



## CRISPR/Cas 系统在三阴性乳腺癌 精准医疗中的应用\*

林惠玲<sup>1,2)\*\*</sup> 欧阳雨欣<sup>2)\*\*</sup> 唐宛莹<sup>2)</sup> 胡 密<sup>3)</sup> 彭 茂<sup>1)</sup> 何平平<sup>4)\*\*\*</sup> 欧阳新平<sup>1)\*\*\*</sup>

<sup>(1)</sup> 湖南师范大学医学院生理学教研室, 长沙 410081;

<sup>(2)</sup> 南华大学衡阳医学院基础医学院生理学教研室, 神经科学研究所, 神经变性与认知障碍衡阳市重点实验室, 衡阳 421001;

<sup>(3)</sup> 长沙优龙机器人有限公司, 长沙 410221; <sup>(4)</sup> 湖南师范大学医学院护理系, 长沙 410081)

**摘要** 三阴性乳腺癌 (triple negative breast cancer, TNBC) 是一种特殊乳腺癌亚型, 由于其耐药性强、侵袭性高、转移能力强、易复发及预后差等临床特点, 导致临床治疗手段不足。CRISPR/Cas 基因编辑系统的发展极大促进了对基因组结构和功能的理解, 为研究疾病的发生发展提供了简单又有前途的工具。本综述描述了新兴的 CRISPR/Cas 技术及其对 TNBC 的新见解, 展示了其临床应用的未来前景, 并提出 CRISPR 技术与其他技术相结合, 如三维体外细胞培养系统、单细胞测序和人工智能等, 可早期诊断和精确治疗 TNBC 患者, 从而达到精准医疗的目的。

**关键词** CRISPR/Cas 系统, 三阴性乳腺癌, 精准医疗

**中图分类号** R737.9

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2024.0146

**CSTR:** 32369.14.pibb.20240146

乳腺癌是女性最普遍的癌症, 也是全球癌症死亡的第二大原因<sup>[1]</sup>。据统计, 2020 年乳腺癌新增病例高达 226 万<sup>[2]</sup>, 其中三阴性乳腺癌 (triple-negative breast cancers, TNBC) 是一种特殊的乳腺癌亚型。TNBC 明显区别于其他肿瘤, 其具有显著的肿瘤间和肿瘤内异质性, 它由不同的分子改变所驱动, 具有不同的组织病理学特征, 可分为不同的分子亚型。由于其远处复发、死亡的高风险及本身的高度异质性, 为每位患者量身定制个性化和有效诊断/治疗的能力在 TNBC 患者中尤为重要。然而, 在临床实践中, 超声和乳房 X 射线摄影技术仅可揭示 TNBC 肿瘤的平滑边界, 无法有效地成像肿瘤内特征, 如坏死和纤维化, 通常需要结合形态学成像和免疫组化来完善 TNBC 的诊断<sup>[3]</sup>, 这严重依赖于操作者的技巧, 并且耗时长<sup>[4]</sup>。同时, 化疗是 TNBC 长期以来唯一可用的治疗方案<sup>[5-6]</sup>。传统化疗药物, 如蒽环类、紫杉烷类、环磷酰胺、卡铂和 5-氟尿嘧啶, 不仅治疗效果有限, 而且不良反应大, 如耳毒性、心脏毒性、神经毒性和生育能力丧失<sup>[7]</sup>; 与此相反, 有效治疗 TNBC 临床治疗的新型

化疗药物 (如白蛋白结合型紫杉醇) 和免疫治疗药物 (如阿替利珠单抗) 可减轻严重腹痛、阴道出血、肌肉痉挛、瘫痪、白细胞减少、贫血、心脏毒性等不良反应<sup>[8-13]</sup>, 但是新型治疗药物治疗周期长且花费昂贵<sup>[14]</sup>。因此, 迫切需要开发有效的技术来提高 TNBC 的诊断效率和治疗效果。

近年来, CRISPR/Cas 系统越来越受到关注, 目前已被大量用于 TNBC 的研究。作为一种精准的基因编辑技术, CRISPR 技术通过标记并追踪不同的 TNBC 细胞克隆, 更全面地了解 TNBC 的异质性; CRISPR 技术可以精确地识别和编辑 TNBC 中的特定基因, 从而有助于消除肿瘤内部的遗传异质性; CRISPR 技术还可以进行高通量筛选, 快速识别出与 TNBC 生长、转移和耐药等相关的基因, 为 TNBC 治疗提供新的靶点和策略, CRISPR/Cas 系

\* 湖南省自然科学基金 (2023JJ30426) 资助项目。

\*\* 并列第一作者。

\*\*\* 通讯联系人。

何平平 Tel: 0734-8281671, E-mail: hpp-612@163.com

欧阳新平 Tel: 0734-8281389, E-mail: y1655@163.com

收稿日期: 2024-04-07, 接受日期: 2024-09-03

统的出现为TNBC个性化的诊断和治疗带来了新的希望。本综述描述了新兴的CRISPR/Cas系统及其在TNBC中的应用。这些技术可提供对TNBC有更深层次的剖析和理解,将数据转化为临床应用,或可更好地为TNBC的精准医疗服务。

# 1 CRISPR/Cas系统

CRISPR/Cas系统是一种微生物适应性免疫系统,它包含一个复杂的机制,将外源核酸片段整合嵌入到微生物基因组中的CRISPR阵列中,主要作为分子剪刀破坏入侵的核酸<sup>[15]</sup>。CRISPR/Cas系统由核糖核蛋白复合物组成,该复合物由单个向导RNA (guide RNA, gRNA) 和Cas蛋白组成。该系统通过互补引导RNA激活Cas酶,启动选择性降解随机单链DNA的反式切割活性<sup>[16]</sup>。完整的CRISPR/Cas基因座由CRISPR阵列组成,该阵列通常只有几百个回文直接重复。这些精确的重复序列(每个25~35 bp)被间隔区(通常30~40 bp)分开,操纵子中存在Cas基因簇: Cas基因编码适应和效应模块以及一些辅助基因<sup>[17-18]</sup>。CRISPR/Cas的作用机制包括以下3个阶段: a. 适应阶段,将间隔区掺入宿主基因组,即将一段外来病毒或质粒

DNA捕获并整合到CRISPR阵列中作为新的间隔序列; b. 表达阶段,前CRISPR RNA (前cr-RNA) 转录和处理,即转录出的crRNA与辅助RNA (如tracrRNA) 结合,形成成熟的gRNA,准备参与后续的DNA识别和切割; c. 干扰阶段,靶遗传元件被crRNA-Cas蛋白效应物复合物破坏,即复合物识别到靶向DNA时,Cas蛋白进行切割DNA,达到破坏的作用<sup>[19-21]</sup>。

因为不同模块的半独立进化,CRISPR/Cas系统的分类是一个复杂的问题,现有的CRISPR/Cas系统分类采用了多种标准,包括特征性Cas基因、Cas操纵子的组织和保守Cas蛋白的系统发育等<sup>[22]</sup>,但是普遍认同的观点是将所有CRISPR/Cas系统分为2类、6种类型和33种亚型<sup>[23]</sup>(表1)。Class I类系统包括I、III和IV型,效应子是由几种Cas蛋白组成的多亚基效应复合物,而Class II包括II、V和VI型,效应子是单个大的多结构域蛋白<sup>[17]</sup>。这些亚型的区别在于位点组织的细微差异,并且通常编码亚型特异性Cas蛋白<sup>[17, 24-26]</sup>。I型和II型和V型系统识别并切割DNA,VI型靶向RNA,III型切割DNA和RNA<sup>[27]</sup>。由于Class II为单一核酸酶蛋白结构更容易操作,因此Class II被广泛用于基础和转化医学的研究。

Table 1 Characteristics of different types of CRISPR/Cas systems

表1 不同类型CRISPR/Cas系统的特征

|          | 类型  | 亚型          | 效应器复合物 | tracrRNA        | 特征蛋白  | PAM        | 靶标分子                  | 参考文献     |
|----------|-----|-------------|--------|-----------------|-------|------------|-----------------------|----------|
| Class I  | I   | ABCDEFGFG   | 多个亚基   | -               | 3     | -          | DNA                   | [28]     |
|          | III | ABCDEFGFG   | 多个亚基   | -               | 10    | GTH        | DNA/RNA               | [17, 25] |
|          | IV  | ABC         | 多个亚基   | -               | 6     | -          | RNA                   | [29]     |
| Class II | II  | ABC         | 单个亚基   | +               | 9     | NGG        | DNA                   | [25]     |
|          | V   | ABCDEFGHIKU | 单个亚基   | + <sup>1)</sup> | 12/14 | TTTN/-     | DNA/RNA <sup>2)</sup> | [30]     |
|          | VI  | ABCD        | 单个亚基   | -               | 13    | PFS序列A/U/C | RNA                   | [31]     |

<sup>1)</sup> 对应亚型: B、E、F、G、K; <sup>2)</sup> 对应亚型V-G。PAM: 原间隔序列邻近基序 (protospacer adjacent motif, PAM), 帮助Cas蛋白识别并切割目标DNA序列。

CRISPR/Cas系统具有多功能性和易于操作的特性,这使得CRISPR/Cas系统被广泛应用于病毒和细菌病原体检测、病毒抑制、细菌杀灭、基因治疗<sup>[32]</sup>以及癌症研究,包括癌症建模、癌症治疗和癌症相关基因功能的探究等。例如在癌症建模中,研究人员利用CRISPR/Cas系统构建Cre依赖性Rosa26 Cas9敲入的小鼠模型用于模拟致癌过程中

多种突变的动力学<sup>[33]</sup>,并且CRISPR/Cas9系统能够生成胰腺癌模型和肾母细胞瘤模型及肝癌模型<sup>[34-35]</sup>。除此之外,研究证明可以通过CRISPR/Cas9系统敲除4个乳腺癌相关抑癌基因(*p53*、*PTEN*、*RBI*、*NFI*)来形成乳腺癌类器官<sup>[36]</sup>。因此,随着CRISPR/Cas系统的快速发展,它已成为肿瘤研究的重要工具。

## 2 TNBC中的CRISPR/Cas系统

单细胞测序的发展拓展了TNBC的异质性,从而更加细化了TNBC的亚型,如间充质、基底样免疫抑制( $ER^{-}/PR^{-}/HER2^{-}/IM^{low}$ )、基底样免疫激活( $ER^{-}/PR^{-}/HER2^{-}/IM^{+}$ )、间充质茎样、管腔/雄激素受体( $HER2^{-}/PR^{-}/AR^{+}$ )、化生和免疫调节<sup>[37-39]</sup>。尽管这种分类很有价值,但由于TNBC中极度明显异质的驱动突变<sup>[40]</sup>,没有两个患者是相似的,这使得其在本质上具有高度复杂性。目前对其发病机制的了解有限,无法达到有效的根治,需要进一步细分TNBC进行诊断和治疗。CRISPR/Cas系统作为识别和验证TNBC相关基因(包括癌基因、抑癌基因和治疗耐药相关基因)的关键又强大的工具之一<sup>[41-42]</sup>,基于该系统对TNBC遗传机制的探索将促进新的有效靶向策略在临床诊断和治疗中的发展和应用,最终改善患者的生存和预后。因此CRISPR/Cas系统辅助的个体化诊断和治疗或可成为TNBC未来临床诊疗的方向(图1)。

### 2.1 CRISPR/Cas系统在TNBC诊断中的应用

TNBC由于其低分化特征,本身在形态学上很难被识别出乳腺癌的形态,并且当它发生转移时很难区分原位癌和转移癌。因此缺乏早期准确的诊断是TNBC患者预后不良的主要原因。为了及时预防TNBC的恶性发展,改善患者的预后,需要进一步探索有效和快捷的诊断方法。CRISPR/Cas技术可作为下一代诊断的核心组成部分,目前CRISPR/Cas系统相关分子诊断系统已建立<sup>[43]</sup>。

常见的CRISPR/Cas系统相关分子诊断系统包括Cas9、Cas12和Cas13,而不同的CRISPR系统采用不同的检测原理。基于Cas9的检测技术主要利用Cas9蛋白与gRNA结合后,gRNA识别靶标DNA的PAM序列,并且gRNA与靶标DNA完美匹配,Cas9蛋白进行切割。通过PAM的特异性来识别特定的DNA或RNA序列。如NASBACC检测体系将PAM序列连接在单链DNA扩增子中,Cas9介导的切割导致T7转录的截短模板,产生更短的靶RNA,不能激活传感器,而在没有PAM序列的情况下,含有触发物的全长靶RNA被转录,这激活了传感器并产生可见的颜色变化,从而完成检测<sup>[44]</sup>。Cas12系统中Cas12蛋白与crRNA(CRISPR RNA)形成复合体,其中crRNA包含与目标DNA序列互补的间隔序列。当这个复合体识别并结合到含有匹配间隔序列的目标DNA时,

Cas12蛋白会进行切割。如2018年DETECTR检测方法中将靶向识别DNA,并进一步切割导致猝灭剂与荧光团分离,从而产生荧光信号,完成检测<sup>[45]</sup>。Cas13系统中Cas13蛋白与crRNA(CRISPR RNA)或gRNA结合形成复合体,进而切割目标RNA,而切割导致猝灭剂与荧光团分离,从而产生荧光信号,如SHERLOCK检测方式<sup>[46]</sup>。

CRISPR/Cas系统可用于检测不同类型的TNBC生物标志物,包括TNBC细胞特异性DNA/RNA以及循环肿瘤DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)。Wang等<sup>[47]</sup>使用一种基于CRISPR/dCas9-MS2的RNA荧光原位杂交分析技术对临床TNBC福尔马林固定石蜡包埋样本中人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, *HER2*) mRNA进行原位扩增成像和定量。这是一种CRISPR/dCas9介导的原位成像技术,用于在细胞和组织中混合mRNA转录物。这种组合运用荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH),与传统的仅用FISH方法检测相比,能检测出更多的病例,而且成本更低<sup>[47]</sup>。众所周知,乳腺癌相关基因(breast cancer susceptibility gene, *BRCA*) 1缺失可导致TNBC的发生发展<sup>[48]</sup>,Choi等<sup>[49]</sup>使用两种Au纳米颗粒(AuNP)开发了一种基于CRISPR/Cas12a的对*BRCA1*快速、高选择性的传感器。2个AuNP分别用于荧光猝灭和增强。在*BRCA1*基因被CRISPR/Cas12a系统切割后导致荧光猝灭的AuNP可以脱落,使得溶液的颜色从紫色变为红紫色,因而可以通过颜色变化快速准确地检测*BRCA1*基因<sup>[49]</sup>。除此之外,目前研究人员基于CRISPR/Cas系统已经开发几种新的乳腺肿瘤标志物检测方法。如*PIK3CA*<sup>H1047R</sup>是乳腺癌中最常见的单核苷酸变异,检测*PIK3CA*<sup>H1047R</sup>突变对于临床诊断乳腺癌至关重要,Cao等<sup>[50]</sup>使用CRISPR/Cas12a鉴定*PIK3CA*<sup>H1047R</sup>的检测限为0.036%,而另一项基于CRISPR/Cas12a生物荧光传感器,则将*PIK3CA*<sup>H1047R</sup>的检测限降低到0.001%<sup>[51]</sup>。与单细胞测序相比,上述方法检测时间更短、灵敏度和特异性更高,并且CRISPR检测通常只需要简单试剂和实验设备,因而成本较低。这使得CRISPR/Cas系统逐渐成为筛查不同类型TNBC生物标志物的切实可行的手段。

利用CRISPR/Cas技术搭建的CRISPR平台是一种核酸敏感检测的重要工具,其对样品来源要求低,预处理成本低、假阴性率低,简化的检测平台

将提高其在临床的实用性,从而成为TNBC精准诊断和基因分型的优越方法。然而,这也给CRISPR/Cas技术带来挑战,包括脱靶效应的存在、最小样本需求及检测结果的敏感度等。其他挑战可能包括CRISPR/Cas检测系统储存条件下的稳定性或临床数据可视化等,这可以通过冷冻干燥现成的CRISPR系统以及共享互联网数据的来源等方式来解决。

## 2.2 CRISPR/Cas系统在TNBC精准治疗中的应用

CRISPR/Cas系统是一种突破性的基因编辑工具,不仅可以识别和验证致癌基因靶点,而且已经在TNBC中进行了多种CRISPR筛选,包括鉴定肿瘤抑制剂、致癌基因和耐药性相关基因<sup>[39, 52]</sup>,这使得TNBC的精准治疗成为可能。其中CRISPR筛选技术为TNBC的研究和治疗提供了强大的工具,它有助于加速新治疗方法的开发,并最终改善患者的预后。Gao等<sup>[53]</sup>通过CRISPR/Cas9筛选技术构建SETD7基因的敲除细胞系,进一步探究SETD7在调控TNBC细胞迁移和上皮-间充质转变的过程中作用,这提示SETD7基因可作为晚期TNBC的潜在治疗靶点。此外,CRISPR/Cas9筛选技术可以鉴定出那些参与药物代谢或转运的关键基因,通过敲除这些基因可以增加TNBC细胞对特定药物的敏感性,从而使得TNBC精准医疗成为可能。

2016年10月,中国科学家在10例肺癌患者身上进行了世界上首次CRISPR/Cas9临床治疗试验,首例患者接受了CRISPR/Cas9基因编辑的T细胞,恢复了体内免疫反应的平衡,从而产生抗癌效果<sup>[54]</sup>。Nguyen等<sup>[55]</sup>发现,ST8SIA1参与了乳腺癌干细胞的功能,与TNBC的转移和复发有关,并促进了TNBC的发展,CRISPR/Cas系统敲除ST8SIA1,阻断TNBC细胞生长和转移。此外,一项临床报道, CXCL12及其受体CXCR4和CXCR7的高表达与TNBC转移的易感性和不良预后相关<sup>[56]</sup>。因此Yang等<sup>[57]</sup>使用CRISPR/Cas9技术在TNBC癌细胞中敲除或共敲除CXCR7或CXCR4,从而显著抑制TNBC肿瘤细胞增殖、侵袭和肿瘤生长。此外,UBR5是一种核磷蛋白,在TNBC样本中被发现表达增加,并且是TNBC内分泌治疗耐药性途径的关键调节因子<sup>[58]</sup>,CRISPR/Cas9系统介导的E3泛素连接酶UBR5敲除可抑制TNBC小鼠模型的肿瘤生长和转移<sup>[59]</sup>。

在CRISPR与药物联合治疗方面的相关研究表明,CRISPR/Cas9靶向TNBC中的各种耐药基因,

使细胞对抗癌药物敏感。比如在BT-549 TNBC模型中CRISPR/Cas9介导的MALAT1启动子缺失增强了对紫杉醇和多柔比星的敏感性<sup>[60]</sup>,而通过CRISPR/Cas9基因编辑敲除PARP1使细胞对阿霉素、吉西他滨和多西他赛敏感<sup>[61]</sup>。除此之外,基于CRISPR/Cas9系统阐明了紫杉醇耐药中的关键作用,为TNBC患者克服不良化疗反应提供了新的治疗策略<sup>[62]</sup>。因此,可以将CRISPR与药物联合用于TNBC精准治疗。

随着纳米递送技术的发展,利用纳米技术递送CRISPR/Cas系统治疗TNBC在许多临床前研究中已显示出有希望的结果。Guo等<sup>[63]</sup>用一种载CRISPR基因编辑系统的非阳离子、可变形、肿瘤靶向纳米脂胶系统(tNLG)给TNBC小鼠全身给药(tNLG),敲除TNBC肿瘤组织中Lcn2(>81%),导致显著的肿瘤生长抑制(>77%)。2024年,She等<sup>[64]</sup>开发了一种氧化还原可激活的顺序释放纳米颗粒(AMANC@M),用于肿瘤靶向递送抗癌药物和CRISPR/Cas9,AMANC@M可以通过双重代谢抑制来逆转肿瘤免疫微环境,从而增强TNBC治疗。然而,CRISPR/Cas系统在TNBC治疗的应用实施并不是一件容易的事,未来仍需要开发TNBC中体内更安全、更精确和有效CRISPR基因组编辑的递送方法。

随着技术的进步和临床试验的开展,CRISPR/Cas系统在TNBC治疗中的应用前景值得期待。未来的研究将进一步优化编辑工具,提高编辑效率和安全性,推动CRISPR/Cas系统成为TNBC治疗的有效手段。

## 2.3 CRISPR/Cas系统的临床转化研究

目前,虽然CRISPR/Cas系统的临床开发仍处于初级阶段,但学术实验室和行业都为将这项技术引入临床投入了大量的精力。随着技术的不断完善,CRISPR/Cas技术从实验室到床边会为许多患者提供了新的希望,并有望改变我们对未来治疗方法的思考方式。

CRISPR在体外和体内应用的多项临床试验处于初始阶段。例如,CRISPR疗法相关的CTX001用于β地中海贫血或镰状细胞病治疗已进入临床1/2期试验(临床试验标识符:NCT03655678)<sup>[65]</sup>。研究人员希望通过CRISPR疗法提高HbF水平并改善患者的症状。在TNBC患者中常出现BRCA1/2等基因的突变,CRISPR/Cas9可以用来修复这些突变,恢复基因的正常功能或利用CRISPR/Cas9技术

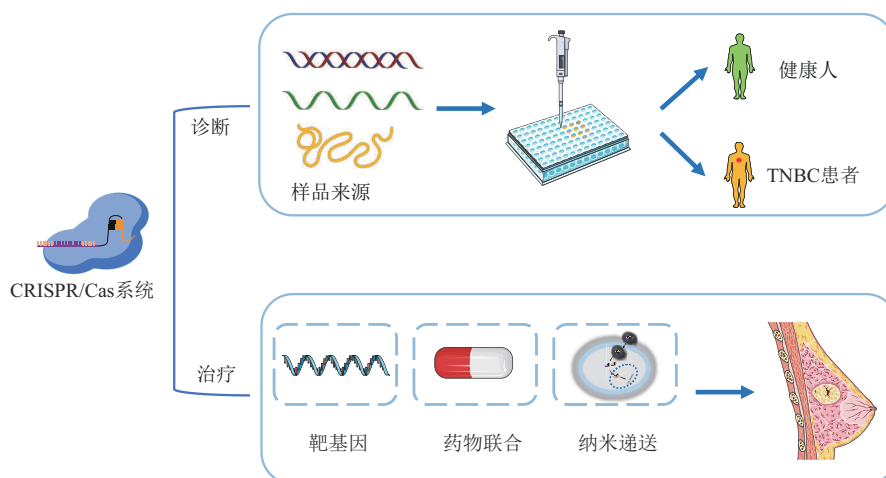


Fig. 1 Application of CRISPR/Cas system in diagnosis and treatment of TNBC

图1 CRISPR/Cas系统在TNBC诊断和治疗的应用

CRISPR/Cas技术通过检测不同的样本(DNA、RNA和蛋白质)鉴别健康人和TNBC患者,达到诊断TNBC的目的,通过敲低靶基因、药物联合治疗及纳米递送的方式精准治疗TNBC。

改造T细胞,使其能够更有效地识别并杀死TNBC细胞,类似于嵌合抗原受体T细胞治疗(chimeric antigen receptor T cell therapy, CAR-T cell therapy, 又称CAR-T细胞疗法)。病毒和非病毒递送系统在体内的最新进展突出了CRISPR/Cas9作为遗传病和病毒性疾病的潜在治疗方法的前景。然而,临床翻译仍有许多障碍需要克服,如脱靶效应、编辑效率和载体的组织特异性。此外,在临床转化前,确保安全是临床转化的重中之重。2022年美国食品和药品监督管理局(FDA)发布了一份涉及基因组编辑的研究性新药的指南草案,该指南建议使用多种方法评估脱靶效应和基因编辑成分。并且在美国多个地区,联邦法规通过机构审查委员会系统提供了所需的法律和道德框架,以最小化和管理潜在风险<sup>[66]</sup>。

总之,目前虽然还没有直接针对TNBC的CRISPR系统的临床试验结果公开报道,但在未来期望会有CRISPR系统在TNBC的安全性、科学性的临床转化研究。

### 3 CRISPR/Cas系统与其他技术的融合

CRISPR/Cas技术目前展现出多技术融合发展的趋势。这将驱动细胞表型的生物分子基础得到更深入的表征,从而提供对生物过程更深层次的理解。同时,CRISPR技术融合其他技术也将为

TNBC的精准医疗应用开辟新的思路(图2)。

三维体外细胞培养系统克服了二维细胞不能准确复制疾病相关的微环境和复杂过程的缺陷,方便用于探究疾病的病因发病机制。将系统与CRISPR/Cas系统相结合,可以更大程度地筛选出疾病相关的致病基因、研发出病人个体有效的化疗药物<sup>[67]</sup>,从而最终实现对患者进行精准治疗的目的。同时,人类诱导多能干细胞(human induced pluripotent stem cells, hiPSCs)也被广泛用于代表人类疾病模型,因为它们表现出与人类病理学非常相似的表型<sup>[68]</sup>。患者特异性诱导多能干细胞具有高复制能力和致病性遗传改变,可用于研究复杂遗传疾病的潜在分子机制。CRISPR/Cas9系统和hiPSCs的结合可能有助于药物开发和筛选、基因治疗/基因编辑,以及病毒的治疗性免疫应答策略的构建<sup>[69-70]</sup>。Perturb-Seq(Perturbation-Seq)作为一种CRISPR基因编辑技术结合单细胞测序的技术,使研究人员在单细胞水平上同时进行基因编辑和转录组分析成为可能,这揭示了基因和细胞功能的多维画像,并进一步促进对生物学和疾病机制的理解<sup>[71-72]</sup>。

此外,在CRISPR/Cas系统中,设计和选择高特异性和高敏感性的gRNA是非常必要的。提高靶向效应,降低脱靶效应,为成功的基因组编辑奠定了基础。然而,基因及蛋白质的复杂性使这项任务成为一项重大挑战<sup>[73]</sup>。在这方面,人工智能可以

预测 gRNA 活性，从而改善 CRISPR 系统的靶向性，降低脱靶效应，这是在 TNBC 治疗中更广泛应

用的关键因素。未来，CRISPR/Cas 技术的融合将推动 TNBC 精准医疗飞速发展。

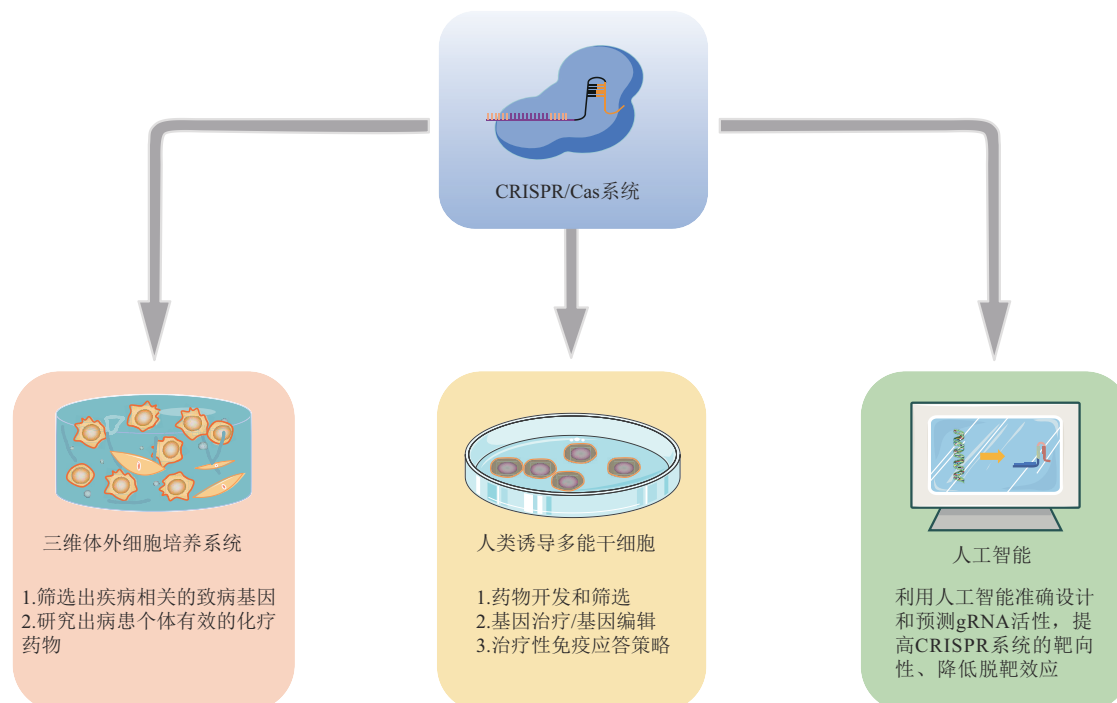


Fig. 2 Application of CRISPR/Cas system combined with other technologies in TNBC

图2 CRISPR/Cas系统结合其他技术在TNBC的应用

#### 4 问题及展望

CRISPR/Cas 系统作为一种精确的基因编辑技术，可以在特定的 DNA 序列上进行精确的切割和编辑，通过精确检测不同类型的 TNBC 生物标志物，包括 DNA、RNA 和蛋白质，在 TNBC 肿瘤抑制剂、致癌基因和耐药性相关基因的鉴定方面发挥着重要作用。随着多组学的发展，在逐步完善的 TNBC 遗传图谱的前提下，通过融合其他不同的技术，CRISPR/Cas 系统将会为 TNBC 的精准医疗提供更为广阔的空间。

现有研究人员通过分析 TNBC 患者的转录组数据发现，高 CDK7 蛋白表达与不良预后相关<sup>[74]</sup>，并且 TNBC 细胞特异性抑制 CDK7 会导致细胞死亡<sup>[75]</sup>。这提示 CDK7 可作为 TNBC 一个特异性预后因素和潜在的治疗靶点。因此本课题组通过递送 CRISPR/Cas9 的质粒敲除 CDK7，从而探究其对 TNBC 的影响，实验结果证明，CRISPR/Cas9 系统通过敲除 CDK7 不仅显著抑制了 TNBC 细胞的增

殖，而且促进了 TNBC 细胞的凋亡，从而实现对 TNBC 的治疗。此外，未来将 CRISPR/Cas 系统与生物传感器相结合应用于 TNBC，不仅提高检测灵敏度、精准度，而且增加实用性水平。通过这种技术，将可以实现对 TNBC 精准诊断。

然而，CRISPR/Cas 系统在 TNBC 精准医疗中的应用仍然存在许多问题。首先，CRISPR/Cas 系统最主要的问题是存在脱靶风险，即可能错误地编辑非目标基因，导致不可预测和不可控的后果。迄今为止，已经结合人工智能等技术开发了许多方法来提高或检测 CRISPR/Cas 的脱靶位点，这为 CRISPR/Cas 系统在 TNBC 的精准医疗成功应用奠定了基础。其次，通过 CRISPR/Cas 系统研究 TNBC 所获得的新实验数据仍需要进一步验证，包括新的治疗靶点和耐药基因，以及如何建立 CRISPR/Cas 系统数据与传统临床检查技术之间的相关性用于 TNBC 的精准诊断。最后，目前 CRISPR/Cas 系统研发成本昂贵，使得其在 TNBC 的应用中花费不菲。随着技术的不断发展和完善，

CRISPR/Cas 系统价格将逐渐降低, 为更多的 TNBC 患者提供更加精准的医疗。

总体而言, CRISPR/Cas 系统的出现极大地拓宽了我们对 TNBC 的理解, 推动临床诊疗朝着精确医疗的方向发展。随着 CRISPR/Cas 系统的进一步发展和成本逐渐降低, 未来将逐步建立起 CRISPR/Cas 系统数据和大量 TNBC 临床参数的关联性, 实现临床应用转化, 为 TNBC 的精准医疗制定最佳的检测手段和治疗策略。然而, 机遇与挑战共存, 这些应用也面临着技术挑战和伦理法律问题 (如技术的安全性、特异性和潜在的伦理法律问题等), 需要进一步的研究和规范来确保其安全性和有效性。

### 参 考 文 献

- [1] Garcia-Estevez L, Moreno-Bueno G. Updating the role of obesity and cholesterol in breast cancer. *Breast Cancer Res*, 2019, **21**(1): 35
- [2] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, *et al*. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 2021, **71**(3): 209-249
- [3] Penault-Llorca F, Viale G. Pathological and molecular diagnosis of triple-negative breast cancer: a clinical perspective. *Ann Oncol*, 2012, **23**(Suppl 6): vi19-vi22
- [4] Dass S A, Tan K L, Selva Rajan R, *et al*. Triple negative breast cancer: a review of present and future diagnostic modalities. *Medicina (Kaunas)*, 2021, **57**(1): 62
- [5] Yin L, Duan J J, Bian X W, *et al*. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Res*, 2020, **22**(1): 61
- [6] Won K A, Spruck C. Triple-negative breast cancer therapy: current and future perspectives (Review). *Int J Oncol*, 2020, **57**(6): 1245-1261
- [7] Farheen J, Hosmane N S, Zhao R, *et al*. Nanomaterial-assisted CRISPR gene-engineering - A hallmark for triple-negative breast cancer therapeutics advancement. *Mater Today Bio*, 2022, **16**: 100450
- [8] Lu F, Hou Y, Chen Z, *et al*. Efficacy and safety of platinum-based chemotherapy as first-line therapy for metastatic triple-negative breast cancer: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Technol Cancer Res Treat*, 2021, **20**: 15330338211016369
- [9] Kalra M, Tong Y, Jones D R, *et al*. Cisplatin +/- rucaparib after preoperative chemotherapy in patients with triple-negative or BRCA mutated breast cancer. *NPJ Breast Cancer*, 2021, **7**(1): 29
- [10] Yang R, Shi Y Y, Han X H, *et al*. The impact of platinum-containing chemotherapies in advanced triple-negative breast cancer: meta-analytical approach to evaluating its efficacy and safety. *Oncol Res Treat*, 2021, **44**(6): 333-343
- [11] Mittendorf E A, Zhang H, Barrios C H, *et al*. Neoadjuvant atezolizumab in combination with sequential nab-paclitaxel and anthracycline-based chemotherapy versus placebo and chemotherapy in patients with early-stage triple-negative breast cancer (IMpassion031): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet*, 2020, **396**(10257): 1090-1100
- [12] Brufsky A, Kim S B, Zvirbulis Z, *et al*. A phase II randomized trial of cobimetinib plus chemotherapy, with or without atezolizumab, as first-line treatment for patients with locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer (COLET): primary analysis. *Ann Oncol*, 2021, **32**(5): 652-660
- [13] Jiang Y Z, Liu Y, Xiao Y, *et al*. Molecular subtyping and genomic profiling expand precision medicine in refractory metastatic triple-negative breast cancer: the FUTURE trial. *Cell Res*, 2021, **31**(2): 178-186
- [14] Bianchini G, De Angelis C, Licata L, *et al*. Treatment landscape of triple-negative breast cancer—expanded options, evolving needs. *Nat Rev Clin Oncol*, 2022, **19**: 91-113
- [15] Tang Y, Gao L, Feng W, *et al*. The CRISPR-Cas toolbox for analytical and diagnostic assay development. *Chem Soc Rev*, 2021, **50**(21): 11844-11869
- [16] Li H, Xie Y, Chen F, *et al*. Amplification-free CRISPR/Cas detection technology: challenges, strategies, and perspectives. *Chem Soc Rev*, 2023, **52**(1): 361-382
- [17] Makarova K S, Wolf Y I, Alkhnbashi O S, *et al*. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 2015, **13**(11): 722-736
- [18] Makarova K S, Wolf Y I, Koonin E V. The basic building blocks and evolution of CRISPR-CAS systems. *Biochem Soc Trans*, 2013, **41**(6): 1392-1400
- [19] Hille F, Charpentier E. CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2016, **371**(1707): 20150496
- [20] Wang F, Wang L, Zou X, *et al*. Advances in CRISPR-Cas systems for RNA targeting, tracking and editing. *Biotechnol Adv*, 2019, **37**(5): 708-729
- [21] Bhatia S, Pooja, Yadav S K. CRISPR-Cas for genome editing: classification, mechanism, designing and applications. *Int J Biol Macromol*, 2023, **238**: 124054
- [22] Koonin E V, Makarova K S. Origins and evolution of CRISPR-cas systems. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2019, **374**(1772): 20180087
- [23] Makarova K S, Wolf Y I, Iranzo J, *et al*. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nat Rev Microbiol*, 2020, **18**(2): 67-83
- [24] Koonin E V, Makarova K S, Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Microbiol*, 2017, **37**: 67-78
- [25] Makarova K S, Haft D H, Barrangou R, *et al*. Evolution and classification of the CRISPR-cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 2011, **9**(6): 467-477
- [26] Shmakov S, Smargon A, Scott D, *et al*. Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 2017, **15**(3):

- 169-182
- [27] Hryhorowicz M, Lipiński D, Zeyland J. Evolution of CRISPR/cas systems for precise genome editing. *Int J Mol Sci*, 2023, **24**(18): 14233
- [28] Yoshimi K, Takeshita K, Kodera N, *et al.* Dynamic mechanisms of CRISPR interference by *Escherichia coli* CRISPR-Cas3. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 4917
- [29] van Beljouw S P B, Sanders J, Rodríguez-Molina A, *et al.* RNA-targeting CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 2023, **21**(1): 21-34
- [30] Yan W X, Hunnewell P, Alfonse L E, *et al.* Functionally diverse type V CRISPR-Cas systems. *Science*, 2019, **363**(6422): 88-91
- [31] Cox D B T, Gootenberg J S, Abudayyeh O O, *et al.* RNA editing with CRISPR-cas13. *Science*, 2017, **358**(6366): 1019-1027
- [32] Wang Y, Huang C, Zhao W. Recent advances of the biological and biomedical applications of CRISPR/Cas systems. *Mol Biol Rep*, 2022, **49**(7): 7087-7100
- [33] Platt R J, Chen S, Zhou Y, *et al.* CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell*, 2014, **159**(2): 440-455
- [34] Jo N, Sogabe Y, Yamada Y, *et al.* Platforms of *in vivo* genome editing with inducible Cas9 for advanced cancer modeling. *Cancer Sci*, 2019, **110**(3): 926-938
- [35] Xue W, Chen S, Yin H, *et al.* CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. *Nature*, 2014, **514**(7522): 380-384
- [36] Dekkers J F, Whittle J R, Vaillant F, *et al.* Modeling breast cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human breast organoids. *J Natl Cancer Inst*, 2020, **112**(5): 540-544
- [37] Huang Y, Zhang H L, Li Z L, *et al.* FUT8-mediated aberrant N-glycosylation of B7H3 suppresses the immune response in triple-negative breast cancer. *Nat Commun*, 2021, **12**(1): 2672
- [38] Djomehri S I, Gonzalez M E, da Veiga Leprevost F, *et al.* Quantitative proteomic landscape of metaplastic breast carcinoma pathological subtypes and their relationship to triple-negative tumors. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 1723
- [39] Dai M, Yan G, Wang N, *et al.* *In vivo* genome-wide CRISPR screen reveals breast cancer vulnerabilities and synergistic mTOR/Hippo targeted combination therapy. *Nat Commun*, 2021, **12**(1): 3055
- [40] Borri F, Granaglia A. Pathology of triple negative breast cancer. *Semin Cancer Biol*, 2021, **72**: 136-145
- [41] Lu X X, Yang W X, Pei Y C, *et al.* An *in vivo* CRISPR screen identifies that SNRPC promotes triple-negative breast cancer progression. *Cancer Res*, 2023, **83**(12): 2000-2015
- [42] Ji P, Gong Y, Jin M L, *et al.* *In vivo* multidimensional CRISPR screens identify *Lgals2* as an immunotherapy target in triple-negative breast cancer. *Sci Adv*, 2022, **8**(26): eabl8247
- [43] Kaminski M M, Abudayyeh O O, Gootenberg J S, *et al.* CRISPR-based diagnostics. *Nat Biomed Eng*, 2021, **5**(7): 643-656
- [44] Pardee K, Green A A, Takahashi M K, *et al.* Rapid, low-cost detection of Zika virus using programmable biomolecular components. *Cell*, 2016, **165**(5): 1255-1266
- [45] Chen J S, Ma E, Harrington L B, *et al.* CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*, 2018, **360**(6387): 436-439
- [46] Kellner M J, Koob J G, Gootenberg J S, *et al.* Author Correction: SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases. *Nat Protoc*, 2020, **15**(3): 1311
- [47] Wang M, Chen K, Wu Q, *et al.* RCasFISH: CRISPR/dCas9-mediated *in situ* imaging of mRNA transcripts in fixed cells and tissues. *Anal Chem*, 2020, **92**(3): 2468-2475
- [48] Arimura A, Sakai K, Kaneshiro K, *et al.* TP53 and/or BRCA1 mutations based on CtDNA analysis as prognostic biomarkers for primary triple-negative breast cancer. *Cancers*, 2024, **16**(6): 1184
- [49] Choi J H, Lim J, Shin M, *et al.* CRISPR-Cas12a-based nucleic acid amplification-free DNA biosensor via Au nanoparticle-assisted metal-enhanced fluorescence and colorimetric analysis. *Nano Lett*, 2021, **21**(1): 693-699
- [50] Cao G, Chen X, Deng Y, *et al.* Single-nucleotide variant of *PIK3CA*<sup>H1047R</sup> gene assay by CRISPR/Cas12a combined with rolling circle amplification. *Anal Chim Acta*, 2021, **1182**: 338943
- [51] Wang T, Peng Q, Guo B, *et al.* An integrated electrochemical biosensor based on target-triggered strand displacement amplification and “four-way” DNA junction towards ultrasensitive detection of PIK3CA gene mutation. *Biosens Bioelectron*, 2020, **150**: 111954
- [52] Hannafon B N, Cai A, Calloway C L, *et al.* MiR-23b and miR-27b are oncogenic microRNAs in breast cancer: evidence from a CRISPR/Cas9 deletion study. *BMC Cancer*, 2019, **19**(1): 642
- [53] Gao L, Zhang J, Long Q, *et al.* SETD7 promotes metastasis of triple-negative breast cancer by YY1 lysine methylation. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2023, **1869**(7): 166780
- [54] Cyranoski D. Chinese scientists to pioneer first human CRISPR trial. *Nature*, 2016, **535**(7613): 476-477
- [55] Nguyen K, Yan Y, Yuan B, *et al.* ST8SIA1 regulates tumor growth and metastasis in TNBC by activating the FAK-AKT-mTOR signaling pathway. *Mol Cancer Ther*, 2018, **17**(12): 2689-2701
- [56] Wu W, Qian L, Chen X, *et al.* Prognostic significance of CXCL12, CXCR4, and CXCR7 in patients with breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, **8**(10): 13217-13224
- [57] Yang M, Zeng C, Li P, *et al.* Impact of CXCR4 and CXCR7 knockout by CRISPR/Cas9 on the function of triple-negative breast cancer cells. *Onco Targets Ther*, 2019, **12**: 3849-3858
- [58] Bolt M J, Stossi F, Callison A M, *et al.* Systems level-based RNAi screening by high content analysis identifies UBR5 as a regulator of estrogen receptor- $\alpha$  protein levels and activity. *Oncogene*, 2015, **34**(2): 154-164
- [59] Liao L, Song M, Li X, *et al.* E3 ubiquitin ligase UBR5 drives the growth and metastasis of triple-negative breast cancer. *Cancer Res*, 2017, **77**(8): 2090-2101
- [60] Shaath H, Vishnubalaji R, Elango R, *et al.* Single-cell long noncoding RNA (lncRNA) transcriptome implicates MALAT1 in triple-negative breast cancer (TNBC) resistance to neoadjuvant chemotherapy. *Cell Death Discov*, 2021, **7**(1): 23
- [61] Mintz R L, Lao Y H, Chi C W, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis to validate the synergy between PARP1 inhibition and

- chemotherapy in *BRCA1*-mutated breast cancer cells. *Bioeng Transl Med*, 2020, **5**(1): e10152
- [62] Kansara S, Pandey V, Lobie P E, *et al.* Mechanistic involvement of long non-coding RNAs in oncotherapeutics resistance in triple-negative breast cancer. *Cells*, 2020, **9**(6): 1511
- [63] Guo P, Yang J, Huang J, *et al.* Therapeutic genome editing of triple-negative breast tumors using a noncationic and deformable nanolipogel. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, **116**(37): 18295-18303
- [64] She W, Li H, Wang Z, *et al.* Site-specific controlled-release nanoparticles for immune reprogramming *via* dual metabolic inhibition against triple-negative breast cancer. *J Control Release*, 2024, **366**: 204-220
- [65] Rosenblum D, Gutkin A, Dammes N, *et al.* Progress and challenges towards CRISPR/Cas clinical translation. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020, **154/155**: 176-186
- [66] Brokowski C, Adli M. CRISPR ethics: moral considerations for applications of a powerful tool. *J Mol Biol*, 2019, **431**(1): 88-101
- [67] Zhang H, Gao H, Gu Y, *et al.* 3D CRISPR screen in prostate cancer cells reveals PARP inhibitor sensitization through TBL1XR1-SMC3 interaction. *Front Oncol*, 2022, **12**: 999302
- [68] Ardhanareeswaran K, Mariani J, Coppola G, *et al.* Human induced pluripotent stem cells for modelling neurodevelopmental disorders. *Nat Rev Neurol*, 2017, **13**(5): 265-278
- [69] Liao H K, Gu Y, Diaz A, *et al.* Use of the CRISPR/Cas9 system as an intracellular defense against HIV-1 infection in human cells. *Nat Commun*, 2015, **6**: 6413
- [70] De Masi C, Spitalieri P, Murdocca M, *et al.* Application of CRISPR/Cas9 to human-induced pluripotent stem cells: from gene editing to drug discovery. *Hum Genomics*, 2020, **14**(1): 25
- [71] Santinha A J, Klingler E, Kuhn M, *et al.* Transcriptional linkage analysis with *in vivo* AAV-Perturb-seq. *Nature*, 2023, **622**(7982): 367-375
- [72] Replogle J M, Saunders R A, Pogson A N, *et al.* Mapping information-rich genotype-phenotype landscapes with genome-scale Perturb-seq. *Cell*, 2022, **185**(14): 2559-2575.e28
- [73] Doench J G, Fusi N, Sullender M, *et al.* Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol*, 2016, **34**(2): 184-191
- [74] Li B, Ni Chonghaile T, Fan Y, *et al.* Therapeutic rationale to target highly expressed CDK7 conferring poor outcomes in triple-negative breast cancer. *Cancer Res*, 2017, **77**(14): 3834-3845
- [75] Wang Y, Zhang T, Kwiatkowski N, *et al.* CDK7-dependent transcriptional addiction in triple-negative breast cancer. *Cell*, 2015, **163**(1): 174-186

## Application of CRISPR/Cas System in Precision Medicine for Triple-negative Breast Cancer\*

LIN Hui-Ling<sup>1,2)\*\*</sup>, OUYANG Yu-Xin<sup>2)\*\*</sup>, TANG Wan-Ying<sup>2)</sup>, HU Mi<sup>3)</sup>, PENG Mao<sup>1)</sup>,  
HE Ping-Ping<sup>4)\*\*\*</sup>, OUYANG Xin-Ping<sup>1)\*\*\*</sup>

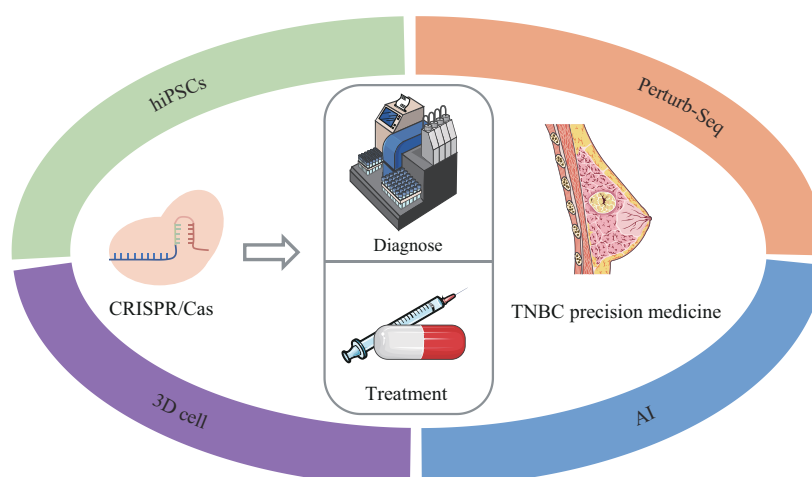
<sup>(1)</sup>Department of Physiology, Medical College of Hunan Normal University, Changsha 410081, China;

<sup>(2)</sup>Department of Physiology, Institute of Neuroscience Research, Hengyang Key Laboratory of Neurodegeneration and Cognitive Impairment, University of South China, Hengyang 421001, China;

<sup>(3)</sup>Changsha Youlong Robot Co., Ltd., Changsha 410221, China;

<sup>(4)</sup>Department of Nursing, School of Medicine, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

### Graphical abstract



**Abstract** Triple-negative breast cancer (TNBC) represents a distinctive subtype, characterized by the absence of estrogen receptors, progesterone receptors, and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2). Due to its high inter-tumor and intra-tumor heterogeneity, TNBC poses significant challenges for personalized diagnosis and treatment. The advent of clustered regular interspaced short palindromic repeats (CRISPR) technology has profoundly enhanced our understanding of the structure and function of the TNBC genome, providing a powerful tool for investigating the occurrence and development of diseases. This review focuses on the application of CRISPR/Cas technology in the personalized diagnosis and treatment of TNBC. We begin by discussing the unique attributes of TNBC and the limitations of current diagnostic and treatment approaches: conventional diagnostic

\* This work was supported by a grant from Hunan Provincial Natural Science Foundation General Project (2023JJ30426).

\*\* These authors contributed equally to this work.

\*\*\* Corresponding author.

HE Ping-Ping. Tel: 86-734-8281671, E-mail: hpp-612@163.com

OUYANG Xin-Ping. Tel: 86-734-8281389, E-mail: y1655@163.com

Received: April 7, 2024 Accepted: September 3, 2024

methods provide limited insights into TNBC, while traditional chemotherapy drugs are often associated with low efficacy and severe side effects. The CRISPR/Cas system, which activates Cas enzymes through complementary guide RNAs (gRNAs) to selectively degrade specific nucleic acids, has emerged as a robust tool for TNBC research. This technology enables precise gene editing, allowing for a deeper understanding of TNBC heterogeneity by marking and tracking diverse cell clones. Additionally, CRISPR facilitates high-throughput screening to promptly identify genes involved in TNBC growth, metastasis, and drug resistance, thus revealing new therapeutic targets and strategies. In TNBC diagnostics, CRISPR/Cas was applied to develop molecular diagnostic systems based on Cas9, Cas12, and Cas13, each employing distinct detection principles. These systems can sensitively and specifically detect a variety of TNBC biomarkers, including cell-specific DNA/RNA and circulating tumor DNA (ctDNA). In the realm of precision therapy, CRISPR/Cas has been utilized to identify key genes implicated in TNBC progression and treatment resistance. CRISPR-based screening has uncovered potential therapeutic targets, while its gene-editing capabilities have facilitated the development of combination therapies with traditional chemotherapy drugs, enhancing their efficacy. Despite its promise, the clinical translation of CRISPR/Cas technology remains in its early stages. Several clinical trials are underway to assess its safety and efficacy in the treatment of various genetic diseases and cancers. Challenges such as off-target effects, editing efficiency, and delivery methods remain to be addressed. The integration of CRISPR/Cas with other technologies, such as 3D cell culture systems, human induced pluripotent stem cells (hiPSCs), and artificial intelligence (AI), is expected to further advance precision medicine for TNBC. These technological convergences can offer deeper insights into disease mechanisms and facilitate the development of personalized treatment strategies. In conclusion, the CRISPR/Cas system holds immense potential in the precise diagnosis and treatment of TNBC. As the technology progresses and becomes more costs-effective, its clinical relevance will grow, and the translation of CRISPR/Cas system data into clinical applications will pave the way for optimal diagnosis and treatment strategies for TNBC patients. However, technical hurdles and ethical considerations require ongoing research and regulation to ensure safety and efficacy.

**Key words** CRISPR technology, triple-negative breast cancer, precision medicine

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2024.0146

**CSTR:** 32369.14.pibb.20240146