

· 肿瘤研究与诊疗前沿交叉技术 ·

DOI:10.16262/j.cnki.1000-8217.20250227.001

基因编辑在肿瘤相关动物模型构建和 CART 治疗中的应用*

李大力** 朱一凡 国昊哲

华东师范大学 生命科学学院, 上海 200241

[摘要] 基于第 373 期双清论坛“临床问题驱动的肿瘤研究新范式”会议内容, 本文列举了基因编辑相关技术的发展历程和基本原理、肿瘤相关动物模型的构建以及基因编辑对这一领域所发挥的促进作用, 并概述了其在嵌合抗原受体 T 细胞疗法(CART)治疗中的应用。基因编辑技术自 20 世纪 90 年代起历经多次革新, 从早期的巨型核酸酶、锌指核酸酶(ZFN)和转录激活因子样效应核酸酶(TALEN), 逐步发展为以 CRISPR-Cas 系统为核心的各类编辑工具。通过 CRISPR 系统可以实现自发性肿瘤动物模型的构建和肿瘤治疗靶点的筛选。另外, 基因编辑技术显著推动了 CART 疗法的优化, 通过敲除特定基因, 能够增强 CART 疗法的安全性、有效性和通用性。综上, 基因编辑技术在肿瘤模型构建及治疗领域具有广阔的应用前景。

[关键词] 基因编辑; 肿瘤; 动物模型; CART

1 基因编辑技术概述

基因编辑技术是对生物体遗传物质进行有针对性的精准修改, 探索和理解生物学基础问题所需要的基础工具, 也是进行基因诊疗、精准育种、动物模型构建等的重要手段。迄今为止, 科研人员先后开发了巨型核酸酶(Meganuclease)、锌指核酸酶(Zinc-finger Nuclease, ZFN)、转录激活因子样效应核酸酶(Transcription Activator Like Effector Nuclease, TALEN)、和以 CRISPR-Cas(Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats, CRISPR; CRISPR-associated Protein, Cas)为代表的 4 类可用于基因编辑的核酸酶, 实现了对基因组特定序列的识别和切割。

作为限制性内切酶的巨型核酸酶能够高度特异地识别和切割长度在 14~40 个碱基对的 DNA 序

列, 因此可以用来替换、删除或修饰基因组序列。通过蛋白质工程诱变和高通量筛选的方法可产生识别特定序列的巨型核酸酶。ZFN 则是 Fok I 核酸内切酶的 DNA 切割结构域与锌指 DNA 结合域融合之后得到的人工蛋白。其中锌指 DNA 结合域中具有可识别 DNA 三联体的 $\beta\beta\alpha$ 重复模体(Motif), 通过改变单个模体中的特定氨基酸(Amino Acid, aa)残基可改变其识别 DNA 的特异性, 并且可以通过串联多个识别不同 DNA 三联体的锌指 DNA 结构域而靶向不同的基因组序列^[1]。FokI 核酸内切酶负责切割双链 DNA 的一条链, 因此需要设计一对 ZFN 形成二聚体以实现 DNA 双链断裂(double-strand break, DSB)^[1]。作为与 ZFN 有着类似结构组成的融合蛋白, TALEN 则利用源自植物病原菌转录激活因子样效应因子(Transcription Activator

收稿日期: 2025-01-20; 修回日期: 2025-02-22

* 本文根据国家自然科学基金委员会第 373 期“双清论坛”讨论的内容整理。

** 通信作者, Email: dlli@bio.ecnu.edu.cn

本文受到国家自然科学基金项目(32025023, 32230064, 32311530111)的资助。

引用格式: 李大力, 朱一凡, 国昊哲. 基因编辑在肿瘤相关动物模型构建和 CART 治疗中的应用. 中国科学基金, 2025, 39(1): 144—152.
Li DL, Zhu YF, Guo HZ. Application of gene editing in the construction of tumor-associated animal models and CART treatment. Bulletin of National Natural Science Foundation of China, 2025, 39(1): 144-152. (in Chinese)

Like Effector, TALE) 中高度保守的一系列重复序列作为 DNA 结合结构域, 这些重复序列中的特定氨基酸残基和 DNA 靶标中的单个碱基对之间存在一对一的特定识别关系。因为也是利用 FokI 核酸酶去切割被 TALE 识别的靶点, 所以同样需要一对 TALENs 去实现有效的基因编辑^[1]。尽管上述的基因编辑技术为科学研究和临床治疗做出了巨大的贡献, 但都存在费时费力, 且编辑效率相对较低的缺陷, 所以当利用非编码 RNA 靶向 DNA 或 RNA 的 CRISPR-Cas 系统被证明可用于基因编辑之后, 便因其简单、高效、低成本等优点迅速成为学术研究和实际应用中主流的基因编辑工具^[2,3]。

这一类存在于细菌和古菌中的获得性免疫防御系统由 CRISPR 序列和 Cas 蛋白组成。CRISPR 序列由一系列重复的宿主自身基因组序列 (repeat) 和夹在其中的不同外源 DNA 片段 (spacer) 组成, 每一个 spacer 夹在两段 repeat 中。这一序列在转录加工为成熟的 CRISPR RNA (crRNA) 之后可以检测与其互补配对的 DNA/RNA, 并触发与之相结合的 Cas 蛋白的核酸酶活性, 降解包括噬菌体在内的外源核酸元件。根据生物信息学和实验数据整个系统被分为两大类: 1 类系统 (class 1 system) 绝大部分是由多蛋白亚基多拷贝的 Cas 蛋白与一条 crRNA 序列组成, 包括 I 型和 III 型, 以及尚未详细研究的 IV 型系统; 而常用于基因编辑的 Cas9、Cas12 和 Cas13 则属于 2 类系统 (class 2 system), 通过单一蛋白与 crRNA 的结合发挥免疫防御作用。以 CRISPR/Cas9 为例, Cas9 通过识别 PAM (Protospacer-adjacent Motif) 并通过碱基互补配对实现靶基因的编辑。PAM 指的是与目标 DNA 序列相邻的一小段 DNA 序列, 通常为 3~5 个碱基, 用于识别外源核酸序列。具体来说, Cas9 在结合 crRNA 序列之后发生蛋白构象重排, 负责识别 PAM 序列的氨基酸残基暴露并寻找 DNA 靶点中非互补链 3' 端可能存在的 NGG PAM, 如能形成稳定的蛋白-核酸相互作用则 crRNA 开始与外源核酸序列进行互补配对。实现 crRNA-DNA 完全配对之后, Cas9 蛋白利用其高度保守的 HNH 结构域切割与 crRNA 互补的 DNA 序列, RuvC 切割非互补的 DNA 序列, 最终在 PAM 上游 3 或 4 bp 处形成平双链断裂 (Double Strand Break, DSB)^[4,5]。上述过程还需要反式激活 CRISPR RNA (Trans-activating crRNA, tracrRNA) 与 crRNA 形成一个部分配对的双链结构稳定整个蛋白核酸复合物, 最终实现 Cas9 切割靶点 DNA^[5]。

在随后的深入研究中, 科研人员通过 4 个核糖核苷酸 (5'-GAAA-3') 的铰链结构将 crRNA 和 tracrRNA 融合成单一的向导 RNA 序列 (single guide RNA, sgRNA), 这一设计进一步简化了 Cas9 系统^[4], 并发现只需 20 nt (nucleotide) 的 crRNA 就可以有效地介导 Cas9 切割 DNA, 且可通过改变 crRNA 的序列组成使这一系统能够识别任何 DNA 靶点^[6]。更重要的突破则是利用 *Streptococcus pyogenes* 和 *S. thermophilus* Cas9 在真核细胞中进行了成功的基因编辑^[4]。

CRISPR/Cas9 的巨大成功促使众多科研团队深入研究其他 2 类系统, 探索它们的基因编辑潜力。Koonin 和张锋的联合团队在 2015 年报道了 V 型 CRISPR-Cas 系统^[5]。这一系统也是多结构域的单蛋白系统, 通过 PAM 去识别外源核酸序列随后利用 crRNA 介导切割, 但与 Cas9 相比有着如下的差异: (1) PAM 序列位于外源核酸序列的 5' 端, 且多富含胸腺嘧啶; (2) 并不是每一个亚型都需要 tracrRNA; (3) 除了降解双链 DNA, 某些亚型还可降解单链 DNA 或 RNA, 并可随机降解游离的单链核酸而造成附带损伤 (Collateral Damage); (4) 各亚型之间除了一个高度保守的 RuvC 状结构域之外的氨基酸序列相似程度较低, 且分子量存在明显差异^[5]。通过生物信息学预测和实验验证, V 型系统已从最初报告的 V-I Cas12a (最初称为 Cpf1)、Cas12b (C2c1) 和 Cas12c (C2c3) 系统, 扩展到目前的 Cas12s 亚型^[7]。V 型系统的多样性使这一系统得到了充分深入的研究, 并衍生出不同类型的基因编辑工具。

上述的 Cas9 和 Cas12 作为序列特异性核酸酶, 在实现高效精准的 DNA 双链切割之后, 还需要激活细胞体内的非同源末端连接 (Non-homologous End Joining, NHEJ) 或同源重组 (Homologous Recombination, HR) DNA 修复途径, 实现目标位点序列的改变^[8]。然而, NHEJ 的修复结果通常会生成少量碱基的插入或缺失 (Insertions/Deletions, Indels), 难以产生预期的编辑类型。而通过 HR 修复虽然可以实现精确碱基或片段的靶向置换, 但较低的编辑效率仍然是一个有待克服的瓶颈问题。除此之外, 有研究表明 Cas9 引起的 DSB 可能引起大片段缺失易位和基因组不稳定等潜在风险, 也使人们对于其在人体应用中的安全性产生担忧^[9]。为了解决以上技术缺陷, 2016 年, Liu 课题组开发了碱基编辑器 (Base Editors, BE)。碱基编辑器主要是由不同的碱基脱氨酶与 Cas9 缺口酶 (Cas9 Nickase,

Cas9n)融合构建而成,主要包括与 APOBEC 等胞嘧啶脱氨酶融合催化 C>T 碱基转换的胞嘧啶碱基编辑器(Cytosine Base Editor,CBE)^[10]、与经过进化的 TadA 腺嘌呤脱氨酶融合催化 A>G 碱基转换的腺嘌呤碱基编辑器(Adenine Base Editor,ABE),此外还有一系列碱基颠换新工具^[11-13]。这一技术的原理是当碱基编辑器与目标序列结合后,Cas9n 将 PAM 附近的双链 DNA 解螺旋打开,sgRNA 与解旋的靶向链 DNA 进行配对形成 R-loop,同时暴露出与靶点序列互补的非靶向链,使其在远离 PAM 的位置呈单链 DNA(Single Strand,ssDNA)状态。融合的脱氨酶利用此 ssDNA 为底物,实现对特定位置碱基的脱氨反应,分别形成尿嘧啶(Uracil,U)和肌苷(Inosine,I)。当 U 形成后,会激活细胞中的尿嘧啶碱基切除修复途径(BER),首先利用 DNA 糖苷酶识别和切割 U·G 错配中尿嘧啶和磷酸骨架之间的糖苷键,形成无嘌呤无嘧啶位点(AP site),随后该修复途径会在 AP 位点对单链 DNA 进行切割,并以互补链上的 G 为模板重新修复为 C 或其他任意碱基(较低发生概率),引起 C 到 A 或 T、G 的碱基变化。通过在 CBE 中额外融合尿嘧啶糖基化酶

抑制因子(UGI),实现将 U 保留在 DNA 链中,这样靶向链被 Cas9n 切开后便会激活体内的错配修复,并以发生脱氨反应的非靶向链为模板,在 DNA 聚合酶作用下实现 U·A 配对,从而完成特异的 C>T 碱基转换(图 1)。相比之下,肌苷在 DNA 层面会被当作 G 修复,由于目前尚未在细胞中发现高活性的“次黄嘌呤糖苷酶”,因此不会发生对 I 的切除,所以 ABE 有着较高精度和效率的 A>G 编辑(图 2)。

由于 CBE 和 ABE 只能实现碱基之间的转换,不能实现碱基间的颠换(transversion)及精确的插入、替换和删除,所以 2019 年,David Liu 课题组又研发出了能够实现“搜索和替换”的引导编辑系统(Prime Editor,PE),通过全新的技术路径实现了能够在无 DNA 供体模板和 DNA 双链断裂的情况下诱导小规模的基因改变,如插入、删除以及所有 12 种类型碱基到碱基转换及其组合等(图 3)。引导编辑器主要由两部分组成:融合了逆转录酶(Rreverse Transcriptase,RT)的 Cas9n(H840A)和引导编辑向导 RNA(Prime Editing Guide RNA,pegRNA),pegRNA 的 3'端含有 PBS(Primer Binding Site)序

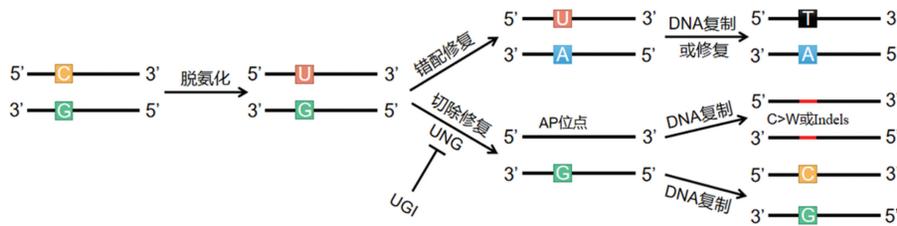


图 1 CBE 工作机制
Fig. 1 Working Mechanism of CBE

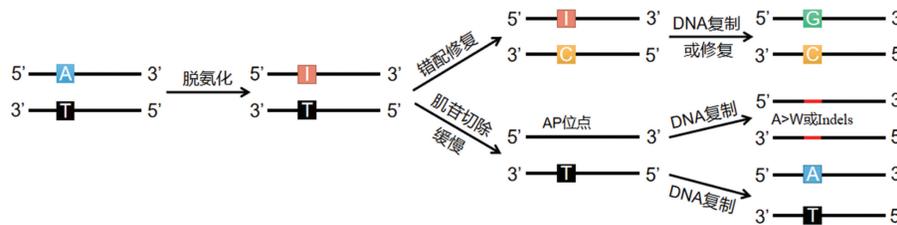


图 2 ABE 工作机制
Fig. 2 Working Mechanism of ABE

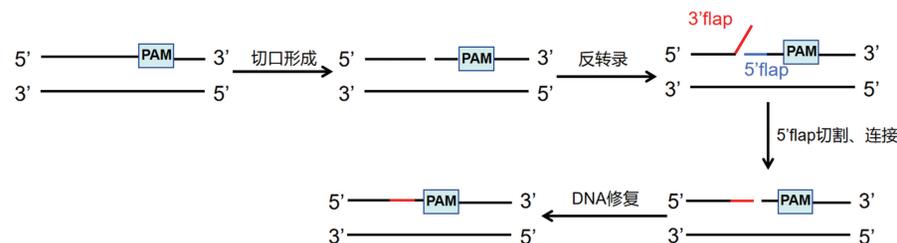


图 3 PE 工作机制
Fig. 3 Working Mechanism of PE

列和 RT 模板。其工作原理为 PE-pegRNA 复合物首先识别 PAM 序列结合并切割靶 DNA 链, 随后 PBS 与暴露出的非靶标链的编辑位点序列结合, RT 模板所包含的编辑信息合成新的 DNA, 在 DNA 断裂处形成被称为 3' flap 的单链结构。逆转录反应结束后, 含有突变的 3' flap 与未编辑的 5' flap 结合处于动态平衡之中。5' flap 经过切割、连接以及 DNA 修复可实现靶点处稳定的基因编辑。通过融合蛋白与 pegRNA 的共同作用, 可以在不引入外源 DNA 模板, 不产生双链 DNA 断裂的情况下将需要的 DNA 信息直接编辑至靶点。通过与同源重组技术和碱基编辑技术的比较发现, PE 在精准编辑方面更有潜力^[14-16], 但是如何解决 PE 设计复杂、在某些位点编辑效率低下、编辑范围受编辑窗口大小影响等问题是这一系统实现广泛应用的前提。

2 动物模型构建方法

在生命和医学领域的研究中, 动物模型可提供与人类相似的生理或行为特征, 在遗传学和免疫学研究、疾病机制的研究、药物的开发与测试等方面发挥着重要的作用。在早期, 动物模型的构建主要依赖于手术、药物处理和自然突变等传统方法。例如去势法构建大鼠骨质疏松模型以及使用糖皮质激素诱导骨质疏松症模型^[17,18]。但传统构建动物模型的手段十分有限, 干细胞和组织工程技术的发展为更加有效地构建动物模型提供了可能。ES 打靶技术 (Embryonic Stem Cell Targeting Technology), 也被称为胚胎干细胞打靶技术, 其基于 ES 细胞和 DNA 同源重组技术, 能够将外源 DNA 定点整合到 ES 细胞基因组内, 再将遗传修饰的 ES 细胞引入受体胚胎内部从而获得目的动物模型。早在 1989 年就通过该技术构建了次黄嘌呤磷酸核糖转移酶 (Hprt)、 β 2-微球蛋白基因敲除的小鼠^[19,20]。自此之后, ES 打靶技术构建动物模型的方法被业界广泛应用。但这一技术一直存在构建周期长的缺陷, 平均在 9~12 个月, 甚至更久, 同时构建打靶载体困难, 打靶成功率较低, 这些均限制了该技术更广泛的应用。上世纪 90 年代第一代基因编辑工具 ZFN 的问世使得一些动物模型的构建更加容易。比如借助这一工具构建了大鼠的免疫球蛋白 M 或 Rab38 基因敲除模型^[21]。随后又有不同的团队使用 ZFN 敲除了猪内源性 PPAR γ 基因和山羊 β -乳球蛋白基因^[22]。这些工作展示了 ZFN 构建动物模型的潜力。随着技术的进步, 与 ZFN 相比设计和构建过程

都要更加便捷的 TALENs 开始崭露头角, 被广泛用于包括小鼠、牛、猪在内的各种动物模型的构建。2013 年, 科研人员将 TALENs 的 mRNA 直接注射到小鼠的受精卵或胚胎中诱导基因突变, 实现了各基因 F0 代小鼠 13%~76.9% 的突变率^[23,24]。而在一些家畜受精卵中直接注射 mRNA 敲除靶向基因最高能够达到 75% 的编辑效率^[25]。

相比上述的 ZFN 和 TALEN 技术, CRISPR/Cas9 系统有更加显著的优点: sgRNA 设计简单, 合成价格低廉, 几乎能特异性地靶向整个基因组 DNA, 因此利用这一技术可更加省时简单地构建所需的动物模型。2013 年, 多个实验室报道了利用 CRISPR/Cas9 系统对小鼠和兔子进行有效且位点特异地基因修饰, 表明其在基因工程动物模型构建中的潜在应用^[26-29]。此后, 这项技术被广泛运用于包括肿瘤疾病模型在内的各类动物模型的构建。例如利用这一技术系统在细胞中诱导特定的染色体重排构建了 *Eml4-Alk* 基因突变的肺癌小鼠模型^[30]。Jan Gronych 实验室则利用这一技术在新生小鼠或 *Trp53* 基因敲除小鼠中靶向 *Pich1* 基因, 成功诱导了与人类 SHH 亚型髓母细胞瘤相似的肿瘤, 随后又通过在特定小鼠品系的前脑室区同时递送针对 *Nf1*、*Trp53* 和 *Pten* 基因的 sgRNA 和 Cas9, 成功诱导了与人类胶质母细胞瘤相似的高侵袭性肿瘤^[31]。

对于由单碱基突变所导致的疾病, 可通过 CRISPR/Cas9 衍生的碱基编辑器 (base editor, BE) 构建对应的疾病动物模型。比如通过 CBE3 系统编辑小鼠受精卵, 获得了杜氏肌营养不良症 (DMD) 模型和白化病模型^[32]; 或分别使用 ABE7.10 和 CBE3 在兔子基因组中引入单碱基替换, 构建包括双肌病表型、人眼白化病 (OA) 和眼皮肤白化病 (OCA) 表型、Hutchinson-Gilford 早老症 (HGPS) 表型和 X 连锁扩张型心肌病 (XLCM) 表型在内的多种疾病兔模型^[33]; 以及利用 ABE 对小鼠、兔、猴等多种动物模型的不同基因进行单碱基编辑, 研究融合不同腺嘌呤脱氨酶的 ABE 工具的编辑效率、编辑窗口范围、体内多靶点同时敲除的精确性等重要问题^[34,35]。以 CRISPR/Cas9 为代表的基因编辑技术的出现和发展使得动物模型构建高效且精准, 将部分疾病动物模型的构建时间缩短至几周到数月, 加速了对这些疾病的研究。

3 肿瘤动物模型的建立及应用

肿瘤动物模型已经成为理解肿瘤发生发展过程

中相关基因功能以及进行临床前研究的一个核心方法^[36-38]。虽然皮下荷瘤模型具有成本低、实验周期短、易于操作和重复性好等优点,但这种移植模型通常是通过皮下注射肿瘤细胞建立的,与原发部位的原始肿瘤微环境不同,导致其发展和进展明显偏离实际疾病发作情况。因此,在体内模拟实际肿瘤发展情况成为了肿瘤研究领域的重中之重。通过 CRISPR/Cas9 基因编辑系统构建各种肿瘤动物模型,可有效帮助科研人员理解和探索对应的发病机制和潜在疗法。具体来说即为利用质粒、腺相关病毒(Adeno-associated Virus, AAV)、慢病毒或纳米颗粒等递送工具,通过 sgRNA 引导 Cas9 靶向原癌基因或抑癌基因,实现包括肺、胰腺、结直肠、肝、大脑在内的各类器官的组织特异性的在体基因编辑,快速构建特定器官的肿瘤模型^[36]。比如将表达 sgRNA 和 Cas9 的质粒通过静脉注射的方式直接靶向肝脏的肿瘤相关基因 *Pten* 和 *Trp53* (p53),构建小鼠自发肝癌模型^[39]。*Pten* 蛋白作为 PI3K/Akt 信号通路的负调控因子,该蛋白所对应的基因也是重要的抑癌基因,在许多人类癌症中都检测到了 *Pten* 基因的缺失和突变^[40]。而 *Trp53* 是人类癌症中最常见的肿瘤抑制基因,在细胞周期调控中起着重要作用^[41]。将靶向 *Pten* 和 *Trp53* 的 sgRNA 以及 Cas9 共同构建至 pX330 质粒上,通过尾静脉注射使质粒在肝脏中富集,并进入肝细胞内表达而敲除这两个基因,从而导致了肿瘤的发生。这是首次通过使用 CRISPR/Cas9 系统在成年动物中产生体细胞癌突变而构建的肿瘤模型。除了靶向肝肿瘤的动物模型构建,科研人员开展了基于慢病毒载体,以肺癌模型为代表的、非肝脏肿瘤的基因编辑动物构建^[42]。通过慢病毒载体感染 *Kras*^{LSL-G12D/+} *P53*^{fl/fl} 小鼠,递送包含 CRISPR 系统和 Cre 重组酶系统的 pSECC。其中 CRISPR/Cas 系统敲除了 *Pten*、*APC*、*NKX2-1* 抑癌基因,Cre-Loxp 系统敲入功能获得性突变的原癌基因 *KRas*^{G12D/+} 并且敲除 p53。通过多重基因的敲除或敲入,成功构建肺癌小鼠模型。而张锋实验室将靶向 *Kras*、p53 和 *Lkb1* 基因的 sgRNA,Cre 重组酶基因以及萤光素酶报告基因构建到 AAV 载体中,随后将其导入条件性表达 Cas9 的小鼠中,从而实现对小鼠抑癌基因的敲除。在这项研究中,研究人员使用了气管导入的方式将 AAV 载体递送到肺中,构建肺癌模型。肺部 CT 的结果显示小鼠肺部出现肿瘤^[43]。

CRISPR/Cas 系统不仅能够构建经典的肿瘤动

物模型,还能够构建类器官肿瘤模型,比如反映肿瘤发生发展真实情况的 PDXO 模型。这是一类以 PDX 肿瘤组织为基础开发而来的体外肿瘤类器官 (organoid) 模型。由于它是从病人体内直接获取的肿瘤在基质胶和富含生长因子的培养基中进行 3D 培养得到的,因此这种肿瘤模型可以做到与患者原发肿瘤保持一致。利用 CRISPR/Cas 系统对正常小鼠来源的肠类器官进行基因编辑,敲除 APC、P53、SMAD4,同时定点引入 *KRAS*^{G12D} 成功构建了对应的 PDXO^[9]。这使得通过正常的组织器官出发构建 PDXO 这一方案成为了可能,有利于后续的药物筛选及个性化医疗。科研人员也利用 PE 可实现小片段插入与删除的特点,开发了 Cre 诱导的 PE 系统,在小鼠体内快速构建了肺癌模型,并将 PE 编辑过的胰腺类器官移植到免疫能力正常的小鼠体内,模拟胰腺癌的发展^[44]。

总体而言,构建 CRISPR/Cas 或衍生系统 (sgRNA、Cas9、Cre 的组合) 载体,利用尾静脉注射或其他方式递送到野生型或转基因小鼠 (如 Flox 小鼠或 Cas9 小鼠) 的相关器官或组织中,实现对抑癌基因、原癌基因、其他调控因子或元件的操控,从而构建肿瘤相关模型,并利用这些动物模型开展临床前研究。比如通过黑色素瘤小鼠模型,研究具有 PD-1 和 TIM3^{high} 表型的肿瘤浸润性 CAR-T 细胞与 *TOX*、*NR4A1*、*NR4A2* 和 *NR4A3* 基因表达之间的关系^[45,46]。或是利用肿瘤动物模型小鼠模型的数据明确表明 TCF1⁺PD-1⁺CD8⁺ T 细胞是肿瘤中衰竭的 CD8⁺ T 细胞的前体^[47-49]。

4 基于基因编辑的肿瘤治疗靶点筛选

CRISPR/Cas9 基因编辑技术在癌症研究方面的重要作用除了构建相关的疾病动物模型,还体现在其广泛用于筛选肿瘤靶点。这种筛选使用靶向基因组不同基因的 sgRNA,系统性地敲除不同肿瘤细胞系或类器官中的基因,观察和分析特定的基因敲除对癌细胞表型或特定药物的反应。

2017 年发表于 *Nature* 的一项研究利用 AAV 方式将 Cas9 蛋白与 sgRNA 文库同时递送进入模型小鼠,利用体内筛选的方式研究不同基因在星形胶质母细胞瘤 (Glioblastoma Multiforme, GBM) 发生中的功能。通常认为 GBM 起源于星形胶质细胞,因此作者选用了能够在星形胶质细胞中条件性表达 Cas9 和 GFP 的 Rosa26-LSL-Cas9 小鼠作为体内筛选的动物模型。通过 AAV 将 CRISPR/Cas9

文库导入小鼠体内,研究 GBM 产生不同突变后对替莫唑胺的耐药性以及分别利用活细胞和死细胞分析不同突变对于肿瘤的的必要性和致死性^[50]。结果表明,*Nf1* 型突变 GBM 中通常伴随着 *B2m* 和 *Mll3* 的突变,而 *Rb1* 型突变 GBM 中通常伴随着 *Zc3h13* 和 *Pten* 的突变,这类突变增强了肿瘤对替莫唑胺的抵抗^[50]。类似的另一项研究则发现除了敲除 *B2M* 基因,敲除 *FAS* 基因也会使得异体 CAR-T 的免疫排斥作用降低^[51]。随着 CRISPR 衍生技术的成熟,研究者们除了采用上述方法去敲除肿瘤相关基因,也开始利用基于 CRISPR 的干扰 (CRISPRi) 或激活技术 (CRISPRa) 构建筛选文库在细胞和动物水平对 T 细胞和肿瘤细胞靶点进行全基因组水平的筛选。譬如利用 CRISPRi 对 T 细胞进行全基因组筛选和研究,发现敲除了 *MED12* 的 T 细胞表现出 STAT 和 AP-1 转录因子活性的增强,并且 IL2-RA 在表达增加的同时对 IL-2 的敏感性增加,从而增强了抗肿瘤活性^[52]。而张锋实验室则利用 CRISPRa 全基因组筛选肿瘤细胞发现 BCL-2 和 B3GNT2 是肿瘤细胞对细胞毒性 T 细胞产生耐药性的关键驱动因子,抑制这两个蛋白可以增强肿瘤对免疫疗法的敏感性^[53]。另外,还可利用 CRISPR 转录或表观编辑实现基因的抑制/激活,从而研究特定的基因在肿瘤发生发展中的功能。主要包括以下几个方面:一是通过无催化活性的 Cas9 上偶联抑制因子 MeCP2、KRAB 以及转录激活因子 VP64 等实现特定基因的抑制或激活;二是通过无催化活性的 Cas9 上偶联表观修饰相关酶以实现特定基因的甲基化、去甲基化或者乙酰化、去乙酰化;三是可以利用 CRISPR/Cas13 探究 RNA 在肿瘤中的作用^[37]。

5 基因编辑在 CAR-T 治疗中的应用

嵌合抗原受体 T 细胞免疫疗法 (Chimeric Antigen Receptor T-Cell Immunotherapy, CAR-T) 是指在体外将人的 T 细胞通过基因工程手段修饰改造,回输患者体内用于治疗疾病的一种方法。在制备 CAR-T 的过程中,使用 CRISPR-Cas 系统靶向抑制 T 细胞活性耗竭相关基因或发生免疫排斥的基因,可提高 CAR-T 的有效性和安全性。在方法上,目前包括了将 CRISPR/Cas 系统通过慢病毒包装感染 T 细胞和将特定基因定点整合至目的基因两种方式。

在该疗法治疗癌症的临床研究中,科研人员发

现 T 细胞耗竭 (T Cell Exhaustion) 会严重影响这一疗法的治疗效果。为了阻止 T 细胞效应功能和自我更新能力的逐渐丧失,可以利用 CRISPR/Cas9 技术靶向抑制性受体、转录因子或其他功能相关基因位点,理论上可以阻止甚至逆转 CAR-T 细胞耗竭。比如根据实验结果科研人员发现基因编辑敲除 CTLA-4、PD-1 和 LAG-3 等负调控因子,可以在一定程度上实现上述目的^[54-57]。在随后的临床实践中,通过将 CAR 序列特异性地插入 PD1 位点,不仅避免了因为慢病毒随机整合所带来的潜在致癌风险,增强了 CAR-T 的安全性,同时降低了 CAR-T 细胞耗竭而提高了抗癌疗效^[37,58]。而在异体通用型 CAR-T (UCAR-T) 的研发中,为了克服普遍面临的免疫排斥,特别是为了应对移植物抗宿主病 (GvHD) 和宿主抗移植物病 (HVGR),需要精准敲除人原代 T 细胞中的 TCR 和 HLA 基因,能够有效实现这一目的的技术手段就是以 CRISPR/Cas9 为代表的基因编辑技术。比如利用 CRISPR/Cas9 技术敲除健康供者 T 细胞基因组的 HLA-A/B、TRAC/TRBC、PD-1 等基因,随后利用这些经过编辑的细胞治疗骨髓瘤或肉瘤患者^[59]。2017 年,有研究团队报道了使用 CRISPR/Cas9 将 CD19-CAR 定点整合进 TRAC 位点,在敲除供体细胞 TCR 的同时引进靶向 CD19 的特异性 CAR 分子,使得移植通用型 CAR-T 细胞避免了 GvHD。这是全球首个报道的定点整合 CAR-T,对该领域发展具有重要意义^[60]。异体通用型 CAR-T 也被用于临床治疗坏死性肌炎和系统性硬化症的患者。病人在回输两周内实现了 B 细胞的完全耗竭,并避免了异体 T 细胞回输时可能出现的免疫排斥反应,成功实现了异体通用型 CAR-T 的临床治疗,扩展了 CAR-T 疗法的适应症^[61]。然而,基因编辑过程中存在一定的脱靶风险,也就是编辑了非靶点的 DNA 序列,这会导致意外的基因功能改变,甚至引发新的疾病。因此,提高基因编辑的精准性,开发合适的脱靶预测和检测方法对基于基因编辑的 CAR-T 疗法至关重要^[62]。

基因编辑技术甚至可以直接作为药物递送至肿瘤细胞中靶向驱动癌症的基因突变从而发挥治疗作用。比如在 23 年发表的一项研究中,科研人员针对神经母胶质细胞瘤患者进行了个性化的全基因组测序,获得了放疗药物他莫昔芬和替莫唑胺联合治疗前后的原发性和复发性肿瘤的各个基因座突变数,随后设计了能够靶向这些高重复基因座的 sgRNA,利用慢病毒和电转的方式将 Cas9 蛋白和

sgRNA 文库导入神经母胶质细胞瘤中,利用 CRISPR 切除肿瘤高负荷突变的基因来杀伤肿瘤^[63]。再如科研人员报道了利用碱基编辑技术针对线粒体 *Mt-Nd5* 基因进行了截短性突变,发现这一在多种肿瘤线粒体中高频出现的基因在截短后可以显著提高黑色素瘤等肿瘤对免疫检查点疗法的响应^[64]。

综上所述,以 CRISPR/Cas9 系统为代表的新型基因编辑工具有效促进了肿瘤动物模型的快速构建、肿瘤靶点的深度筛选,并为癌症治疗提供了从“治标”到“治本”的可能性,未来有望通过技术迭代与跨学科合作,推动癌症治疗进入精准化、个体化时代,具有广阔的应用前景。在进一步研究安全性、伦理及长期效果的基础上,基因编辑技术在癌症发病机制的研究及精准治疗中也必将会发挥更大的作用。

参 考 文 献

- [1] Khalil AM. The genome editing revolution: review. *Journal, Genetic Engineering & Biotechnology*, 2020, 18 (1): 68.
- [2] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337(6096): 816—821.
- [3] Cong L, Ann Ran F, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339 (6121): 819—823.
- [4] Wang JY, Doudna JA. CRISPR technology: a decade of genome editing is only the beginning. *Science*, 2023, 379 (6629): eadd8643.
- [5] Makarova KS, Wolf YI, Iranzo J, et al. Evolutionary classification of CRISPR-cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18 (2): 67—83.
- [6] Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(39): E2579—E2586.
- [7] Altae-Tran H, Shmakov SA, Makarova KS, et al. Diversity, evolution, and classification of the RNA-guided nucleases TnpB and Cas12. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2023, 120(48): e2308224120.
- [8] Liu GW, Lin QP, Jin S, et al. The CRISPR-Cas toolbox and gene editing technologies. *Molecular Cell*, 2022, 82(2): 333—347.
- [9] Adikusuma F, Piltz S, Corbett MA, et al. Large deletions induced by Cas9 cleavage. *Nature*, 2018, 560 (7717): E8—E9.
- [10] Anzalone AV, Koblan LW, Liu DR. Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(7): 824—844.
- [11] Zhao DD, Li J, Li SW, et al. Glycosylase base editors enable C-to-A and C-to-G base changes. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(1): 35—40.
- [12] Tong HW, Wang XC, Liu YH, et al. Programmable A-to-Y base editing by fusing an adenine base editor with an N-methylpurine DNA glycosylase. *Nature Biotechnology*, 2023, 41(8): 1080—1084.
- [13] Chen L, Hong MJ, Luan CM, et al. Adenine transversion editors enable precise, efficient A · T-to-C · G base editing in mammalian cells and embryos. *Nature Biotechnology*, 2024, 42(4): 638—650.
- [14] Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, 2019, 576(7785): 149—157.
- [15] Gao P, Lyu Q, Ghanam AR, et al. Prime editing in mice reveals the essentiality of a single base in driving tissue-specific gene expression. *Genome Biology*, 2021, 22(1): 83.
- [16] Lin QP, Zong Y, Xue CX, et al. Prime genome editing in rice and wheat. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(5): 582—585.
- [17] 杜一飞, 周薇娜, 胡旭, 等. 去势法大鼠骨质疏松症模型建立的探讨. *口腔医学*, 2010, 30(7): 399—401.
Du YF, Zhou WN, Hu X, et al. Establishment of experimental animal model of osteoporosis induced by ovariectomy in rats. *Stomatology*, 2010, 30(7): 399—401. (in Chinese)
- [18] 田丽花, 梁敏, 张劼, 等. 糖皮质激素性骨质疏松大鼠模型建立的研究. *广西医科大学学报*, 2013, 30(1): 5—7.
Tian LH, Liang M, Zhang J, et al. Establishment of glucocorticoid-induced osteoporosis rat model. *Journal of Guangxi Medical University*, 2013, 30(1): 5—7. (in Chinese)
- [19] Koller BH, Hagemann LJ, Doetschman T, et al. Germ-line transmission of a planned alteration made in a hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene by homologous recombination in embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, 86(22): 8927—8931.
- [20] Zijlstra M, Li E, Sajjadi F, et al. Germ-line transmission of a disrupted beta 2-microglobulin gene produced by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature*, 1989, 342(6248): 435—438.
- [21] Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, et al. Knockout rats *via* embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science*, 2009, 325(5939): 433.
- [22] Song YJ, Cui CC, Zhu HM, et al. Expression, purification and characterization of zinc-finger nuclease to knockout the goat beta-lactoglobulin gene. *Protein Expression and Purification*, 2015, 112: 1—7.
- [23] Qiu ZW, Liu MZ, Chen ZH, et al. High-efficiency and heritable gene targeting in mouse by transcription activator-like effector nucleases. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41 (11): e120.

- [24] Sung YH, Baek IJ, Kim DH, et al. Knockout mice created by TALEN-mediated gene targeting. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(1): 23—24.
- [25] Carlson DF, Tan WF, Lillico SG, et al. Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(43): 17382—17387.
- [26] Li DL, Qiu ZW, Shao YJ, et al. Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(8): 681—683.
- [27] Wang HY, Yang H, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, 153(4): 910—918.
- [28] Yang H, Wang HY, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, 154(6): 1370—1379.
- [29] Li W, Teng F, Li TD, et al. Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(8): 684—686.
- [30] Maddalo D, Machado E, Concepcion CP, et al. *In vivo* engineering of oncogenic chromosomal rearrangements with the CRISPR/Cas9 system. *Nature*, 2014, 516(7531): 423—427.
- [31] Zuckermann M, Hovestadt V, Knobbe-Thomsen CB, et al. Somatic CRISPR/Cas9-mediated tumour suppressor disruption enables versatile brain tumour modelling. *Nature Communications*, 2015, 6: 7391.
- [32] Kim K, Ryu SM, Kim ST, et al. Highly efficient RNA-guided base editing in mouse embryos. *Nature Biotechnology*, 2017, 35(5): 435—437.
- [33] Liu ZQ, Chen M, Chen SY, et al. Highly efficient RNA-guided base editing in rabbit. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 2717.
- [34] Yang L, Zhang XH, Wang LR, et al. Increasing targeting scope of adenosine base editors in mouse and rat embryos through fusion of TadA deaminase with Cas9 variants. *Protein & Cell*, 2018, 9(9): 814—819.
- [35] Zhang WH, Aida T, Del Rosario RCH, et al. Multiplex precise base editing in *Cynomolgus* monkeys. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 2325.
- [36] Katti A, Diaz BJ, Caragine CM, et al. CRISPR in cancer biology and therapy. *Nature Reviews Cancer*, 2022, 22(5): 259—279.
- [37] Chehelgerdi M, Chehelgerdi M, Khorramian-Ghahfarokhi M, et al. Comprehensive review of CRISPR-based gene editing: mechanisms, challenges, and applications in cancer therapy. *Molecular Cancer*, 2024, 23(1): 9.
- [38] Ding S, Liu JF, Han X, et al. CRISPR/Cas9-mediated genome editing in cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(22): 16325.
- [39] Xue W, Chen SD, Yin H, et al. CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. *Nature*, 2014, 514(7522): 380—384.
- [40] Horie Y, Suzuki A, Kataoka E, et al. Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas. *Journal of Clinical Investigation*, 2004, 113(12): 1774—1783.
- [41] Feldser DM, Kostova KK, Winslow MM, et al. Stage-specific sensitivity to p53 restoration during lung cancer progression. *Nature*, 2010, 468(7323): 572—575.
- [42] Sánchez-Rivera FJ, Papagiannakopoulos T, Romero R, et al. Rapid modelling of cooperating genetic events in cancer through somatic genome editing. *Nature*, 2014, 516(7531): 428—431.
- [43] Platt RJ, Chen SD, Zhou Y, et al. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell*, 2014, 159(2): 440—455.
- [44] Ely ZA, Mathey-Andrews N, Naranjo S, et al. A prime editor mouse to model a broad spectrum of somatic mutations *in vivo*. *Nature Biotechnology*, 2024, 42(3): 424—436.
- [45] Chen J, López-Moyado IF, Seo H, et al. NR4A transcription factors limit CAR T cell function in solid tumours. *Nature*, 2019, 567(7749): 530—534.
- [46] Seo H, Chen J, González-Avalos E, et al. TOX and TOX2 transcription factors cooperate with NR4A transcription factors to impose CD8⁺ T cell exhaustion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(25): 12410—12415.
- [47] Siddiqui I, Schaeuble K, Chennupati V, et al. Intratumoral Tcf1 + PD-1 + CD8⁺ T cells with stem-like properties promote tumor control in response to vaccination and checkpoint blockade immunotherapy. *Immunity*, 2019, 50(1): 195—211. e10.
- [48] Kurtulus S, Madi A, Escobar G, et al. Checkpoint blockade immunotherapy induces dynamic changes in PD-1⁻ CD8⁺ tumor-infiltrating T cells. *Immunity*, 2019, 50(1): 181—194. e6.
- [49] Miller BC, Sen DR, Al Abosy R, et al. Subsets of exhausted CD8⁺ T cells differentially mediate tumor control and respond to checkpoint blockade. *Nature Immunology*, 2019, 20(3): 326—336.
- [50] Chow RD, Guzman CD, Wang GC, et al. AAV-mediated direct *in vivo* CRISPR screen identifies functional suppressors in glioblastoma. *Nature Neuroscience*, 2017, 20(10): 1329—1341.
- [51] Menegatti S, Lopez-Cobo S, Sutra Del Galy A, et al. Ablation of FAS confers allogeneic CD3⁻ CAR T cells with resistance to rejection by T cells and natural killer cells. *Nature Biomedical Engineering*, 2024, 8(12): 1651—1664.
- [52] Freitas KA, Belk JA, Sotillo E, et al. Enhanced T cell effector activity by targeting the Mediator kinase module. *Science*, 2022, 378(6620): eabn5647.
- [53] Joung J, Kirchgatterer PC, Singh A, et al. CRISPR activation screen identifies BCL-2 proteins and B3GNT2 as drivers of cancer resistance to T cell-mediated cytotoxicity. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 1606.

- [54] Zhang YP, Zhang XY, Cheng C, et al. CRISPR-Cas9 mediated LAG-3 disruption in CAR-T cells. *Frontiers of Medicine*, 2017, 11(4): 554—562.
- [55] Zhang W, Shi L, Zhao ZL, et al. Disruption of CTLA-4 expression on peripheral blood CD8⁺ T cell enhances anti-tumor efficacy in bladder cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2019, 83(5): 911—920.
- [56] Liu XJ, Zhang YP, Cheng C, et al. CRISPR-Cas9-mediated multiplex gene editing in CAR-T cells. *Cell Research*, 2017, 27(1): 154—157.
- [57] Ren JT, Liu XJ, Fang CY, et al. Multiplex genome editing to generate universal CAR T cells resistant to PD1 inhibition. *Clinical Cancer Research*, 2017, 23(9): 2255—2266.
- [58] Zhang JQ, Hu YX, Yang JX, et al. Non-viral, specifically targeted CAR-T cells achieve high safety and efficacy in B-NHL. *Nature*, 2022, 609(7926): 369—374.
- [59] Stadtmauer EA, Fraietta JA, Davis MM, et al. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science*, 2020, 367(6481): eaba7365.
- [60] Eyquem J, Mansilla-Soto J, Giavridis T, et al. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature*, 2017, 543(7643): 113—117.
- [61] Wang XB, Wu X, Tan BH, et al. Allogeneic CD19-targeted CAR-T therapy in patients with severe myositis and systemic sclerosis. *Cell*, 2024, 187(18): 4890—4904. e9.
- [62] Tao RY, Han XP, Bai X, et al. Revolutionizing cancer treatment: enhancing CAR-T cell therapy with CRISPR/Cas9 gene editing technology. *Frontiers in Immunology*, 2024, 15: 1354825.
- [63] Tan IL, Perez AR, Lew RJ, et al. Targeting the non-coding genome and temozolomide signature enables CRISPR-mediated glioma oncolysis. *Cell Reports*, 2023, 42(11): 113339.
- [64] Mahmood M, Liu EM, Shergold AL, et al. Mitochondrial DNA mutations drive aerobic glycolysis to enhance checkpoint blockade response in melanoma. *Nature Cancer*, 2024, 5(4): 659—672.

Application of Gene Editing in the Construction of Tumor-associated Animal Models and CART Treatment

Dali Li* Yifan Zhu Haozhe Guo

School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200241, China

Abstract Based on the content of the 373rd Shuangqing Forum “New Paradigm of Tumor Research Driven by Clinical Problems”, this paper enumerates the development history and basic principles of gene editing technology, the techniques of constructing tumor-associated animal models, and the role of gene editing in this field, and outlines the application of tumor animal models in CART therapy. Gene editing technology has undergone multiple innovations since the 1990s, evolving from early-stage tools such as meganucleases, zinc finger nucleases (ZFN), and transcription activator-like effector nucleases (TALEN) to highly efficient systems centered on CRISPR-Cas. Through CRISPR systems, researchers can establish spontaneous tumor animal models and screen therapeutic targets for cancer. Additionally, gene editing technology has significantly advanced the optimization of CAR-T therapy. By knocking out specific genes, the safety, efficacy, and universality of CAR-T therapy have been substantially improved. In summary, gene editing technology holds broad application prospects in tumor model construction and therapeutic development.

Keywords gene editing; tumor; animal model; CART

李大力 博士,华东师范大学生命科学学院研究员、博士生导师,教育部青年长江学者、国家自然科学基金青年科学基金项目(A类)获得者,上海市尚思探索学者。以基因编辑技术创新为基础,开发了多种高效动物模型构建的新方法,围绕罕见病的模型构建和基因治疗,开展了深入研究。

(责任编辑 陈鹤 张强)

* Corresponding Author, Email: dlli@bio.ecnu.edu.cn