

CRISPR技术在肿瘤学精准诊疗领域的研究进展

邓继婷*, 韩媛媛, 肖 威#, 曹东林#

暨南大学附属广东省第二人民医院检验医学科, 广东 广州

收稿日期: 2024年12月15日; 录用日期: 2025年1月8日; 发布日期: 2025年1月20日

摘 要

CRISPR基因编辑技术通过精准定位和编辑特定基因序列, 可以识别与肿瘤细胞生长、增殖、分化、侵袭和耐药性相关的基因, 简化并高效推进肿瘤的分子机制研究, 被广泛地应用于精准肿瘤学研究当中, 包括用于检测肿瘤源性的生物标志物、肿瘤异质性分析、工程化改造免疫细胞, 以及构建肿瘤疾病模型等。尽管CRISPR/Cas基因编辑技术在肿瘤诊疗领域展现出了巨大潜力, 但仍需面对脱靶效应、递送效率低等瓶颈。文中就目前CRISPR技术在肿瘤学精准诊疗领域的最新进展进行综述。

关键词

CRISPR/Cas系统, 基因编辑技术, 肿瘤学, 精准诊疗, 脱靶效应

Research Progress of CRISPR Technology for Accurate Diagnosis and Treatment in Oncology

Jiting Deng*, Yuanyuan Han, Wei Xiao#, Donglin Cao#

Department of Laboratory Medicine, The Affiliated Guangdong Second Provincial General Hospital of Jinan University, Guangzhou Guangdong

Received: Dec. 15th, 2024; accepted: Jan. 8th, 2025; published: Jan. 20th, 2025

Abstract

CRISPR gene editing technology can identify genes associated with tumor cell growth, proliferation,

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 邓继婷, 韩媛媛, 肖威, 曹东林. CRISPR 技术在肿瘤学精准诊疗领域的研究进展[J]. 临床医学进展, 2025, 15(1): 787-796. DOI: 10.12677/acm.2025.151106

differentiation, invasion, and drug resistance by precisely targeting and editing specific gene sequences, simplifying and efficiently advancing the study of molecular mechanisms of tumors, and has been widely used in precision oncology research, including for detecting tumor-derived biomarkers, analyzing tumor heterogeneity, engineering modified immune cells, and constructing tumor disease models, etc. Although CRISPR/Cas gene editing technology has shown great potential in the field of tumor diagnosis and treatment, it still needs to face bottlenecks such as off-target effects and low delivery efficiency. The paper provides an overview of the current state-of-the-art of CRISPR technology in the field of accurate diagnosis and treatment in oncology.

Keywords

CRISPR/Cas System, Gene Editing Technology, Oncology, Accurate Diagnosis and Treatment, Off-Target Effect

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. CRISPR 技术在肿瘤诊疗领域的应用前景

根据国家癌症中心(National Cancer Center, NCC)发布的最新数据, 2022 年中国新发癌症病例约为 482.47 万例, 同时有 257.42 万例癌症死亡病例, 令人担忧的是, 癌症的发病率正逐渐向年轻群体扩散, 呈现出明显的年轻化趋势[1]。当前, 肿瘤的诊断技术涵盖了多种方法, 包括影像学诊断(如 MRI、CT)、肿瘤标志物检测、细胞学与分子学检测以及人工智能(AI)辅助诊断工具。尽管如此, 确诊仍依赖于病理活检技术。然而, 上述诊断手段存在一定的局限性, 例如影像学诊断在探测深部器官肿瘤方面存在限制, 且部分肿瘤在影像上的表现难以界定(图 1), 导致诊断上的困难, 从而引发误诊或漏诊。病理活检技术亦存在取材偏差, 可能取到癌旁或非癌组织, 且在诊断交界性病变或肿瘤时不确定性较大。正如所言, “任何事物都不可能非此即彼, 肿瘤的本质也不可能全然分为良性和恶性” [2], 且目前肿瘤的病理诊断仍然缺乏严格的客观标准[3]。当前肿瘤治疗策略主要包括外科手术、放射治疗、化学治疗、靶向药物治疗以及免疫治疗等多种方式。然而, 肿瘤内部的异质性及其引发的耐药性问题, 持续对患者构成严峻挑战, 导致治疗过程中病情恶化乃至死亡, 显著影响了患者的总体生存期[4]。因此, 迫切需求一种创新的检测技术, 以应用于肿瘤的诊断与治疗领域, 以克服活检技术及其他辅助诊断技术的局限性, 为肿瘤患者提供更为精准的诊疗方案, 延长其生存期, 并提升其生活质量。

规律成簇的间隔短回文重复序列(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR)是许多细菌和古细菌中的一种应对入侵的免疫机制, 由 Ishino 及其同事于 1987 年在大肠杆菌的基因组发现, CRISPR 及 CRISPR 相关蛋白(CRISPR associated proteins, Cas 蛋白)被称为 CRISPR/Cas 系统, 其作为分子剪刀破坏入侵的核酸[5], 并且具备精确靶向编辑基因组特定区域的能力。该技术能够高效快速地实现基因敲除, 调节内源基因表达, 具有简便性、经济性和高效性等优势[6]。其可分为 2 大类群、6 个种群和 33 个亚型(表 1)。其作用分为适应、表达和干扰三个阶段: 适应阶段整合外源 DNA 形成新间隔序列; 表达阶段转录和加工前 crRNA; 干扰阶段 crRNA-Cas 蛋白复合物切割目标 DNA。当 crRNA-Cas 蛋白复合物识别到目标序列时, Cas 蛋白会切割靶标[7] (图 2)。SpCas9 是首个被改造用于基因编辑的 Cas 核酸酶, 其具备高活性和特异性, 是目前使用最广泛的基因编辑器[8]。紧随其后, Cas12a 也被证明是一种能够进行精确基因编辑的高效核酸酶[9], 其具有靶向 DNA 激活的 DNase 活性, 可以利用单个 RuvC 结构域催化位点以顺序方式切割靶位点 PAM 远端部分的两条链以及反式切割额外的单链 DNA (ssDNA)

底物。与此同时，Cas13 具有靶向 RNA 激活的底物 RNase 活性[10]，其为新兴的生物技术和治疗应用提供了强大的 RNA 靶向、编辑、检测和成像平台。

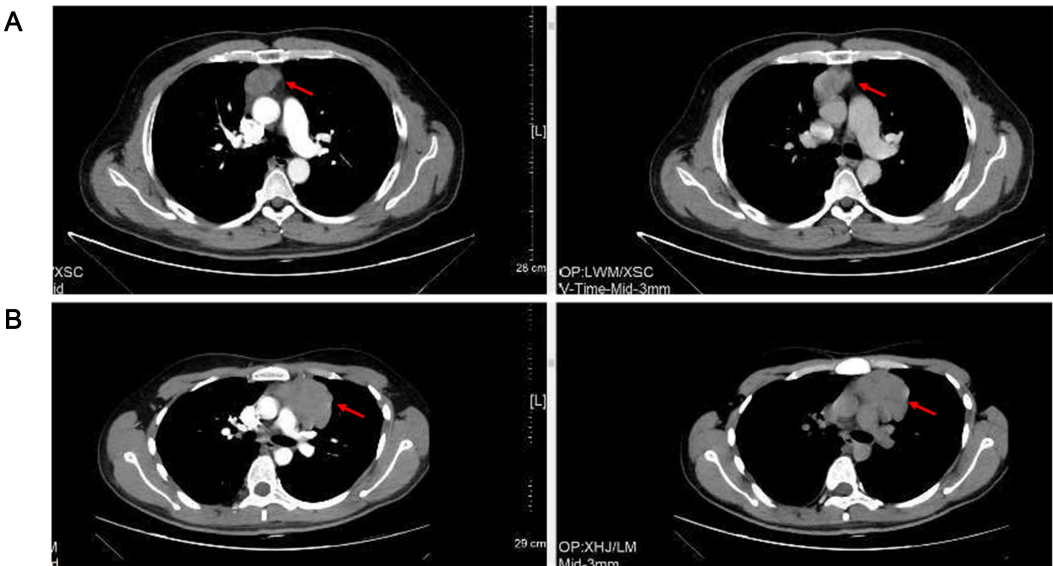


Figure 1. CT images of the tumors: A- Neuroendocrine tumor, B- Thymoma
图 1. 肿瘤的 CT 图像：A-神经内分泌肿瘤，B-胸腺瘤

Table 1. Classification and characteristics of CRISPR/Cas systems
表 1. CRISPR/Cas 系统的分类及特征

Class	Type	Subtype	PAM	Characteristic proteins	Target	Effect templates	References
Class I	I	A, B, C, D, E, F, G	-	Cas3	DNA	HD	[13]
	III	A, B, C, D, E, F	GTH	Cas10	DNA/RNA	HD	[14]
	IV	A, B, C	-	Cas5, Cas7	RNA	-	[15]
Class II	II	A, B, C	NGG	Cas9	DNA	HNH, RUVc	[15]
	V	A, B, C, D, E, F, G, H, I, K	TTTN	Cas12/14	DNA	RUVc	[15]-[17]
	VI	A, B, C, D	PFS	Cas13	RNA	HEPN	[10] [15]

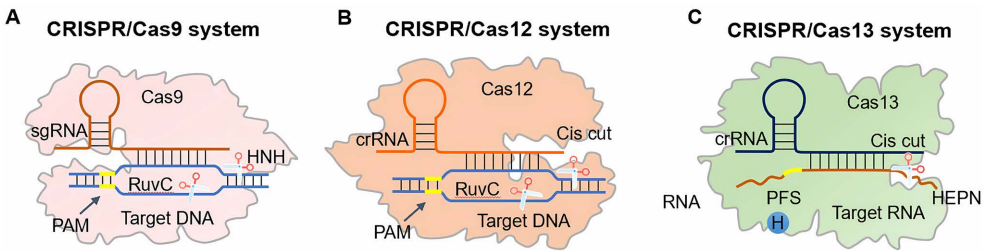


Figure 2. Schematic diagram of the mechanism of action of the CRISPR/Cas system
图 2. CRISPR/Cas 系统作用机制示意图

CRISPR 技术作为一种具有划时代意义的基因编辑工具，凭借其多功能性、高效性和可编程性，在功能基因筛选、肿瘤细胞凋亡诱导以及肿瘤免疫治疗等领域得到了广泛的应用。近期，研究者们通过运用 CRISPR/Cas9 系统对人黑色素瘤和结肠癌细胞系中的 uPAR 基因进行敲除，成功地延长了患者的生存期

[11]。并且在 2023 年 12 月,美国 FDA 批准了首款基于 CRISPR 的基因编辑疗法上市,用于治疗镰状细胞病(SCD) [12]。这表明 CRISPR 可以真正有意义地解决患者面临的挑战性问题。因此,相信随着 CRISPR/Cas 技术的快速发展,该技术有望成为肿瘤学研究领域中不可或缺的关键工具,并预期将显著提高肿瘤患者的临床存活期。

2. CRISPR 技术在肿瘤学诊疗领域的应用进展

2.1. 检测肿瘤源性的生物标志物

肿瘤标志物是指特征性存在于恶性肿瘤细胞,或由恶性肿瘤细胞分泌的物质,或是由宿主对肿瘤刺激所引发的物质反应,能反映肿瘤发生、发展的过程,监测肿瘤对治疗的反应[18]。

在三阴性乳腺癌(Triple-Negative Breast Cancer, TNBC)的研究过程中, Wang 利用 CRISPR/dCas9-MS2 的 RNA 荧光原位杂交分析技术,对乳腺癌患者体内的 HER2 mRNA 进行精确定量分析,从而有效监测乳腺癌发生发展过程及预测治疗效果[19]。近年来,许多研究表明,液体活检技术可以检测出由肿瘤脱落的生物标志物,包括循环肿瘤 DNA(ctDNA)、循环肿瘤细胞(CTCs)和外泌体。这些生物标志物可以提供肿瘤的遗传信息,有助于肿瘤的早期诊断[20][21]。Zhang 成功运用 CRISPR/Cas12a 技术,实现了对循环肿瘤细胞(CTCs)的精确定量,这一方法对于监测肿瘤进展具有重要意义[22]。Guan 利用 CRISPR 技术检测肿瘤相关阳性外泌体的相对丰度,实现了乳腺癌的早期筛查[23]。Guan 团队研发了一种基于 CRISPR/Cas13 的酶促循环扩增系统,该系统能够以高灵敏度和高保真度检测 miRNA,其检测下限可达 83.2 fM,展现出极高的灵敏性[24]。以上研究强调了 CRISPR 技术在肿瘤早期检测与诊断中的核心地位,并为肿瘤标志物的进一步应用拓展了新的研究前景。然而,在肿瘤的早期阶段,生物标志物的浓度较低,现行检测技术的灵敏度难以满足要求,并且 CRISPR 技术的脱靶效应(off-target effect)可能引发细胞内其他基因稳定性受损,进而触发非预期的细胞生物学反应,为肿瘤基因治疗带来挑战。

CRISPR 技术同样揭示了肿瘤抑制因子和相关变异基因的免疫逃逸机制。有研究表明,肿瘤的发生发展与 p53 突变引起的功能障碍密切相关[25]。Wang 等人利用 CRISPR/Cas12a 技术实现对 P53 基因的早期检测,从而有效遏制肿瘤的发展进程[26]。Zhang 建立了一种基于 CRISPR/Cas12a 系统的双模态生物传感器,检测特定非小细胞肺癌(NSCLC)患者的表皮生长因子受体(EGFR)突变 L858R,成功应用于 NSCLC 的早期检测[27]。有研究证明,USP15 或 SCAF1 的缺失导致炎症 TNF- α 、TGF- β 和 IL6 反应减少,对 PARP (poly ADP-ribose polymerase)抑制剂和吉西他滨的敏感性增加,揭示了 USP15 和 SCAF1 作为胰腺肿瘤抑制因子的作用[28]。Alayoubi 等研究者运用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术,证实了 BCL11A 和 LRF 基因与血红蛋白病的关联性,并展示了通过基因敲除手段实现治疗该类疾病的潜力[29]。此外, Boumelha 通过广泛的 CRISPR 筛选揭示了致癌性 KRAS 突变抑制干扰素(IFN)通路信号的能力,这可能是 KRAS 突变型肺腺癌免疫逃逸的关键机制[30]。显然,CRISPR 基因编辑技术具备高效检测和早期筛查与肿瘤相关功能基因的能力,能够明确肿瘤的功能因子、变异基因的逃逸机制,进一步扩展其在癌症相关基因研究领域的应用。然而,CRISPR 技术可能引发 DNA 双链断裂损伤,潜在地诱发染色体碎裂(chromothripsis),进而影响正常细胞功能。若要实现其在临床常规检测中的广泛应用,尚需解决靶向切割效率的问题。

2.2. 肿瘤异质性分析

单一细胞未必仅受单一基因模块表达的限制,而是多个模块共同作用以展现一系列的表型特征[31],肿瘤细胞的形成也是由基因表达的异质性所驱动,这些基因表达模式的不同组合导致了肿瘤细胞功能和形态的多样性[4]。Guo 等人发现原发性肝癌具有肿瘤内遗传异质性(Intra-tumor genetic heterogeneity, ITH),导致其临床治疗效果不佳。并证实携带 TSGs 点突变的小 ecc DNAs 是肝癌异质性产生的潜在来源[32]。

由于肿瘤内部存在不同的细胞亚群，它们在生长速度、侵袭能力、对药物的敏感性等方面存在差异[33]。综上可知，通过 CRISPR 技术进行肿瘤异质性分析，可以更明确肿瘤生长的动态演变过程、耐药机制的形成机制及肿瘤发展的多元化，有助于临床医生及时调整治疗方案，实现个性化治疗，有望进一步提升肿瘤精准诊疗的水平。

2.3. 诱导肿瘤细胞凋亡

研究发现，通过 CRISPR - Cas9 基因编辑技术可敲除转移性黑色素瘤和结直肠癌 TILs 中的 PD-1，从而诱导肿瘤细胞凋亡，发挥抑制肿瘤生长的作用[34]。一项新的研究证明利用 CRISPR/Cas9 质粒来抑制 CSCs (癌症干细胞)中的 hedgehog 信号通路和胸苷酸合成途径，能够协同促进大量细胞凋亡，显著提升了实验组治疗小鼠的健康状况[35]。此外，Wang 构建了一种肿瘤特异性激活的 nano-domino-CRISPR (TAN) 系统，旨在放大内源性氧化应激并激活内源性凋亡途径。研究结果显示，实验组的 Bcl-2 基因表达明显下调，GSH 含量的大幅减少，并触发了内源性凋亡，从而降低了肿瘤的表达水平[36]。可见，CRISPR 技术能精确敲除肿瘤细胞的变异基因，抑制其生长，改善治疗效果和患者生存质量。但由于肿瘤机制复杂，目前尚未有明确的案例证明通过 CRISPR 技术可以完全治愈肿瘤。

2.4. 增强 T 细胞对肿瘤的免疫反应能力

过继细胞疗法(Adoptive Cell Therapy, ACT)是一种利用免疫细胞，尤其是 T 细胞，来对抗肿瘤细胞的免疫治疗方法。主要包括嵌合抗原受体(Chimeric Antigen Receptor, CAR)-T 细胞疗法和转基因 T 细胞受体(T Cell Receptor, TCR)-T 细胞疗法。TCR-T 细胞疗法因其靶向抗原的范围有限，且依赖于主要组织相容性复合体(Major Histocompatibility Complex, MHC)分子来提呈抗原。肿瘤细胞有时会通过降低 MHC 分子的表达来规避免疫系统的攻击，这构成了该疗法的一个主要障碍。相比之下，CAR-T 细胞疗法不依赖 MHC 识别抗原，解决了供体和受体之间人类白细胞抗原(Human Leukocyte Antigen, HLA)的兼容性问题，并扩展了 ACT 在临床治疗中的应用范围[37]。

相关研究表明，利用 CRISPR 系统将 CAR 定向整合至 TRAC 位点，能够防止补体 CAR 信号的传导，有效推迟效应 T 细胞的分化和耗竭过程，同时减少 CAR-T 细胞的自身反应性和异体反应性风险。通过 CRISPR 基因编辑技术，可以同时 TRAC 和 T 细胞受体恒定 β 链(CAS)位点进行编辑，在大量 CD8⁺ T 细胞中实现有效的双敲除[38]。一项针对多发性骨髓瘤的研究揭示经过基因编辑的 T 细胞群展现出更显著的 TCR 表达水平，增强了对肿瘤抗原的识别能力，并显著抑制了肿瘤的生长[38]。在 2020 年开展的一项 I 期临床试验中，研究者应用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术对 T 细胞进行改造，针对 TRAC、TRBC 和 PDCD1 基因进行特异性编辑，并引入了 NY-ESO-1 特异性 TCR 转基因，旨在降低 TCR 错配现象并提升抗肿瘤免疫反应的效能。研究结果揭示，经过基因改造的 T 细胞在患者体内能够持续存活长达九个月。该研究结果证实，通过整合 TCR 转移与 CRISPR 技术，有望开发出更为高效且安全性更高的肿瘤免疫治疗策略[39]。未来的研究将着重于提高 CRISPR/Cas 系统的靶向效应，并提高治疗的安全性和效率。同时，临床试验的扩大和长期跟踪研究将有助于评估这些疗法的长期疗效和潜在风险，为 CRISPR 技术在肿瘤免疫治疗中的应用提供更全面的科学依据。

2.5. 肿瘤治疗药物的体内递送

目前常用的 CRISPR 组件递送方法包括病毒载体递送、脂质体递送和纳米粒子递送，以及外泌体递送系统等。根据最新消息，单一次通过头颅直接给药的方式使用针对 PLK1 基因的 CRISPR-LNPs 治疗技术在攻击性的原位胶质前体细胞瘤治疗中，可以达到大约 70% 的基因修正效果，随后引发癌细胞的死亡，

并有效地减缓了肿瘤扩展的速度,降幅高达 50% [40]。当前,研究者们已经成功地通过外泌体递送,将激酶抑制剂索拉非尼与 CRISPR 技术相结合,针对 IQ 结构域的 GTP 酶激活蛋白 1 (IQGAP1)进行靶向治疗。研究发现,将 CRISPR 技术与靶向药物相结合,能够显著提升药物在诱导肝癌细胞凋亡和抑制其生长方面的效能[41]。Ye 及其研究团队亦成功展示了利用外泌体递送 sg RNA 的技术,为 CRISPR-Cas9 系统的临床应用提供了另一种可行的替代方案[42]。因此,外泌体作为 CRISPR 基因编辑系统的载体,在肿瘤治疗领域扮演着关键角色,但由于缺乏高质量的分离和成分分析方法,其进一步临床应用受到了很大的限制[43]。并且运送载体面临着载药难、稳定性差、免疫原性高以及生产制备困难等困境,仍需进一步研究。

2.6. 验证药物靶点

IPSEN 及其研究团队运用全基因组 CRISPR-Cas9 敲除筛选技术,成功鉴别出在去势抵抗性前列腺癌 (CRPC)中参与聚 ADP-核糖聚合酶抑制剂(PARPi)抗性的基因,以及六个与奥拉帕尼抗性相关的潜在候选基因。该研究验证了 PARP1、ARH3、YWHAE 和 UBR5 基因的缺失会导致对奥拉帕尼产生耐药性,并进一步揭示了 PARP1 或 ARH3 基因的敲除可能会导致对其他 PARP 抑制剂(如 veliparib 和尼拉帕利)的交叉耐药性[44]。Megan Ludwig 的研究验证了全基因组 CRISPR/Cas9 技术在阐释头颈鳞状细胞癌(HNSCC)耐药机制方面的有效性。该研究指出,应将 NOTCH1 状态作为评估顺铂反应的生物标志物,并且证实了完全敲除 NOTCH1 或抑制 NOTCH1 信号足以使细胞系对顺铂产生敏感性[45]。Deng 运用全基因组 CRISPR/Cas9 技术,在小细胞肺癌细胞中沉默 CDC7 基因,结果表明该操作能够降低 IC50 值,并且增强了化疗药物的疗效[46]。这些研究成果揭示了 CRISPR 技术在确定肿瘤药物作用靶点方面发挥的关键作用,为临床药物应用奠定了坚实的基础。未来可将 CRISPR 技术整合到高通量筛选中,可以更有效地识别和验证新药物靶点,增加突破性疗法的潜力。

2.7. 构建疾病模型

细胞模型因其实验周期短暂、遗传特征清晰、结论易于获得等优势,深受研究者们青睐[47]。George 研究小组为探寻成神经细胞瘤预后不佳与 ATRX 基因变异之间的联系,运用 CRISPR-Cas9 工具结合同源直接修复技术,成功构建了含 ATRX 基因突变的成神经细胞瘤细胞模型,提出并发展了一系列针对成神经细胞瘤的革新治疗方案[48]。此外,Hansen 利用小鼠胚胎和成年小肠类器官,揭示了胚胎和成年状态之间的转录差异,并通过 CRISPR 技术筛选胎儿类器官中表达的转录调控因子,发现 Smarca4 和 Smarcc1 是维持未成熟祖细胞状态的重要因子[49]。CRISPR 技术的应用能够构建具有巨大潜力的疾病模型,优化肿瘤的现行治疗策略,并为癌症治疗领域带来新的希望。

3. CRISPR 技术的局限性

3.1. 脱靶效应

核酸的非预期结合、修饰与裂解对遗传操作技术构成了挑战。相较于小分子药物或抗体疗法可能引起的脱靶相互作用导致的副作用,基因组编辑的持久性使得脱靶 Cas 核酸酶活性的问题尤为严重[50]。这进一步强化了核酸酶特异性和靶向递送的必要性。目前,研究人员在进化和改造 Cas 酶或 sgRNA 以提升核酸酶特异性方面已取得显著成就。Masaki Kawamat 研究团队发现,在传统导向 RNA (gRNA)的 5'末端附加胞嘧啶(C)扩展能够限制 Cas9 核酸酶的基因组编辑活性,从而提升 CRISPR 基因编辑的安全性和实用性。该护卫导向 RNA (safeguard gRNA)策略同样适用于 Cas12a,以及 CRISPR 激活(CRISPRa)和 CRISPR 抑制(CRISPRi)技术[51]。有研究团队通过在 Cas 蛋白酶的多个结构域中恰当地引入多个氨基酸的替代,

构建了具有增强 DNA 切割特异性的潜在高保真变体,从而进一步提升了切割效率,并减少了预期的脱靶效应[52]。此外,预测靶向结果与实现时空基因调控的稳定方法,提供了减少脱靶效应的综合策略。除了对 Cas 核酸酶进行改良之外,研究人员亦致力于深入探究细胞 DNA 修复机制,旨在提升预期编辑结果的几率。

3.2. 递送效率低

提升载体运输效率,确保 Cas 有效载荷的特异性传递,目前仍为该研究领域中的关键难题[50]。尽管利用病毒作为基因递送载体具有较高的传递效率,但其可能激发宿主的免疫反应,同时存在载量限制,并且会降低 CRISPR 系统组件的基因编辑效率。非病毒递送方法安全性更高,但也同样存在递送效率相对较低的问题[53]。递送介质需要保护“CRISPR 货物”在从血管外渗的过程中不被降解,避免调理作用和吞噬作用,继而高效穿过组织间隙,最终通过内吞作用高效释放货物,释放后需要定位并靶向染色体的目标位点,都有一系列困难需要基因工程设计和创新加以攻克。并且与导向 RNA 结合的 Cas 核酸酶的大尺寸对运送载体的包装提出了更严苛的挑战[54]。当前,针对该问题的关键策略之一是使用尺寸较小的 Cas 同源蛋白。这些微型 Cas 同源蛋白在基因组编辑过程中展现出其独特优势,能够精确地靶向特定基因序列并执行有效的编辑任务。通过精选这些尺寸较小的 Cas 同源蛋白,研究者们能够在基因组中实现更高的特异性与更低非特异性结合(脱靶效应),进而提升基因编辑的精确度与安全性。

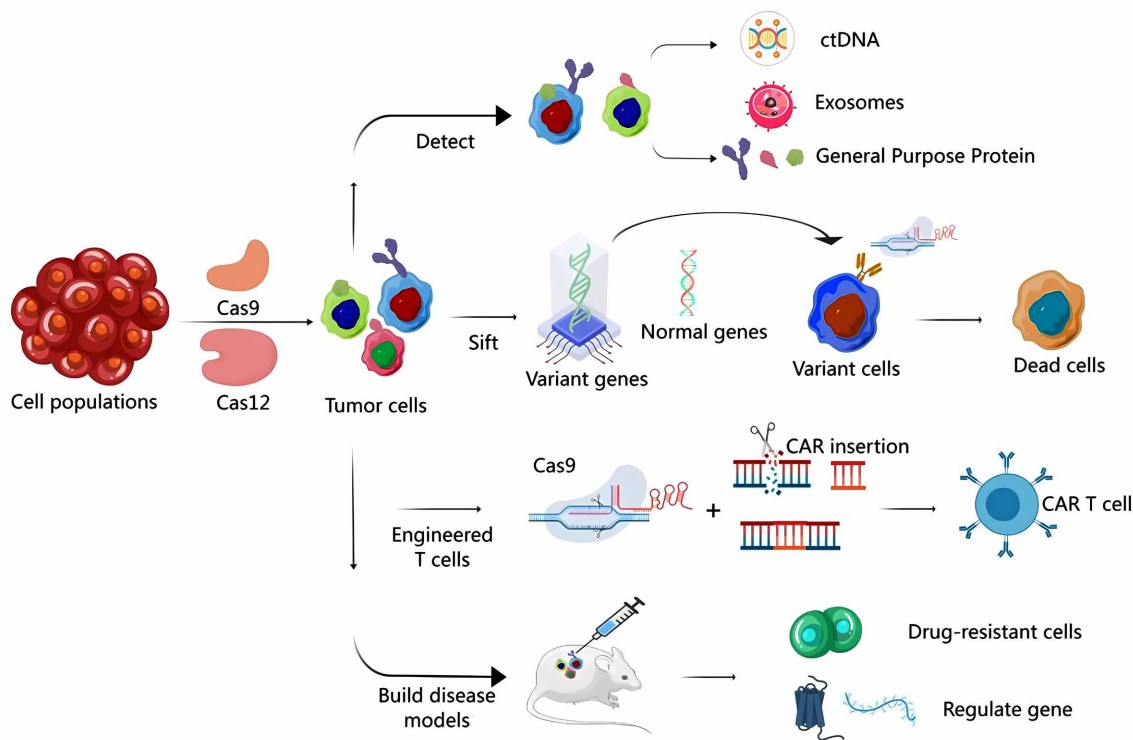


Figure 3. Clinical applications of CRISPR gene editing technology

图 3. CRISPR 基因编辑技术的临床应用

4. 总结和展望

CRISPR 技术作为一种革命性的基因编辑技术,可以在特定的 DNA 序列上进行精准地切割和编辑,通过精确检测不同肿瘤的生物标志物,包括 DNA、RNA 和蛋白质,在鉴定致癌基因和耐药性相关基因都

发挥着重要作用(图 3)。随着多组学的发展, CRISPR/Cas 系统与其他先进技术融合, 将会为肿瘤的精准诊疗提供更为广阔的空间。基于 CRISPR 的工具与单细胞多组学方法的整合为探索基因功能和肿瘤异质性提供了大量可能的应用。将空间转录组学与聚集的 CRISPR 文库相结合将是研究基因干扰对肿瘤微环境相互作用影响的有力策略。未来会朝着开发 CRISPR 靶向药物和癌症疫苗、发展瞬时性编辑方法、与人工智能相结合模拟肿瘤基因组编辑场景, 以及神经退行性疾病的预防性治疗等多个方面, 旨在为肿瘤的精准诊疗提供更为积极的支持。

参考文献

- [1] Zhang, Y.F. and Lu, M. (2024) Numerical Simulation of Thermal Therapy for Melanoma in Mice. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11273475/pdf/bioengineering-11-00694.pdf>
- [2] Liu, L., Kuang, L. and Ji, Y. (2020) Multimodal MRI Brain Tumor Image Segmentation Using Sparse Subspace Clustering Algorithm. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, **2020**, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2020/8620403>
- [3] Yoshizawa, N., Yamada, M., *et al.* (2024) Nephritis-Associated Plasmin Receptor (NAPlr): An Essential Inducer of C3-Dominant Glomerular Injury and a Potential Key Diagnostic Biomarker of Infection-Related Glomerulonephritis (IRGN). <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9456382/pdf/ijms-23-09974.pdf>
- [4] Barkley, D., Moncada, R., Pour, M., Liberman, D.A., Dryg, I., Werba, G., *et al.* (2022) Cancer Cell States Recur across Tumor Types and Form Specific Interactions with the Tumor Microenvironment. *Nature Genetics*, **54**, 1192-1201. <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01141-9>
- [5] Tang, Y., Gao, L., Feng, W., Guo, C., Yang, Q., Li, F., *et al.* (2021) The CRISPR-Cas Toolbox for Analytical and Diagnostic Assay Development. *Chemical Society Reviews*, **50**, 11844-11869. <https://doi.org/10.1039/d1cs00098e>
- [6] Bravo, J.P.K., Liu, M., Hibshman, G.N., Dangerfield, T.L., Jung, K., McCool, R.S., *et al.* (2022) Structural Basis for Mismatch Surveillance by CRISPR-Cas9. *Nature*, **603**, 343-347. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04470-1>
- [7] Bhatia, S., Pooja, and Yadav, S.K. (2023) CRISPR-Cas for Genome Editing: Classification, Mechanism, Designing and Applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, **238**, Article 124054. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124054>
- [8] Knott, G.J. and Doudna, J.A. (2018) CRISPR-Cas Guides the Future of Genetic Engineering. *Science*, **361**, 866-869. <https://doi.org/10.1126/science.aat5011>
- [9] Gier, R.A., Budinich, K.A., Evitt, N.H., Cao, Z., Freilich, E.S., Chen, Q., *et al.* (2020) High-Performance CRISPR-Cas12A Genome Editing for Combinatorial Genetic Screening. *Nature Communications*, **11**, Article No. 3455. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17209-1>
- [10] Yang, H. and Patel, D.J. (2024) Structures, Mechanisms and Applications of RNA-Centric CRISPR-Cas13. *Nature Chemical Biology*, **20**, 673-688. <https://doi.org/10.1038/s41589-024-01593-6>
- [11] Biagioni, A., Chillà, A., Del Rosso, M., Fibbi, G., Scavone, F., Andreucci, E., *et al.* (2021) CRISPR/Cas9 UPAR Gene Knockout Results in Tumor Growth Inhibition, EGFR Downregulation and Induction of Stemness Markers in Melanoma and Colon Carcinoma Cell Lines. *Frontiers in Oncology*, **11**, Article 663225. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.663225>
- [12] Singh, A., Irfan, H., Fatima, E., Nazir, Z., Verma, A. and Akilimali, A. (2024) Revolutionary Breakthrough: FDA Approves CASGEVY, the First CRISPR/Cas9 Gene Therapy for Sickle Cell Disease. *Annals of Medicine & Surgery*, **86**, 4555-4559. <https://doi.org/10.1097/ms9.00000000000002146>
- [13] Yoshimi, K., Takeshita, K., Kodera, N., Shibumura, S., Yamauchi, Y., Omatsu, M., *et al.* (2022) Dynamic Mechanisms of CRISPR Interference by Escherichia Coli CRISPR-Cas3. *Nature Communications*, **13**, Article No. 4917. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32618-0>
- [14] Stella, G. and Marraffini, L. (2024) Type III CRISPR-Cas: Beyond the Cas10 Effector Complex. *Trends in Biochemical Sciences*, **49**, 28-37. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2023.10.006>
- [15] Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Iranzo, J., Shmakov, S.A., Alkhnbashi, O.S., Brouns, S.J.J., *et al.* (2019) Evolutionary Classification of CRISPR-Cas Systems: A Burst of Class 2 and Derived Variants. *Nature Reviews Microbiology*, **18**, 67-83. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0299-x>
- [16] Yan, W.X., Hunnewell, P., Alfonse, L.E., Carte, J.M., Keston-Smith, E., Sothiselvam, S., *et al.* (2019) Functionally Diverse Type V CRISPR-Cas Systems. *Science*, **363**, 88-91. <https://doi.org/10.1126/science.aav7271>
- [17] Hillary, V.E. and Ceasar, S.A. (2022) A Review on the Mechanism and Applications of CRISPR/Cas9/Cas12/Cas13/Cas14 Proteins Utilized for Genome Engineering. *Molecular Biotechnology*, **65**, 311-325.

- <https://doi.org/10.1007/s12033-022-00567-0>
- [18] Zhou, Y., Tao, L., Qiu, J., Xu, J., Yang, X., Zhang, Y., *et al.* (2024) Tumor Biomarkers for Diagnosis, Prognosis and Targeted Therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, **9**, Article No. 132. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01823-2>
 - [19] Wang, M., Chen, K., Wu, Q., Peng, R., Zhang, R. and Li, J. (2019) RCasFISH: CRISPR/dCas9-Mediated in Situ Imaging of mRNA Transcripts in Fixed Cells and Tissues. *Analytical Chemistry*, **92**, 2468-2475. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03797>
 - [20] Shaik, M.R., Sagar, P.R., *et al.* (2023) Liquid Biopsy in Hepatocellular Carcinoma: The Significance of Circulating Tumor Cells in Diagnosis, Prognosis, and Treatment Monitoring. *International Journal of Molecular Sciences*, **24**, Article 10644.
 - [21] Sivapalan, L., Murray, J.C., Canzoniero, J.V., *et al.* (2023) Liquid Biopsy Approaches to Capture Tumor Evolution and Clinical Outcomes during Cancer Immunotherapy. *The Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, **11**, e005924.
 - [22] Zhang, Q., Gao, X., Ho, Y., Liu, M., Han, Y., Li, D., *et al.* (2024) Controllable Assembly of a Quantum Dot-Based Aptasensor Guided by CRISPR/Cas12A for Direct Measurement of Circulating Tumor Cells in Human Blood. *Nano Letters*, **24**, 2360-2368. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.3c04828>
 - [23] Guan, X.T., Zhao, J.R., *et al.* (2024) CRISPR/Cas12A and Aptamer-Chemiluminescence Based Analysis for the Relative Abundance Determination of Tumor-Related Protein Positive Exosomes for Breast Cancer Diagnosis. *Biosensors and Bioelectronics*, **259**, Article 116380.
 - [24] Guan, L., Peng, J., Liu, T., Huang, S., Yang, Y., Wang, X., *et al.* (2023) Ultrasensitive Mirna Detection Based on Magnetic Upconversion Nanoparticle Enhancement and CRISPR/Cas13A-Driven Signal Amplification. *Analytical Chemistry*, **95**, 17708-17715. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c03554>
 - [25] Zhang, Y., Wei, X., Teng, X. and Chen, G. (2023) P53 Aberration and TFE3 Gene Amplification May Be Predictors of Adverse Prognosis in Epithelioid Angiomyolipoma of the Kidney. *Diagnostic Pathology*, **18**, Article No. 14. <https://doi.org/10.1186/s13000-023-01298-9>
 - [26] Wang, T., Ding, K., Wang, X., Wang, Z., Liu, G., Zang, Y., *et al.* (2024) Dual Amplification Dynamic DNA Network System for CRISPR/Cas12A Based P53 Gene Detection. *Analytica Chimica Acta*, **1321**, Article 343048. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2024.343048>
 - [27] Zhang, H., Gao, H., Mu, W., Que, L., Gu, X., Rong, S., *et al.* (2024) Electrochemical-Fluorescent Bimodal Biosensor Based on Dual CRISPR-Cas12A Multiple Cascade Amplification for ctDNA Detection. *Analytical Chemistry*, **34**, 14028-14035. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.4c03012>
 - [28] Martinez, S., Wu, S., Geuenich, M., Malik, A., Weber, R., Woo, T., *et al.* (2024) In Vivo CRISPR Screens Reveal SCAF1 and USP15 as Drivers of Pancreatic Cancer. *Nature Communications*, **15**, Article No. 5266. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-49450-3>
 - [29] Alayoubi, A.M., Khawaji, Z.Y., Mohammed, M.A. and Mercier, F.E. (2023) CRISPR-Cas9 System: A Novel and Promising Era of Genotherapy for Beta-Hemoglobinopathies, Hematological Malignancy, and Hemophilia. *Annals of Hematology*, **103**, 1805-1817. <https://doi.org/10.1007/s00277-023-05457-2>
 - [30] Boumelha, J., de Castro, A., Bah, N., Cha, H., de Carné Trécesson, S., Rana, S., *et al.* (2024) CRISPR-Cas9 Screening Identifies KRAS-Induced COX2 as a Driver of Immunotherapy Resistance in Lung Cancer. *Cancer Research*, **84**, 2231-2246. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-23-2627>
 - [31] Barkley, D., Rao, A., Pour, M., França, G.S. and Yanai, I. (2021) Cancer Cell States and Emergent Properties of the Dynamic Tumor System. *Genome Research*, **31**, 1719-1727. <https://doi.org/10.1101/gr.275308.121>
 - [32] Guo, T., Chen, G., Li, X., Wang, M., Liu, K., Yang, X., *et al.* (2023) Small Extrachromosomal Circular DNA Harboring Targeted Tumor Suppressor Gene Mutations Supports Intratumor Heterogeneity in Mouse Liver Cancer Induced by Multiplexed CRISPR/Cas9. *Genome Medicine*, **15**, Article No. 80. <https://doi.org/10.1186/s13073-023-01230-2>
 - [33] Wu, M., Zhang, T., Gao, C., Zhao, T., Wang, L. and Sun, G. (2024) Assessing of Case-Cohort Design: A Case Study for Breast Cancer Patients in Xinjiang, China. *Frontiers in Oncology*, **14**, Article 1306255. <https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1306255>
 - [34] Chamberlain, C.A., Bennett, E.P., Kverneland, A.H., Svane, I.M., Donia, M. and Met, Ö. (2022) Highly Efficient Pd-1-Targeted CRISPR-Cas9 for Tumor-Infiltrating Lymphocyte-Based Adoptive T Cell Therapy. *Molecular Therapy Oncolytics*, **24**, 417-428.
 - [35] Pandey, S., Lee, M., Lim, J., Park, S., Choung, Y., Kim, J.E., *et al.* (2023) SMO-CRISPR-Mediated Apoptosis in CD133-Targeted Cancer Stem Cells and Tumor Growth Inhibition. *Journal of Controlled Release*, **357**, 94-108. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2023.03.023>
 - [36] Wang, L., Liu, C., Wang, X., Ma, S., Liu, F., Zhang, Y., *et al.* (2023) Tumor-Specific Activated Nano-Domino-CRISPR to Amplify Intrinsic Oxidative and Activate Endogenous Apoptosis for Spatiotemporally Specific Therapy. *Biomaterials*,

- 295, Article 122056. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2023.122056>
- [37] Wang, S., Gao, C., Zheng, Y., Yi, L., Lu, J., Huang, X., *et al.* (2022) Current Applications and Future Perspective of CRISPR/Cas9 Gene Editing in Cancer. *Molecular Cancer*, **21**, Article No. 57. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01518-8>
- [38] Morton, L.T., Reijmers, R.M., Wouters, A.K., Kweekel, C., Remst, D.F.G., Pothast, C.R., *et al.* (2020) Simultaneous Deletion of Endogenous Tcr $\alpha\beta$ for TCR Gene Therapy Creates an Improved and Safe Cellular Therapeutic. *Molecular Therapy*, **28**, 64-74. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.10.001>
- [39] Stadtmayer, E.A., Fraietta, J.A., Davis, M.M., *et al.* (2020) CRISPR-Engineered T Cells in Patients with Refractory Cancer. *Science*, **367**, eaba7365.
- [40] Nie, D., Guo, T., Yue, M., Li, W., Zong, X., Zhu, Y., *et al.* (2022) Research Progress on Nanoparticles-Based CRISPR/Cas9 System for Targeted Therapy of Tumors. *Biomolecules*, **12**, Article 1239. <https://doi.org/10.3390/biom12091239>
- [41] He, C., Jaffar Ali, D., Li, Y., Zhu, Y., Sun, B. and Xiao, Z. (2020) Engineering of HN3 Increases the Tumor Targeting Specificity of Exosomes and Upgrade the Anti-Tumor Effect of Sorafenib on Huh-7 Cells. *Peer Journal*, **8**, e9524. <https://doi.org/10.7717/peerj.9524>
- [42] Ye, Y., Zhang, X., Xie, F., Xu, B., Xie, P., Yang, T., *et al.* (2020) An Engineered Exosome for Delivering sgRNA: Cas9 Ribonucleoprotein Complex and Genome Editing in Recipient Cells. *Biomaterials Science*, **8**, 2966-2976. <https://doi.org/10.1039/d0bm00427h>
- [43] Yu, D., Li, Y., Wang, M., Gu, J., Xu, W., Cai, H., *et al.* (2022) Exosomes as a New Frontier of Cancer Liquid Biopsy. *Molecular Cancer*, **21**, Article No. 56. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01509-9>
- [44] Ipsen, M.B., Sørensen, E.M.G., Thomsen, E.A., Weiss, S., Haldrup, J., Dalby, A., *et al.* (2022) A Genome-Wide Caspr-Cas9 Knockout Screen Identifies Novel PARP Inhibitor Resistance Genes in Prostate Cancer. *Oncogene*, **41**, 4271-4281. <https://doi.org/10.1038/s41388-022-02427-2>
- [45] Ludwig, M., Birkeland, A., Smith, J., *et al.* (2024) A Genome Wide CRISPR Profiling Approach Identifies Mechanisms of Cisplatin Resistance in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. <https://www.researchsquare.com/article/rs-3922565/v1>
- [46] Deng, L., Yang, L., Zhu, S., Li, M., Wang, Y., Cao, X., *et al.* (2023) Identifying CDC7 as a Synergistic Target of Chemotherapy in Resistant Small-Cell Lung Cancer via CRISPR/Cas9 Screening. *Cell Death Discovery*, **9**, Article No. 40. <https://doi.org/10.1038/s41420-023-01315-2>
- [47] Fazeli, Z., Rajabibazl, M., Faramarzi, S., *et al.* (2021) Correlation of TCF4, GSK, TERT and TERC Expressions with Proliferation Potential of Early and Late Culture of Human Peripheral Blood Mesenchymal Stem Cells. *Cell Journal (Yakhteh)*, **22**, 431-436.
- [48] George, S.L., Lorenzi, F., King, D., Hartlieb, S., Campbell, J., Pemberton, H., *et al.* (2020) Therapeutic Vulnerabilities in the DNA Damage Response for the Treatment of ATRX Mutant Neuroblastoma. *E Bio Medicine*, **59**, Article 102971. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102971>
- [49] Hansen, S.L., Larsen, H.L., Pikkupeura, L.M., Maciag, G., Guiu, J., Müller, I., *et al.* (2023) An Organoid-Based Caspr-Cas9 Screen for Regulators of Intestinal Epithelial Maturation and Cell Fate. *Science Advances*, **9**, eadg4055. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adg4055>
- [50] Knott, G.J. and Doudna, J.A. (2018) CRISPR Cas Guides the Future of Genetic Engineering. *Science*, **361**, 866-869.
- [51] Kawamata, M., Suzuki, H.I., Kimura, R. and Suzuki, A. (2023) Optimization of Cas9 Activity through the Addition of Cytosine Extensions to Single-Guide RNAs. *Nature Biomedical Engineering*, **7**, 672-691. <https://doi.org/10.1038/s41551-023-01011-7>
- [52] Zuo, Z., Babu, K., Ganguly, C., Zolekar, A., Newsom, S., Rajan, R., *et al.* (2022) Rational Engineering of CRISPR-Cas9 Nuclease to Attenuate Position-Dependent Off-Target Effects. *The CRISPR Journal*, **5**, 329-340. <https://doi.org/10.1089/crispr.2021.0076>
- [53] Kitada, T., DiAndreth, B., Teague, B. and Weiss, R. (2018) Programming Gene and Engineered-Cell Therapies with Synthetic Biology. *Science*, **359**, eaad1067. <https://doi.org/10.1126/science.aaad1067>
- [54] Zheng, Y., Li, Y., Zhou, K., Li, T., VanDusen, N.J. and Hua, Y. (2024) Precise Genome-Editing in Human Diseases: Mechanisms, Strategies and Applications. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, **9**, Article No. 47. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01750-2>