV) as a vector for gene therapy[J]. *BioDrugs*, 2017, 31(4): 317-334. DOI: 10.1007/s40259-017-0234-5.
- [37] WANG P, ZHANG L M, ZHENG W F, *et al.* Thermo-triggered release of CRISPR-Cas9 system by lipid-encapsulated gold nanoparticles for tumor therapy[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2018, 57(6): 1491-1496. DOI: 10.1002/anie.201708689.
- [38] LIU J, CHANG J, JIANG Y, *et al.* Fast and efficient CRISPR/Cas9 genome editing *in vivo* enabled by bioreducible lipid and messenger RNA nanoparticles[J/OL]. *Adv Mater*, 2019, 31(33): 1902575[2024-05-05]. <https://doi.org/10.1002/adma.201902575>. DOI: 10.1002/adma.201902575.
- [39] ZHA M J, CAI C E, HE P M. Outlook on the security and potential improvements of CRISPR-Cas9[J]. *Mol Biotechnol*, 2023, 65(11): 1729-1736. DOI: 10.1007/s12033-023-00708-z.
- [40] WANG S W, GAO C, ZHENG Y M, *et al.* Current applications and future perspective of CRISPR/Cas9 gene editing in cancer[J/OL]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 57[2024-05-05]. <http://dx.doi.org/10.1186/s12943-022-01518-8>. DOI: 10.1186/s12943-022-01518-8.
- [41] 杨禾茜. 利用 CRISPR 激活文库体内筛选胃癌相关基因及功能研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2023.
- [42] GHALANDARY M, GAO Y Q, BECKER M, *et al.* WT1 and DNMT3A play an essential function and represent therapeutic vulnerabilities in certain AML samples, As shown by CRISPR/Cas9 mediated knockout in PDX models *in vivo*[J/OL]. *Blood*, 2021, 138(Supplement 1): 377 [2024-05-05]. <https://doi.org/10.1182/blood-2021-150305>. DOI: 10.1182/blood-2021-150305.
- [43] 王学敏. CRISPR 文库筛选鉴定 ROCK2 是甲状腺未分化癌中紫杉醇的协同致死靶点[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2021.
- [44] WEINSTEIN I B, JOE A K. Mechanisms of Disease: oncogene addiction: a rationale for molecular targeting in cancer therapy[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2006, 3(8): 448-457. DOI: 10.1038/nrponc0558.
- [45] SHARMA S V, SETTLEMAN J. Oncogene addiction: setting the stage for molecularly targeted cancer therapy[J]. *Genes Dev*, 2007, 21(24): 3214-3231. DOI: 10.1101/gad.1609907.
- [46] IPSEN M B, SØRENSEN E M G, THOMSEN E A, *et al.* A genome-wide CRISPR-Cas9 knockout screen identifies novel PARP inhibitor resistance genes in prostate cancer[J]. *Oncogene*, 2022, 41(37): 4271-4281. DOI: 10.1038/s41388-022-02427-2.
- [47] 李春燕. 基于 CRISPR 激酶文库筛选 STK19 作为舌鳞癌中铂类协同致死靶点的作用及机制研究[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2022.
- [48] BIALK P, WANG Y C, BANAS K, *et al.* Functional gene knockout of NRF2 increases chemosensitivity of human lung cancer A549 cells *In Vitro* and in a xenograft mouse model[J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2018, 11: 75-89. DOI: 10.1016/j.omto.2018.10.002.
- [49] HANAHAHAN D, WEINBERG R. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646-674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [50] VUELTA E, ORDOÑEZ J L, SANZ D J, *et al.* CRISPR/Cas9-directed gene trap constitutes a selection system for corrected BCR/ABL leukemic cells in CML[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(12): 6386[2024-05-05]. <https://doi.org/10.3390/ijms23126386>. DOI: 10.3390/ijms23126386.
- [51] MELO J V, DEININGER M W N. Biology of chronic myelogenous leukemia: signaling pathways of initiation and transformation[J]. *Oncol Clin N Am*, 2004, 18(3): 545-568. DOI: 10.1016/j.hoc.2004.03.008.
- [52] COLICELLI J. ABL tyrosine kinases: evolution of function, regulation, and specificity[J/OL]. *Sci Signal*, 2010, 3(139): e3139re6[2024-05-05]. <https://doi.org/10.1126/scisignal.3139re6>. DOI: 10.1126/scisignal.3139re6.
- [53] LIN H, MONACO G, SUN T, *et al.* Bcr-Abl-mediated suppression of normal hematopoiesis in leukemia[J]. *Oncogene*, 2005, 24(20): 1-11. DOI: 10.1038/sj.onc.1208500.

- [54] SÁNCHEZ-GARCÍA I, MARTÍN-ZANCA D. Regulation of Bcl-2 gene expression by BCR-ABL is mediated by Ras[J]. *J Mol Biol*, 1997, 267(2): 225-228. DOI: 10.1006/jmbi.1996.0779.
- [55] LING K J, JIANG L P, LIANG S, *et al.* Nanog interaction with the androgen receptor signaling axis induce ovarian cancer stem cell regulation: studies based on the CRISPR/Cas9 system[J/OL]. *J Ovarian Res*, 2018, 11(1): 36[2024-05-05]. <http://dx.doi.org/10.1186/s13048-018-0403-2>. DOI: 10.1186/s13048-018-0403-2.
- [56] CARABALLO GALVA L D, CAI L, SHAO Y X, *et al.* Engineering T cells for immunotherapy of primary human hepatocellular carcinoma [J]. *J Genet Genom*, 2020, 47(1): 1-15. DOI: 10.1016/j.jgg.2020.01.002.
- [57] JIANG L, WANG W. Genetically modified immune cells for cancer immunotherapy[J]. *Sci China Life Sci*, 2018, 61(10): 1277-1279. DOI: 10.1007/s11427-018-9395-0.
- [58] HUANG Y, LIANG D, LIU J F, *et al.* The breakthroughs in cancer immune checkpoint based therapy: a review of development in immune checkpoint study and its application[J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2017, 20(5): 430-439. DOI: 10.2174/1386207320666170315121728.
- [59] NEWICK K, O'BRIEN S, MOON E, *et al.* CAR T cell therapy for solid tumors[J]. *Annu Rev Med*, 2017, 68: 139-152. DOI: 10.1146/annurev-med-062315-120245.
- [60] MAGANTI H B, KIRKHAM A M, BAILEY A J M, *et al.* Use of CRISPR/Cas9 gene editing to improve chimeric antigen-receptor T cell therapy: a systematic review and meta-analysis of preclinical studies[J]. *Cytotherapy*, 2022, 24(4): 405-412. DOI: 10.1016/j.jcyt.2021.10.010.
- [61] GAO Q, WANG X Y, QIU S J, *et al.* Overexpression of PD-L1 significantly associates with tumor aggressiveness and postoperative recurrence in human hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(3): 971-979. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-08-1608.
- [62] YANG Z K, WU H T, LIN Q, *et al.* Lymphopenic condition enhanced the antitumor immunity of PD-1-knockout T cells mediated by CRISPR/Cas9 system in malignant melanoma[J]. *Immunol Lett*, 2022, 250: 15-22. DOI: 10.1016/j.imlet.2022.09.004.
- [63] LIU X J, ZHAO Y B. CRISPR/Cas9 genome editing: Fueling the revolution in cancer immunotherapy[J]. *Curr Res Transl Med*, 2018, 66(2): 39-42. DOI: 10.1016/j.retram.2018.04.003.
- [64] JUNG I Y, KIM Y Y, YU H S, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated knockout of DGK improves antitumor activities of human T cells[J]. *Cancer Res*, 2018, 78(16): 4692-4703. DOI: 10.1158/0008-5472.can-18-0030.
- [65] SHIFRUT E, CARNEVALE J, TOBIN V, *et al.* Genome-wide CRISPR screens in primary human T cells reveal key regulators of immune function[J]. *Cell*, 2018, 175(7): 1958-1971. e15. DOI: 10.1016/j.cell.2018.10.024.
- [66] LU C Y, JIN R, ZHANG F, *et al.* Tumor marker testing among Medicare beneficiaries with cancer[J/OL]. *J Clin Oncol*, 2022, 40(16_suppl): e13628[2024-01-25]. https://doi.org/10.1200/jco.2022.40.16_suppl.e13628. DOI: 10.1200/jco.2022.40.16_suppl.e13628.
- [67] XIA W Q, HU C Q. Progress in research on tumor metastasis inhibitors[J]. *Curr Med Chem*, 2020, 27(34): 5758-5772. DOI: 10.2174/0929867326666190927120847.
- [68] SHI J J, CHEN Z C, ZHAO C Q, *et al.* Photoelectrochemical biosensing platforms for tumor marker detection[J/OL]. *Coord Chem Rev*, 2022, 469: 214675[2024-01-25]. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2022.214675>. DOI: 10.1016/j.ccr.2022.214675.
- [69] ZHANG J J, LI Y, LIU H, *et al.* Genome-wide CRISPR/Cas9 library screen identifies PCMT1 as a critical driver of ovarian cancer metastasis[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 24 [2024-01-25]. <http://dx.doi.org/10.1186/s13046-022-02242-3>. DOI: 10.1186/s13046-022-02242-3.
- [70] D'ANTONIO L, FIENI C, CIUMMO S L, *et al.* Inactivation of interleukin-30 in colon cancer stem cells via CRISPR/Cas9 genome editing inhibits their oncogenicity and improves host survival[J/OL]. *J Immunother Cancer*, 2023, 11(3): e006056[2024-01-25]. <https://doi.org/10.1136/jitc-2022-006056>. DOI: 10.1136/jitc-2022-006056.
- [71] LU Y, XUE J X, DENG T, *et al.* Safety and feasibility of CRISPR-edited T cells in patients with refractory non-small-cell lung cancer[J]. *Nat Med*, 2020, 26(5): 732-740. DOI: 10.1038/s41591-020-0840-5.
- [72] BAILEY S R, MAUS M V. Gene editing for immune cell therapies [J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(12): 1425-1434. DOI: 10.1038/s41587-019-0137-8.
- [73] ZHENG H. A Safety and efficacy study of transcription activator-like effector nucleases and clustered regularly interspaced short palindromic repeat/Cas9 in the treatment of HPV-related cervical intraepithelial Neoplasia I, clinicaltrials.gov, 2017. <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03057912> (accessed January 1, 2023).
- [74] KHOSHANDAM M, SOLTANINEJAD H, MOUSAZADEH M, *et al.* Clinical applications of the CRISPR/Cas9 genome-editing system: delivery options and challenges in precision medicine[J]. *Genes Dis*, 2024, 11(1): 268-282. DOI: 10.1016/j.gendis.2023.02.027.
- [75] KLEINSTIVER B P, PATTANAYAK V, PREW M S, *et al.* High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects[J]. *Nature*, 2016, 529(7587): 490-495. DOI: 10.1038/nature16526.
- [76] SLAYMAKER I M, GAO L Y, ZETSCHE B, *et al.* Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity[J]. *Science*, 2016, 351(6268): 84-88. DOI: 10.1126/science.aad5227.
- [77] GUO X Y, RAHMAN J A, WESSELS H H, *et al.* Transcriptome-wide Cas13 guide RNA design for model organisms and viral RNA pathogens[J/OL]. *Cell Genom*, 2021, 1(1): 100001 [2024-01-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9164475/>. DOI: 10.1016/j.xgen.2021.100001.
- [78] SINGH M, BINDAL G, MISRA C S, *et al.* The era of Cas12 and Cas13 CRISPR-based disease diagnosis[J]. *Crit Rev Microbiol*, 2022, 48(6): 714-729. DOI: 10.1080/1040841x.2021.2025041.
- [79] BOOTH B J, NOURREDDINE S, KATREKAR D, *et al.* RNA editing: expanding the potential of RNA therapeutics[J]. *Mol Ther*, 2023, 31(6): 1533-1549. DOI: 10.1016/j.ymthe.2023.01.005.
- [80] PFEIFFER L S, STAFFORST T. Precision RNA base editing with engineered and endogenous effectors[J]. *Nat Biotechnol*, 2023, 41: 1526-1542. DOI: 10.1038/s41587-023-01927-0.
- [81] LI L, HU S, CHEN X Y. Non-viral delivery systems for CRISPR/Cas9-based genome editing: challenges and opportunities[J]. *Biomaterials*, 2018, 171: 207-218. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.04.031.

[收稿日期] 2024-02-20

[修回日期] 2024-05-06

[本文编辑] 黄静怡