

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2026.01.013

· 综述 ·

## CRISPR-Cas9 技术筛选肿瘤治疗靶点的优势和缺陷

### The advantages and disadvantages of CRISPR-Cas9 technology in screening tumor therapeutic targets

常鸿宇<sup>a,b</sup>, 杨澍<sup>a,b</sup>, 郑凯威<sup>a</sup>(海军军医大学 a. 热带病学教研室, b. 海军医学系, 上海 200433)

**[摘要]** 成簇规律间隔短回文重复系统及相关蛋白9(CRISPR-Cas9)作为高效、特异的基因编辑工具,已在人类疾病,尤其是肿瘤治疗领域被广泛研究。本文系统梳理CRISPR-Cas9的特点、机制与优势,重点分析该技术在肿瘤治疗靶点筛选中的新突破与前沿应用,阐明CRISPR-Cas9在肿瘤生物治疗靶点筛选技术中的核心地位。同时,直面CRISPR-Cas9技术筛选靶点在当前临床研究中面临的诸多挑战,深入探讨其局限性和关键瓶颈问题,展望其优化策略和未来发展趋势。

**[关键词]** CRISPR-Cas9; 肿瘤治疗; 筛选靶点; 基因编辑; 临床应用

**[中图分类号]** R730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2026) 01-0099-06

如今恶性肿瘤已经成为人类面临的致命威胁之一,严重危害人民的生命健康<sup>[1]</sup>。目前,放射治疗、化学治疗和外科手术等已经被广泛应用于癌症治疗中,然而由于治疗后的肿瘤高复发率及治疗过程中患者对化疗药物或放疗产生抗性,癌症治疗难以达到理想的疗效。鉴于此,为了有效修正或抑制癌细胞内的基因变异,亟须开发新的肿瘤治疗策略。近年来,规律间隔短回文重复序列及相关蛋白9(CRISPR-Cas9)基因编辑技术已被深度优化并加速推向临床<sup>[2]</sup>。在CRISPR-Cas9技术中,Cas9核酸酶通过单导向RNA(single guide RNA, sgRNA)的指引,准确地定位到目标DNA序列,并在此处制造双链断裂(double-strand break, DSB),进而实现特定位点的基因组编辑。相较于传统的基因编辑技术,如锌指核酸酶和转录激活因子样效应物核酸酶,CRISPR-Cas9技术展现出更高的灵活性、效率、精确度和可操作性<sup>[3]</sup>。该技术可通过简便地设计sgRNA来靶向特定基因组序列,这一特性推动了大规模基因组级别CRISPR文库的发展<sup>[4]</sup>。CRISPR-Cas9技术在不同类型的肿瘤治疗领域展现出了广泛的应用前景,包括编辑肿瘤相关基因、增强肿瘤免疫治疗、构建肿瘤研究模型,以及克服抗肿瘤药物耐药性等。因此,本文通过全面分析CRISPR-Cas9技术的发展现状与未来趋势,以期对肿瘤基因治疗策略的优化与临床转化研究提供理论参考与方向指引。

## 1 CRISPR-Cas9 技术

### 1.1 CRISPR-Cas9 系统的组成和特点

CRISPR-Cas 系统包含3个主要类型(I、II、III型)和12个亚型<sup>[5]</sup>。与I型和III型相比,II型系统依靠单个Cas蛋白精确靶向特定DNA序列,因此已成

为最常用的基因编辑工具<sup>[6]</sup>。该系统由3个核心组件构成:Cas9蛋白、CRISPR RNA(crRNA)和反式激活crRNA(tracrRNA)<sup>[7]</sup>。Cas9内切酶包含6个主要结构域,分别是REC1(recombinase 1)结构域、REC2结构域、桥螺旋(bridge helix)结构域、PAM相互作用(PAM-interacting, PI)结构域、HNH(histidine-asparagine-histidine)结构域和RuvC(resolvase C)结构域<sup>[8]</sup>。crRNA包括由20个核苷酸组成的间隔序列和用于与tracrRNA互补配对的额外部分;而tracrRNA则具有2个功能性结构域,分别负责与crRNA和Cas9蛋白结合<sup>[8]</sup>。此外,crRNA-tracrRNA复合体可以被设计成sgRNA用于基因识别<sup>[9]</sup>。

在CRISPR-Cas9系统中,各功能结构域之间协同作用赋予了它强大的基因编辑能力。REC1结构域与sgRNA结合后,Cas9内切酶被激活,它会寻找并配对包含特异PAM序列的靶DNA位点,随后用其核酸酶结构域(HNH和RuvC)将目标基因切割。Cas9蛋白中的PI结构域在识别目标DNA并启动其核酸内切酶活性中起着关键作用<sup>[8]</sup>。若缺乏PAM序列,即便靶序列与sgRNA完全匹配,Cas9也无法对其进行识别,因此PAM序列是设计sgRNA时必须考虑的关键因素。当Cas9与PAM序列结合并形成DNA-sgRNA复合体后,其内部的RuvC和HNH两个核酸酶结构域就会在目标序列上引入DSB,从而发挥其核心功能<sup>[10]</sup>。

**[基金项目]** 国家自然科学基金(82502207);上海市扬帆计划(24YF2757600);上海市卫健委卫生行业临床研究专项(20254Y0099);海军军医大学基础医学研究课题(2024QN006)

**[作者简介]** 常鸿宇,学士

**[通信作者]** 郑凯威(扫码获取作者通信方式)



## 1.2 CRISPR-Cas9 系统的机制和优势

CRISPR-Cas9 系统是一种能够精准切割 DNA 链的工具。在此过程中,sgRNA 先与目标 DNA 序列配对,随后指引 Cas9 在 PAM 序列的上游切割 DNA,形成 DSB<sup>[11]</sup>。随后细胞会启动修复过程,主要通过非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)或同源定向修复(homology-directed repair, HDR)来进行损伤 DNA 的修复<sup>[12]</sup>。其中,NHEJ 途径是最常见的修复方式,但这种方式往往容易出错,导致 DNA 序列插入或者缺失一个或多个核苷酸,进而可能引起移码突变。相比之下,HDR 途径虽缓慢,但是精确度大大提高。它可以在 DNA 模板的引导下,精确地修复或修改目标 DNA 序列。因此,人们可以通过设计同源序列(homologous sequence)构成的修复模板来定向插入目的基因。

Cas9 的一个重要特性是它能够通过引导 RNA (guide RNA, gRNA)识别 PAM 序列并与特定 DNA 位点配对,所以即使没有核酸内切酶活性的失活型 Cas9 (dead Cas9, dCas9),也能通过与转录激活子或转录抑制子融合的方式调控整个基因组中的基因表达<sup>[13]</sup>。这种基于 dCas9 的转录抑制方法被称为 CRISPR 干扰 (CRISPR interference, CRISPRi)。当 dCas9 与 sgRNA 共同表达时,它能够阻止转录起始复合物的组装及转录过程的延伸,从而有效地抑制目的基因的表达。研究<sup>[9]</sup>表明,CRISPRi 能够同时抑制大肠杆菌中多个基因的表达,且这种抑制效果是可逆的,不会导致靶基因的永久性改变。另外,与激活因子融合的 dCas9 可以在 CRISPR 激活 (CRISPR activation, CRISPRa)过程中发挥作用,实现在 RNA 聚合酶作用下通过招募转录起始复合物来促进目的基因的表达<sup>[14]</sup>。

自从 2013 年首次在哺乳动物细胞中应用<sup>[15]</sup>以来,CRISPR-Cas9 技术已经迅速成为多个领域的研究利器,涵盖生物科学、生物技术、医学及农业等多个方面。与以往的基因编辑技术相比,CRISPR-Cas9 展现出了显著的优势,比如更高的特异性和编辑效率,以及更低的成本,研究者只需要调整 sgRNA 序列即可实现对不同 DNA 位点的精确编辑。此外,它还能够以较高的准确度和较低的细胞损伤率对 DNA 上的目标区域进行修饰。由于 sgRNA 的可塑性,CRISPR 系统展现了其相对灵活的 DNA 调控作用,可见该技术在精确调控基因表达方面的广阔前景。

## 2 CRISPR-Cas9 技术在肿瘤治疗领域中的新突破与前沿应用

### 2.1 高通量筛选肿瘤治疗新靶点

在细胞层面,CRISPR-Cas9 可用于在全基因组范围内识别并验证肿瘤细胞的特异性脆弱点(如合成致死靶点),靶向调控这些基因,从而降低癌细胞活力,为发现潜在的治疗靶点提供平台<sup>[16]</sup>。将 CRISPR-Cas9 技术筛选与药物扰动相结合能解析肿瘤治疗过程中药物协同作用或产生耐药反应的机制,并通过特异性干预降低癌细胞的耐药性以达到治疗肿瘤的目的。研究<sup>[17]</sup>表明,肿瘤细胞内突变的癌基因与抑癌基因有望成为肿瘤生物治疗的靶标。通过精确调控抑癌基因,例如借助 CRISPR-Cas9 技术实现对 BAX、E-cadherin 和 p21 等相关抑癌基因的靶向调控,能够有效抑制膀胱癌细胞的增殖能力,并成功触发细胞凋亡。在不同遗传背景的甲状腺未分化癌细胞中,通过 CRISPR-Cas9 技术敲除 MAP 激酶激活死亡域蛋白(MADD)基因后,研究人员观察到癌细胞的存活、增殖及转移能力被显著削弱,同时细胞凋亡加剧<sup>[18]</sup>。研究<sup>[19]</sup>表明,SHC SH2 结构域结合蛋白 1 (SHCBP1)在乳腺癌的肿瘤微环境调控中扮演关键角色。通过 CRISPR-Cas9 技术敲除 Shcbp1 基因,能够显著减少癌症相关成纤维细胞的浸润,有效抑制其增殖与侵袭能力,并诱导细胞凋亡与 G2/M 期细胞周期阻滞。

有研究者<sup>[20]</sup>成功使用 CRISPR-Cas9 技术纠正了慢性髓系白血病细胞 KBM5(源自 K562 的 Bcr-Abl 突变细胞株)中存在的附加性梳样蛋白 1 (additional sex combs-like 1, ASXL1)纯合无义突变,使蛋白质重新表达并恢复正常功能。这项研究证明了 CRISPR-Cas9 技术在人类白血病治疗中的应用前景。同时,该团队还运用 CRISPR-Cas9 系统,在人类 Burkitt 淋巴瘤细胞中去除了新发现的 BCL2 基因家族成员——髓样细胞白血病因子-1(myeloid cell leukemia 1, MCL-1)基因,进而导致了淋巴瘤细胞的凋亡<sup>[21]</sup>,表明 MCL-1 基因在细胞的分化、增殖及肿瘤形成过程中扮演重要角色,有望成为新的肿瘤治疗靶标<sup>[22]</sup>。

肿瘤患者的化疗抵抗是抗肿瘤治疗中的一个瓶颈问题。研究<sup>[23]</sup>发现,肺癌细胞中 KEAP1 的缺失可以改变细胞代谢,从而使细胞对 RTK/RAS/MAPK 通路抑制剂产生耐药性。在免疫治疗领域,CRISPR-Cas9 技术筛选揭示了肿瘤细胞逃避 T 细胞杀伤的关键机制,如 MHC I 类抗原提呈通路相关基因 (HLA-A、B2M、TAP1 等)的缺失可促进免疫逃逸<sup>[24]</sup>。通过 CRISPR-Cas9 技术还可以靶向敲除骨肉瘤细胞中多药耐药基因 1 (MDR1),能够恢复细胞对化疗药物的敏感性<sup>[25]</sup>。类似地,表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)第 20 号外显子 790 位点 (T790M)二次突变能够引起药物抗性,针对该位点

的干预也可能成为治疗肺癌的一种有效方法<sup>[26]</sup>。

## 2.2 驱动前沿研究与技术融合

CRISPR-Cas9 技术筛选联合单细胞 RNA 测序技术 (single-cell RNA sequencing, scRNA-seq) 将 sgRNA 与单细胞转录组相关联, 实现了对复杂调控机制和细胞异质性的高通量分析, 为复杂信号通路和其他生物学机制的研究提供了新方法<sup>[27]</sup>。有研究者基于上述技术的关联, 进行条形码标记<sup>[28]</sup>, 开发了 Perturb-map 的空间功能基因组学平台, 通过分析敲除某个基因后肿瘤病变区域的分子状态, 从而探究基因对肿瘤发生发展的影响<sup>[29]</sup>。通过空间 CRISPR-Cas9 技术筛选, 不仅证实了免疫检查点 (如 PD-L1 和 CD47) 能够促进肿瘤发生发展, 而且还发现了在细胞因子信号传导抑制因子 1 (suppressor of cytokine signaling 1, SOCS1) 和转化生长因子  $\beta$  受体 2 (transforming growth factor beta receptor type 2, TGFBR2) 基因敲除后, 肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME) 中的细胞构成、组织结构及免疫细胞的浸润情况的变化<sup>[29]</sup>。

另外, 在 T 细胞研究中, CRISPR-Cas9 技术筛选通过优化电穿孔克服了原代细胞编辑效率低的限制, 成功鉴定了 T 细胞受体 (TCR) 信号负调控成分及调节性 T 细胞 (Treg 细胞) 关键转录因子 (如 HIVEP2 和 SATB1), 推动了工程化 T 细胞疗法的发展<sup>[30]</sup>。同时, CRISPR-Cas9 技术在 T 细胞中的运用衍生出多种治疗方式。例如 CAR-T 细胞产品<sup>[31]</sup>和 TCR-T 细胞疗法。CRISPR-Cas9 技术通过多种操作使 CAR-T 细胞理论上无需个体化定制, 可以适用于更多患者, 实现对这些细胞的精确控制以保障治疗的安全性<sup>[32]</sup>; 还可以延迟 CAR-T 细胞的功能障碍发生, 为提高 CAR-T 细胞对实体瘤的杀伤能力提供了理论依据<sup>[33]</sup>。CRISPR-Cas9 技术能显著增加 TCR-T 细胞在临床治疗上的潜力<sup>[34]</sup>, 减少抑制性受体而增强 TCR-T 细胞的活性, 提高其对抗肿瘤的能力<sup>[35]</sup>; 它还使 TCR-T 细胞能够抵抗 TME 的抑制因素, 从而提高治疗效果<sup>[36]</sup>。

CRISPR-Cas9 技术支持大规模的癌症基因组筛选, 从而加速抗肿瘤药物的研发。最近, 有科研团队<sup>[8]</sup>运用全基因组 CRISPR-Cas9 技术筛选方法, 创建了一个新的癌症依赖基因数据库, 并且设计了一套用于识别潜在治疗靶点的基因评分体系。该团队在多种人类癌细胞中进行了 CRISPR-Cas9 技术筛选实验, 通过整合细胞适应性、基因组标记及药物作用靶点等信息, 确定了不同组织和遗传背景下的新型治疗位点。这一研究最终证实, 具有微卫星不稳定性特征的多种肿瘤类型都以 Werner 综合征 ATP 依赖性解旋酶 (Werner syndrome ATP-dependent helicase,

WRN) 作为合成致死性靶标<sup>[37]</sup>。

## 2.3 精准构建体内肿瘤模型

CRISPR-Cas9 技术可以用于构建小鼠的基因工程肿瘤模型, 为在不同物种及几乎所有的遗传背景下的肿瘤研究开辟了新的道路, 加速了体内肿瘤研究的进展<sup>[38-39]</sup>。此外, CRISPR-Cas9 技术也被用来构建多基因突变相关肿瘤模型, 例如先向人类肠道上皮的类器官中引入肿瘤抑制基因 APC、SMAD4 和 TP53 突变, 以及癌基因 KRAS 和 PIK3CA 突变后, 将表达全部 5 种突变的类器官移植到小鼠肾被膜下可以形成肿瘤<sup>[40]</sup>。该技术亦被用于敲除小鼠大脑中的多个基因, 包括转化相关蛋白 53 (Trp53)、神经纤维蛋白 1 (neurofibromatosis 1, Nf1), 以及磷酸酶和张力蛋白同源物 (phosphatase and tensin homolog, PTEN), 从而诱导胶质母细胞瘤和成神经管细胞瘤的发生<sup>[41]</sup>。类似的, 通过 CRISPR-Cas9 技术在小鼠造血干细胞中诱导表观遗传修饰因子、细胞因子、信号转导因子和转录因子基因的多重突变 (例如 Tet2、Runx1、Dnmt3a、Ezh2、Nf1 和 Smc3), 可以构建出携带复合遗传变异的急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 小鼠模型<sup>[42]</sup>。

基于体内模型的筛选体系进一步强化了 CRISPR-Cas9 技术的临床相关性。原位细胞植入模型和基因工程小鼠模型能更真实模拟 TME, 尤其适用于血管生成及免疫细胞互作研究<sup>[43-44]</sup>。人源肿瘤异种移植 (patient-derived xenograft, PDX) 模型能够保留肿瘤组织结构<sup>[45]</sup>, 结合 CRISPR-Cas9 技术筛选可发现难治癌症的新治疗靶点。例如, 利用包括 CRISPR-Cas9 在内的生物学技术在 PDX 模型中发现了结肠癌相关转录本 5 (colon cancer-associated transcript 5, CCAT5) 是胃癌潜在治疗靶点, 为开发针对 Wnt 信号高度活跃的胃癌的新疗法提供了理论依据<sup>[46]</sup>; 在 AML 的 PDX 模型中通过 CRISPR-Cas9 文库筛选可以发现 SLC5A3 和 MARCH5 为存活依赖基因, 靶向 MARCH5 可增强 BCL2 抑制剂疗效<sup>[47]</sup>; 在肝癌中通过 CRISPR-Cas9 激酶组文库筛选揭示了 EGFR 抑制剂与仑伐替尼 (lenvatinib) 在肝癌治疗中具有合成致死效应, 临床试验 (NCT04642547)<sup>[48]</sup>证实联合疗法对仑伐替尼耐药患者有效。

## 3 CRISPR-Cas9 技术临床应用局限性与主要挑战

在有效性和安全性方面, CRISPR-Cas9 技术的临床应用面临几个关键问题, 包括编辑后细胞活力受损、编辑效率低、递送系统不够高效, 以及潜在的脱靶效应等<sup>[49]</sup>。首先, CRISPR-Cas9 技术编辑后的细胞可能表现出一些缺陷, 例如增殖和分化能力下降等,

从而导致治疗效果不佳<sup>[50]</sup>。其次,在临床应用中良好的编辑效率尤为重要,编辑效率低下也可能会影响治疗效果。优化递送方式、提高sgRNA的设计质量和使用高效的Cas9变体等方法可以提高编辑效率。此外,递送方式的差异可能会影响编辑效率和安全性。因此,选择合适的递送方式,如应用脂质纳米颗粒、电穿孔或腺相关病毒载体,有望提高递送效率和安全性<sup>[51]</sup>。目前,由于其低免疫原性、高生物相容性和理想的载物能力,许多不同类型的纳米载体已被用于肿瘤治疗,包括聚合物、脂质、多孔硅、介孔二氧化硅纳米颗粒及金属有机框架等<sup>[52]</sup>。最后,潜在的脱靶效应可能导致不良的基因突变,引发细胞功能异常甚至细胞癌变。研究人员正在开发高保真Cas9变体、优化sgRNA设计以减少脱靶效应。另外,生物信息学工具也可以帮助预测和减少潜在的脱靶位点<sup>[53]</sup>,提高CRISPR-Cas9技术的安全性。

CRISPR-Cas9全基因组筛选凭借高灵敏度与低脱靶率成为筛选靶点的首选工具,其功能获得型(CRISPRa)与功能缺失型(CRISPRko、CRISPRi)双向筛选能力极大拓展了靶点发掘维度<sup>[54]</sup>。然而,该技术的应用仍然存在多方面的限制,包括原代细胞编辑效率受限、模型仍有一定局限性(如PDX模型中人类TME成分被小鼠基质替代且缺乏完整免疫系统<sup>[45]</sup>,原位瘤模型仍无法完全复现人类肿瘤的发展过程<sup>[43]</sup>),以及体内筛选技术复杂、成本高昂等。CRISPR-Cas9技术筛选通过多维度整合加速了靶点识别与临床转化,但需进一步优化原代细胞编辑并开发更贴近人体生理状态(如包含完整免疫系统)的肿瘤模型系统。

#### 4 结 语

历经十多年的研究,CRISPR-Cas9技术正在快速发展,从基础的基因编辑技术逐步变成了疾病治疗——特别是肿瘤生物治疗领域的重要工具,展现出广阔的应用前景。其在转录调控、表观遗传修饰、染色质成像及碱基编辑等多个领域的研究中发挥了重要作用。此外,CRISPR-Cas9技术正逐步改变疾病治疗方式。该技术结合全基因组测序和生物信息学分析,可以识别肿瘤的特异性突变,为个性化治疗提供支持,并且其作为一种基因编辑技术,可以辅助开发更高效的基因靶向修饰技术。CRISPR-Cas9技术同样适用于大规模的筛选工作。其在疾病模型构建、药物研发、药物作用靶点识别及临床前期研究等多个环节发挥关键作用。

CRISPR-Cas9技术在肿瘤生物治疗中的应用前景广阔,但也面临着多方面的挑战。通过持续的技

术创新和跨学科合作,CRISPR-Cas9技术有望在未来取得更多突破,为肿瘤患者带来更有效、更安全的治疗方案。

#### [参 考 文 献]

- [1] TAO R Y, HAN X P, BAI X, et al. Revolutionizing cancer treatment: enhancing CAR-T cell therapy with CRISPR/Cas9 gene editing technology[J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1354825. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1354825.
- [2] 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*, 2023, 11(1): 268-282. DOI: 10.1016/j.gendis.2023.02.027.
- [3] CHEN M J, MAO A W, XU M, et al. CRISPR-Cas9 for cancer therapy: opportunities and challenges[J]. *Cancer Lett*, 2019, 447: 48-55. DOI: 10.1016/j.canlet.2019.01.017.
- [4] LIU Z Q, SHI M X, REN Y Q, et al. Recent advances and applications of CRISPR-Cas9 in cancer immunotherapy[J]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 35. DOI: 10.1186/s12943-023-01738-6.
- [5] MAKAROVA K S, HAFT D H, BARRANGOU R, et al. Evolution and classification of the CRISPR-cassystems[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9(6): 467-477. DOI: 10.1038/nrmicro2577.
- [6] LIU H Y, WANG L, LUO Y Z. Blossom of CRISPR technologies and applications in disease treatment[J]. *Synth Syst Biotechnol*, 2018, 3(4): 217-228. DOI: 10.1016/j.synbio.2018.10.003.
- [7] HAZAFA A, MUMTAZ M, FAROOQ M F, et al. CRISPR/Cas9: a powerful genome editing technique for the treatment of cancer cells with present challenges and future directions[J]. *Life Sci*, 2020, 263: 118525. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118525.
- [8] XU X Y, LIU C, WANG Y H, et al. Nanotechnology-based delivery of CRISPR/Cas9 for cancer treatment[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021, 176: 113891. DOI: 10.1016/j.addr.2021.113891.
- [9] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821. DOI: 10.1126/science.1225829.
- [10] SILVERSTEIN R A, KIM N, KROELL A S, et al. Custom CRISPR-Cas9 PAM variants *via* scalable engineering and machine learning [J]. *Nature*, 2025, 643(8071): 539-550. DOI: 10.1038/s41586-025-09021-y.
- [11] ROIDOS P, SUNGALEE S, BENFATTO S, et al. A scalable CRISPR/Cas9-based fluorescent reporter assay to study DNA double-strand break repair choice[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4077. DOI: 10.1038/s41467-020-17962-3.
- [12] MARTINEZ-LAGE M, PUIG-SERRA P, MENENDEZ P, et al. CRISPR/Cas9 for cancer therapy: hopes and challenges[J]. *Biomedicines*, 2018, 6(4): 105. DOI: 10.3390/biomedicines6040105.
- [13] WANG S W, GAO C, ZHENG Y M, et al. Current applications and future perspective of CRISPR/Cas9 gene editing in cancer[J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 57. DOI: 10.1186/s12943-022-01518-8.
- [14] PEREZ-PINERA P, KOCAK D D, VOCKLEY C M, et al. RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors[J]. *Nat Methods*, 2013, 10(10): 973-976. DOI: 10.1038/nmeth.2600.
- [15] 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.
- [16] TZELEPIS K, KOIKE-YUSA H, DE BRAEKELEER E, et al. A CRISPR dropout screen identifies genetic vulnerabilities and therapeutic targets in acute myeloid leukemia[J]. *Cell Rep*, 2016, 17(4): 1193-1205. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.09.079.
- [17] LIU Y C, ZENG Y Y, LIU L, et al. Synthesizing AND gate genetic circuits based on CRISPR-Cas9 for identification of bladder cancer cells[J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 5393. DOI: 10.1038/ncomms6393.
- [18] BAKTHAVACHALAM V, SANBORN M A, MATHAYAN M, et al. CRISPR/Cas9-mediated deletion of MADD induces cell cycle arrest and apoptosis in anaplastic thyroid cancer cells[J]. *Sci Rep*, 2025, 15(1): 39264. DOI: 10.1038/s41598-025-22907-1.
- [19] GU Q L, MA Z J, WANG Q Y, et al. Knockout of Shcbl1 sensitizes immunotherapy by regulating  $\alpha$ -SMA positive cancer-associated fibroblasts[J]. *Mol Carcinog*, 2024, 63(4): 601-616. DOI: 10.1002/mc.23675.
- [20] VALLETTA S, DOLATSHAD H, BARTENSTEIN M, et al. ASXL1 mutation correction by CRISPR/Cas9 restores gene function in leukemia cells and increases survival in mouse xenografts[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(42): 44061-44071. DOI: 10.18632/oncotarget.6392.
- [21] AUBREY B J, KELLY G L, KUEH A J, et al. An inducible lentiviral guide RNA platform enables the identification of tumor-essential genes and tumor-promoting mutations *in vivo*[J]. *Cell Rep*, 2015, 10(8): 1422-1432. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.02.002.
- [22] WANG H L, GUO M, WEI H D, et al. Targeting MCL-1 in cancer: current status and perspectives[J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 67. DOI: 10.1186/s13045-021-01079-1.
- [23] KRALL E B, WANG B, MUNOZ D M, et al. KEAP1 loss modulates sensitivity to kinase targeted therapy in lung cancer[J]. *eLife*, 2017, 6: e18970. DOI: 10.7554/eLife.18970.
- [24] PATEL S J, SANJANA N E, KISHTON R J, et al. Identification of essential genes for cancer immunotherapy[J]. *Nature*, 2017, 548(7669): 537-542. DOI: 10.1038/nature23477.
- [25] LIU T, LI Z H, ZHANG Q, et al. Targeting ABCB1 (MDR1) in multi-drug resistant osteosarcoma cells using the CRISPR-Cas9 system to reverse drug resistance[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(50): 83502-83513. DOI: 10.18632/oncotarget.13148.
- [26] TANG H B, SHRAGER J B. CRISPR/Cas-mediated genome editing to treat EGFR-mutant lung cancer: a personalized molecular surgical therapy[J]. *EMBO Mol Med*, 2016, 8(2): 83-85. DOI: 10.15252/emmm.201506006.
- [27] DATLINGER P, RENDEIRO A F, SCHMIDL C, et al. Pooled CRISPR screening with single-cell transcriptome readout[J]. *Nat Meth*, 2017, 14(3): 297-301. DOI: 10.1038/nmeth.4177.
- [28] DOENCH J G. Am I ready for CRISPR A user's guide to genetic screens[J]. *Nat Rev Genet*, 2018, 19(2): 67-80. DOI: 10.1038/nrg.2017.97.
- [29] DHAINAUT M, ROSE S A, AKTURK G, et al. Spatial CRISPR genomics identifies regulators of the tumor microenvironment[J]. *Cell*, 2022, 185(7): 1223-1239.e20. DOI: 10.1016/j.cell.2022.02.015.
- [30] SCHUMANN K, RAJU S S, LAUBER M, et al. Functional CRISPR dissection of gene networks controlling human regulatory T cell identity [J]. *Nat Immunol*, 2020, 21(11): 1456-1466. DOI: 10.1038/s41590-020-0784-4.
- [31] CHEN X Y, ZHONG S H, ZHAN Y H, et al. CRISPR-Cas9 applications in T cells and adoptive T cell therapies[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2024, 29(1): 52. DOI: 10.1186/s11658-024-00561-1.
- [32] LI C G, MEI H, HU Y. Applications and explorations of CRISPR/Cas9 in CAR T-cell therapy[J]. *Brief Funct Genomics*, 2020, 19(3): 175-182. DOI: 10.1093/bfgp/elz042.
- [33] GOOD C R, AZNAR M A, KURAMITSU S, et al. An NK-like CAR T cell transition in CAR T cell dysfunction[J]. *Cell*, 2021, 184(25): 6081-6100.e26. DOI: 10.1016/j.cell.2021.11.016.
- [34] SCHUMANN K, LIN S, BOYER E, et al. Generation of knock-in primary human T cells using Cas9 ribonucleoproteins[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(33): 10437-10442. DOI: 10.1073/pnas.1512503112.
- [35] REN J T, LIU X J, FANG C Y, et al. Multiplex genome editing to generate universal CAR T cells resistant to PD1 inhibition[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(9): 2255-2266. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1300.
- [36] MAUS M V, HAAS A R, BEATTY G L, et al. T cells expressing chimeric antigen receptors can cause anaphylaxis in humans[J]. *Cancer Immunol Res*, 2013, 1(1): 26-31. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0006.
- [37] BEHAN F M, IORIO F, PICCO G, et al. Prioritization of cancer therapeutic targets using CRISPR-Cas9 screens[J]. *Nature*, 2019, 568(7753): 511-516. DOI: 10.1038/s41586-019-1103-9.
- [38] BIRLING M C, HERAULT Y, PAVLOVIC G. Modeling human disease in rodents by CRISPR/Cas9 genome editing[J]. *Mamm Genome*, 2017, 28(7/8): 291-301. DOI: 10.1007/s00335-017-9703-x.
- [39] BIRLING M C, SCHAEFFER L, ANDRÉ P, et al. Efficient and rapid generation of large genomic variants in rats and mice using CRISMERE[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 43331. DOI: 10.1038/srep43331.
- [40] MATANO M, DATE S, SHIMOKAWA M, et al. Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids[J]. *Nat Med*, 2015, 21(3): 256-262. DOI: 10.1038/nm.3802.
- [41] ZUCKERMANN M, HOVESTADT V, KNOBBE-THOMSEN C B, et al. Somatic CRISPR/Cas9-mediated tumour suppressor disruption enables versatile brain tumour modelling[J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 7391. DOI: 10.1038/ncomms8391.
- [42] HECKL D, KOWALCZYK M S, YUDOVICH D, et al. Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing[J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(9): 941-946. DOI: 10.1038/nbt.2951.
- [43] MILLER F R, MEDINA D, HEPPNER G H. Preferential growth of mammary tumors in intact mammary fatpads[J]. *Cancer Res*, 1981, 41(10): 3863-3867.
- [44] ERSTAD D J, SOJODI M, TAYLOR M S, et al. Orthotopic and heterotopic murine models of pancreatic cancer and their different responses to FOLFIRINOX chemotherapy[J]. *Dis Models Mech*, 2018, 11(7): dmm034793. DOI: 10.1242/dmm.034793.
- [45] TENTLER J J, TAN A C, WEEKES C D, et al. Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2012, 9(6): 338-350. DOI: 10.1038/nrclinonc.2012.61.
- [46] LIU C C, SHEN A W, SONG J Q, et al. LncRNA-CCAT5-mediated crosstalk between Wnt/ $\beta$ -Catenin and STAT3 signaling suggests novel therapeutic approaches for metastatic gastric cancer with high

- Wnt activity[J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2024, 44(1): 76-100. DOI: 10.1002/cac2.12507.
- [47] LIN S, LARRUE C, SCHEIDEGGER N K, et al. An *in vivo* CRISPR screening platform for prioritizing therapeutic targets in AML[J]. *Cancer Discov*, 2022, 12(2): 432-449. DOI: 10.1158/2159-8290.cd-20-1851.
- [48] JIN H, SHI Y, LV Y, et al. EGFR activation limits the response of liver cancer to lenvatinib[J]. *Nature*, 2021, 595(7869): 730-734. DOI: 10.1038/s41586-021-03741-7.
- [49] SELVAKUMAR S C, PREETHI K A, ROSS K, et al. CRISPR/Cas9 and next generation sequencing in the personalized treatment of cancer[J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 83. DOI: 10.1186/s12943-022-01565-1.
- [50] ZHANG C, QUAN R F, WANG J F. Development and application of CRISPR/Cas9 technologies in genomic editing[J]. *Hum Mol Genet*, 2018, 27(R2): R79-R88. DOI: 10.1093/hmg/ddy120.
- [51] DEVER D P, BAK R O, REINISCH A, et al. CRISPR/Cas9  $\beta$ -globin gene targeting in human haematopoietic stem cells[J]. *Nature*, 2016, 539(7629): 384-389. DOI: 10.1038/nature20134.
- [52] PARRA-NIETO J, DEL CID M A G, DE CÁRCER I A, et al. Inorganic porous nanoparticles for drug delivery in antitumoral therapy[J]. *Biotechnol J*, 2021, 16(2): e2000150. DOI: 10.1002/biot.202000150.
- [53] JIANG C Y, MENG L X, YANG B J, et al. Application of CRISPR/Cas9 gene editing technique in the study of cancer treatment[J]. *Clin Genet*, 2020, 97(1): 73-88. DOI: 10.1111/cge.13589.
- [54] YU J S L, YUSA K. Genome-wide CRISPR-Cas9 screening in mammalian cells[J]. *Methods*, 2019, 164/165: 29-35. DOI: 10.1016/j.ymeth.2019.04.015.
- [收稿日期] 2025-07-27 [修回日期] 2025-11-25  
[本文编辑] 党瑞山