



覃文新, 上海市肿瘤研究所研究员, 博士生导师, 上海市肿瘤研究所副所长, 癌基因与相关基因国家重点实验室副主任。主要聚焦肿瘤分子机制、肿瘤微环境、肿瘤治疗研究, 研究成果发表在 *Lancet Oncology*、*Nature*、*Nature Communications*、*Gastroenterology*、*Hepatology* 等学术期刊上。

<http://www.shsci.org/article-10-14.html>

CRISPR-Cas9功能基因筛选技术 在肝癌研究中的应用

曹颖[#] 钱若兰[#] 杨晨 王存 覃文新^{*}

(上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海市肿瘤研究所, 癌基因与相关基因国家重点实验室, 上海 200032)

摘要 肝癌是全球第四大致死肿瘤, 对人类健康构成重大威胁。进展期肝癌缺乏有效靶点, 以及目前标准疗法治疗效果有待进一步提高, 是肝癌研究领域亟待解决的关键科学问题之一。CRISPR-Cas9功能基因筛选技术促进了肝癌生物学研究的发展, 借助该技术, 研究者发现了诸多参与肿瘤发生发展的靶基因。此外, 无偏倚的CRISPR-Cas9功能基因筛选为探索耐药驱动机制和确定潜在治疗新靶点提供了基础。该文将系统阐述CRISPR-Cas9高通量功能基因筛选技术在肝癌研究领域取得的进展和突破, 这些研究将有助于加深人们对肝癌的理解及开辟新的潜在治疗方案。

关键词 肝癌; 肝细胞癌; CRISPR-Cas9功能基因筛选; 肝癌治疗

Application of CRISPR-Cas9 Functional Genetic Screens in Liver Cancer

CAO Ying[#], QIAN Ruolan[#], YANG Chen, WANG Cun, QIN Wenxin^{*}

(State Key Laboratory of Oncogenes and Related Genes, Shanghai Cancer Institute, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200032, China)

Abstract Liver cancer is the fourth leading cause of cancer-related death worldwide. Lack of effective therapeutic targets and improvement for the efficacy of current therapies for advanced liver cancer are the key scientific issues to be solved in liver cancer research. CRISPR-Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR-associated protein 9) functional genetic screens have contributed to the advancement of liver can-

收稿日期: 2022-02-14 接受日期: 2022-03-14

国家自然科学基金(批准号: 81920108025、82102923)和上海交通大学科研项目(批准号: YG2021QN39)资助的课题

[#]共同第一作者

*通讯作者。Tel: 021-68371105, E-mail: wxqin@sjtu.edu.cn

Received: February 14, 2022 Accepted: March 14, 2022

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81920108025, 82102923) and the Scientific Research Program of Shanghai Jiao Tong University (Grant No.YG2021QN39)

[#]These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-21-68371105, E-mail: wxqin@sjtu.edu.cn

cer biology. Many novel target genes involved in tumorigenesis and cancer progression have been uncovered by CRISPR-Cas9 screen technology. In addition, unbiased CRISPR-Cas9 functional genetic screens provide opportunities for exploring drug resistance mechanisms and identifying potential new therapeutic targets. This review systematically describes progresses and breakthroughs in high-throughput CRISPR-Cas9 functional genetic screens, which can help to deepen understanding of liver cancer and identify novel therapeutic strategies for liver cancer.

Keywords liver cancer; hepatocellular carcinoma; CRISPR-Cas9 functional genetic screens; liver cancer therapy

肝癌是严重威胁人类健康的恶性肿瘤之一。最新数据统计显示,在所有癌症中,肝癌的发病率位居第六,死亡率位于第四^[1]。虽然近年来对肝癌的研究获得了较大进步,但肝癌的5年生存率仍较低,只有18%左右。根据世界卫生组织的预测,2030年将有100多万患者死于肝癌^[2]。在所有原发性肝癌中,肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的比例约占90%,并且绝大多数HCC是由乙肝或丙肝病毒感染、酒精性肝病等慢性疾病引起的^[1-2]。我国是肝癌高发地区之一,每年新增肝癌患者约40万,新增死亡病例约37万,新增病例数和死亡病例数均居世界首位,导致这一现象最主要的原因是乙肝病毒感染和黄曲霉毒素B1异常摄入^[1-2]。

肝癌患者的治疗方案由临床分期决定。巴塞罗那肝癌临床分期系统(Barcelona clinic liver cancer, BCLC)根据患者的一般状态、肿瘤状态、肝功能状态和可供选择的治疗方法将其分为5个临床分期,包括BCLC 0(最早期)、BCLC A(早期)、BCLC B(中期)、BCLC C(晚期)、BCLC D(终末期)^[3]。整体/部分肝切除术和肝移植是治疗早期肝癌的主要方法^[4]。对于中期肝癌患者,采用局部治疗方式,如经动脉化疗栓塞(transarterial chemoembolization, TACE)和经动脉放射栓塞(transarterial radioembolization, TARE)是首选治疗方案^[5-6]。对于晚期肝癌患者,不再适合切除治疗或局部治疗,系统治疗是可以提供生存获益的唯一选择^[7]。值得注意的是,由于早期肝癌较难被诊断发现,而且一旦病灶形成,病情发展迅速,相当大比例的患者确诊时已经是肝癌晚期^[8]。且对于早期患者,即使经过手术切除治疗,术后5年复发转移率仍高达70%^[1]。

目前,针对肿瘤基因突变的靶向治疗是癌症治疗的重要手段之一,例如针对黑色素瘤*BRAF*基因突变开发的药物维莫非尼(Vemurafenib)和达拉非尼(Dabrafenib)^[9],以及针对肺癌*EGFR*基因突变开发的

药物吉非替尼(Gefitinib)等^[10]。然而,HCC中缺乏可作为有效干预靶点的突变基因。多靶点酪氨酸激酶抑制剂索拉菲尼(Sorafenib)和乐伐替尼(Lenvatinib)是进展期肝癌患者的标准治疗药物,虽能有效改善整体生存率,但是患者的中位生存获益仍相当有限^[11-12]。免疫检查点阻断疗法在癌症治疗领域受到广泛关注,并已被引入临床一线或二线,以用于治疗肿瘤,但临床患者的总体反应率仅为10%~20%^[13-14]。最新IMbrave150试验显示,Atezolizumab(PD-L1抑制剂)和Bevacizumab(血管生成抑制剂)的联合疗法显著改善了进展期肝癌患者的预后,但总反应率也仅为27.3%^[15]。

虽然人们对肝癌基因谱有了一定程度的了解,但仍有许多问题尚未得到解答。例如,每个HCC病例平均有40个基因突变,单靠测序无法准确判断哪些基因是真正的致癌驱动因子^[16]。此外,HCC存在高度异质性,即使许多已建立的分子分型加深了人们对HCC分子异质性的理解,但针对某一亚类的特异性治疗靶点或药物仍有待开发^[17-18]。再者,在大多数临床病例中,最初受益于靶向治疗的患者最终会对治疗产生耐药性,因此耐药驱动机制仍有待进一步被阐明^[19]。在过去几十年里,基于RNA干扰(RNA interference, RNAi)的功能基因筛选已成功应用于探索各种生物学过程^[20]。随后,CRISPR-Cas9技术在基因编辑领域颇具成果,研究者逐渐意识到该技术在功能基因筛选方面的潜力^[21-22]。相较于传统的RNAi筛选,CRISPR-Cas9技术具有低噪、低脱靶效率和较高的基因编辑效率等多重优势^[23]。目前该技术已被广泛应用于疾病机理和药物开发等研究^[24]。本文将系统阐述利用CRISPR-Cas9功能基因筛选技术在探索肝癌发生发展和耐药机制以及开发治疗新靶点新策略等方面取得的进展,同时对肝癌研究的瓶颈问题与未来发展趋势提出见解和思考。

1 CRISPR-Cas9高通量功能基因筛选技术概述

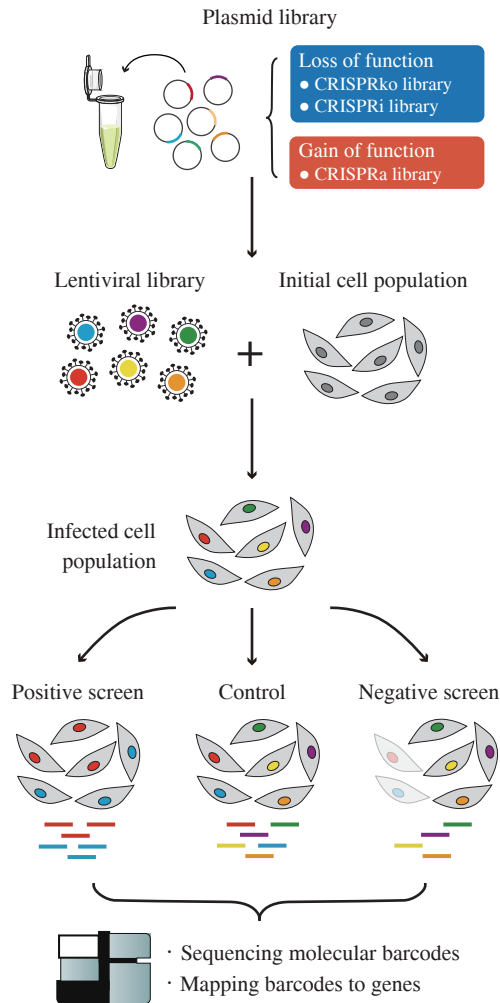
CRISPR-Cas9技术是一种靶向DNA的基因编辑技术,该系统包含具有DNA切割能力的Cas9核酸酶,以及识别特定靶序列的向导RNA(guide RNAs, gRNAs)。Cas9酶与gRNA结合到特定基因位点,诱导DNA双链断裂(double strand breaks, DSB),经过细胞自主性修复机制——非同源末端连接(nonhomologous end joining, NHEJ)或同源重组(homology directed repair, HR),导致基因编辑^[21-22]。当使用gRNAs文库时,CRISPR-Cas9可作为功能基因筛选的工具,识别对表型发挥重要作用的基因^[25]。功能缺失型筛选(loss of function screen)和功能获得型筛选(gain of function screen)是两种主要的高通量筛选方法,此类方法可以通过对基因功能的改造来鉴别特定生物学过程的调控因子。在功能缺失型筛选中,通过诱导基因失活或降低表达以减弱基因功能;在功能获得型筛选中,则是提高基因表达以寻找相应表型。目前,有两种CRISPR-Cas9文库可用于功能缺失型筛选:CRISPR敲除(CRISPR knockout, CRISPRko)文库和CRISPR干扰(CRISPR-based interference, CRISPRi)文库。CRISPRko筛选文库基于CRISPR-Cas9原理,通过慢病毒系统递送靶向特定基因的gRNA文库,从而在细胞中导入gRNAs和Cas9核酸酶,导致特定基因敲除。待基因编辑后,诱变的细胞群可用来筛选特定的表型,例如细胞生存、增殖或耐药等^[26]。负向筛选(negative screen)是指在特定的选择条件下,大多数细胞存活下来,通过二代测序确定哪些gRNAs在细胞中的丰度降低或丢失。反之,正向筛选(positive screen)是指大多数细胞死于特定筛选条件,继而鉴别在最终存活的细胞中哪些gRNAs被富集^[27-28](图1)。野生型Cas9蛋白具有DNA核酸酶活性,而改造后的突变型Cas9蛋白(catalytically dead Cas9 mutant, dCas9)则无核酸内切酶活性,但仍保留结合gRNA和基因编辑的能力^[29]。dCas9通过融合或招募转录因子,在基因转录起始位点(transcription start sites, TSS)调控靶基因,例如转录抑制或转录激活。CRISPRi文库利用dCas9,直接阻断RNA多聚酶或与转录抑制因子融合(如dCas9-KRAB),而后被招募到靶基因的转录起始位点上,进而抑制基因转录,导致基因敲低^[30]。与CRISPRko不同,CRISPRi是可逆的,并不会导致永久性的DNA

改变。当基因完全敲除导致细胞死亡,从而无法进行大规模筛选时,CRISPRi往往是首选方法^[31]。除了功能缺失型筛选外,功能获得型筛选也能应用于鉴别靶基因。CRISPR激活(CRISPR gene activation, CRISPRa)文库是将dCas9蛋白融合到其他蛋白如dCas9-VP64的反式激活域以增加基因表达水平。CRISPRa系统的转录诱导强度由多种因素决定,包括实验设置和靶向基因^[32]。与功能缺失型筛选相似,功能获得型筛选也包括正向筛选和负向筛选。

CRISPR-Cas9筛选可以使用混合文库(pooled library)或定制文库(arrayed library)来进行。在本文中,我们主要关注混合文库CRISPR筛选。理论上,混合文库CRISPR筛选是指一次实验能编辑文库中包含的所有基因,同时通过实验设计,尽可能实现每个细胞只编辑一个基因^[26]。如此操作可以获得具有不同遗传背景的细胞群,在正常条件或特异性条件(例如药物处理)下培养,以产生特定表型。根据实验目的,细胞经培养筛选后(通常需培养3~8周),进行二代测序比较实验组和对照组细胞中gRNAs的丰度,从而确定富集或缺失的gRNAs,以此鉴别相应表型的潜在决定基因(图1)。选择一个合适的文库进行CRISPR筛选是实验成功的关键条件之一。根据CRISPR文库所包含的基因数量,可大致分为全基因组文库(针对约20 000个基因)和靶向文库(针对某一类基因,如激酶、表观遗传学分子等)^[33-34]。理论上,筛选文库所包含的基因越多,实验结果越客观。因此,全基因组筛选被认为是一种无偏倚的筛选方法,它可以鉴别出对特定表型至关重要的所有潜在基因。然而,包含基因越多则意味着需要更多的细胞数量来维持文库的多样性。为了得到一个可靠的实验结论,在整个筛选过程中,建议每个gRNA至少覆盖500个细胞^[35]。所以,在进行体内筛选或原代细胞筛选时,所得细胞数量往往有限,这可能无法满足全基因组筛选的要求。

2 CRISPR-Cas9功能基因筛选技术在肝癌治疗中的应用

迄今为止,大多数已批准的肝癌治疗方案主要为单一药物治疗。目前,FDA已批准多个药物用于一线或二线疗法治疗肝癌患者,其中包括索拉菲尼(Sorafenib)、仑伐替尼(Lenvatinib)、瑞戈非尼(Regorafenib)、卡博替尼(Cabozantinib)、雷莫芦单



CRISPR-Cas9功能基因筛选包括功能缺失型(loss of function)筛选和功能获得型(gain of function)筛选。用正常条件或特定条件(例如药物处理)培养导入CRISPR文库的细胞群,诱导细胞产生特定的表型,筛选3~8周后,对细胞进行二代测序,比较实验组和对照组细胞中gRNAs的丰度,从而确定富集或缺失的gRNAs,以此鉴别相应表型的潜在决定基因。正向筛选(positive screen)是指大多数细胞死于特定筛选条件,测序确定在最终存活的细胞中哪些gRNAs被富集。负向筛选(negative screen)是指在特定的选择条件下,大多数细胞存活下来,通过测序确定细胞中哪些gRNAs丰度降低或丢失。

CRISPR-Cas9 functional genetic screens include loss-of-function screens and gain-of-function screens. Cells transfected by CRISPR libraries are cultured either under normal conditions or under specific conditions (for example, drug treatment) to generate specific phenotypes. After 3-8 weeks of culture, next-generation sequencing is used to compare the abundance of gRNAs (guide RNAs) between experimental conditions and control conditions, and thereby identify the enriched or depleted gRNAs. These gRNAs need to be mapped to genes, which are then considered the candidate determinants of corresponding phenotypes. In positive screen, most cells will die from the selection and genes corresponding to gRNAs enriched in the selected population of cells may have key roles during this process. In negative screen, most cells will survive from the selection and those cells with depleted gRNA are considered as hits in the screens.

图1 CRISPR-Cas9功能基因筛选技术流程示意图

Fig.1 Schematic diagram of CRISPR-Cas9 functional genetic screens

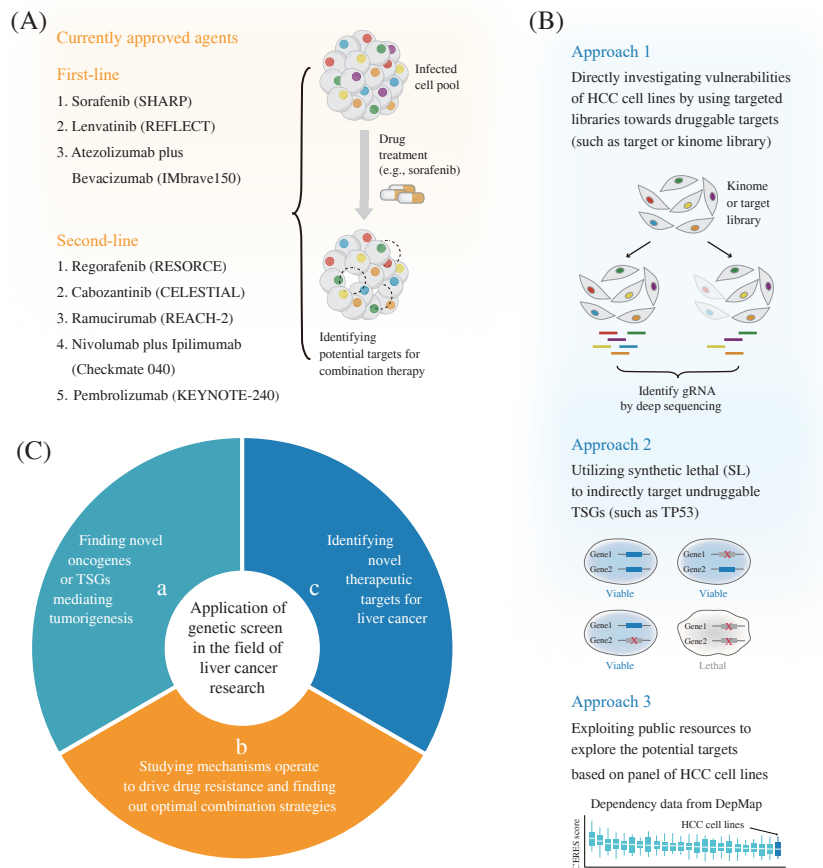
抗(Ramucirumab)、纳武单抗(Nivolumab)和派姆单抗(Pembrolizumab)等。尽管人们对肝癌治疗的理解不断深入,但单药疗法只能为进展期肝癌患者提供有限的临床获益,并且单药疗法仅使小部分肝癌患者获益,那些最初受益的肝癌患者最终也会产生耐药效应^[36]。因此,关于标准治疗方案的内在性耐药或获得性耐药仍然是肝癌治疗面临的巨大障碍

之一。幸运的是,联合治疗方案为解决肝癌耐药这一难题提供了潜在机会。与单一药物疗法相比,联合疗法表现出更高的有效性和更低的产生耐药的几率^[37]。目前,肝癌患者仅有两种联合治疗方案[一线治疗方案: Atezolizumab联合Bevacizumab; 二线治疗方案: Nivolumab联合伊匹单抗 (Ipilimumab)]^[14-15]。随着治疗肝癌的药物列表的扩大,联合疗法的可能性也在

逐步增加(图2A)。

近年来,研究重点之一即是寻找与已批准的肝癌标准疗法联合使用的药物。通过全基因组CRISPR筛选,研究发现磷酸甘油酸脱氢酶(phosphoglycerate dehydrogenase, PHGDH)是Sorafenib耐药的关键驱动因素,它是参与丝氨酸合成途径(serine synthesis pathway, SSP)的第一个酶。Sorafenib通过诱导PHGDH表达激活SSP。PHGDH失活可抑制SSP,减少 α KG、丝氨酸和NADPH的生成量。同时,在Sorafenib治疗中,PHGDH的失活会导致ROS水平升高并诱导HCC细胞凋亡。PHGDH抑制剂NCT-503与Sorafenib在诱导

HCC凋亡方面具有协同作用,NCT-503与其他FDA批准的TKIs(Regorafenib和Lenvatinib)联合使用也具有类似效果^[38]。此外,研究者利用全基因组CRISPR文库发现神经纤维蛋白1(neurofibromin 1, NF1)和双特异性磷酸酶9(dual specificity phosphatase 9, DUSP9)是肝癌细胞对Lenvatinib耐药的关键调控分子。NF1缺失后可激活PI3K/AKT和MAPK/ERK信号通路,DUSP9缺失同样可以激活MAPK/ERK信号通路,导致FOXO3失活并降解,最终引发Lenvatinib耐药^[39]。另外,运用基于激酶组文库的CRISPR-Cas9功能基因筛选技术,研究发现Lenvatinib与表皮生长因子受



A: CRISPR-Cas9功能基因筛选技术可以用于鉴别潜在的联合用药策略,以提高目前肝癌标准疗法的疗效。B: CRISPR-Cas9功能基因筛选技术有助于鉴别肝癌治疗靶点。主要包括三种策略:利用靶向文库研究药物是否有获得性弱点;利用合成致死原理间接靶向无成药性的肿瘤抑制基因;利用基于肝癌细胞系的公共数据库探究肝癌治疗的潜在靶点。C: CRISPR-Cas9功能基因筛选技术有助于寻找调控肿瘤发生的驱动因子(原癌基因或肿瘤起始因子),解析耐药机制,发现具有潜在治疗价值的新靶点。

A: CRISPR-Cas9 functional genetic screens can be used to find out the optimal combination strategies to improve the efficacy of currently approved therapies for liver cancer. B: CRISPR-Cas9 functional genetic screens can help to identify novel therapeutic targets for liver cancer, including directly investigating vulnerabilities using targeted libraries towards druggable targets, utilizing SL (synthetic lethal) to indirectly target undruggable tumor suppressors, or exploiting public database to explore the potential targets based on panel of HCC cell lines. C: CRISPR-Cas9 functional genetic screens can be utilized to identify liver cancer-associated driver genes (oncogenes or tumor initiation factors), elucidate mechanisms of drug resistance, and discover potential therapeutic targets.

图2 CRISPR-Cas9功能基因筛选技术在肝癌研究中的应用

Fig.2 Application of CRISPR-Cas9 functional genetic screens in liver cancer

体(epidermal growth factor receptor, EGFR)可产生合成致死效应。EGFR抑制剂Gefitinib与Lenvatinib联合使用表现出强大的抗肿瘤细胞增殖作用。机制上, Lenvatinib抑制成纤维细胞生长因子受体(fibroblast growth factor receptor, FGFR)信号轴EGFR-PAK2-ERK5的反馈激活, 而该信号轴在联合用药时被Gefitinib阻断。临床试验(NCT04642547)结果显示, 针对Lenvatinib治疗无反应的12例进展期HCC患者, 该联合疗法显示出良好的临床效果。此种联合疗法, 对于EGFR表达水平较高的进展期HCC患者而言, 将是一种有前途的治疗策略^[40]。同样利用靶向激酶组的CRISPRko文库, 另两项研究分别揭示CDK12的小分子抑制剂THZ531或MAPK信号通路的抑制剂, 联合Sorafenib可诱导肝癌细胞凋亡或衰老, 具有显著的协同作用^[41-42]。研究者设计了一套特定的CRISPR-Cas9筛选系统以寻找药物靶点, 结果揭示FDA获批药物艾芬地尔(Ifenprodil)和Sorafenib联合使用有治疗肝癌的潜力^[43]。除此之外, 在联合化疗的治疗策略中, 通过CRISPRko筛选发现抑制磷酸丝氨酰tRNA激酶(phosphoserine-tRNA kinase, PSTK)可以增加肝癌细胞对化疗的敏感性。机制上, PSTK缺失导致谷胱甘肽过氧化酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)失活, 破坏谷胱甘肽(glutathione, GSH)代谢过程, 从而在化疗时诱导铁死亡^[44]。

在功能获得型筛选方面, 采用CRISPRa筛选技术, 发现铁死亡诱导物(Erastin、Sorafenib和Sulfasalazine)可以激活AMPK/SREBP1信号通路, 进而抑制支链氨基酸转移酶2(branched chain amino acid transaminase 2, BCAT2)转录。BCAT2是介导硫氨基酸代谢的关键酶, 调控细胞内谷氨酸水平, 其体外和体内的异位表达激活对肝和胰腺癌细胞有保护作用, 抑制BCAT2会引发铁死亡。该研究表明, Sorafenib和Sulfasalazine在下调BCAT2表达和诱发铁死亡方面具有协同效应, BCAT2也可以用来预测癌细胞对铁死亡诱导治疗的反应性^[45]。研究者利用CRISPRa筛选发现在肝癌细胞中MTX1(metaxin 1)是一种新的Sorafenib耐药调控因子。过表达MTX1在体内外均能降低肝癌细胞对Sorafenib的反应性。临床上, 在接受Sorafenib治疗的HCC患者中, MTX1的高表达与患者不良预后密切相关。MTX1在HCC组织中表达上调, 并通过CISD1(CDGS iron sulfur domain 1)介导的自噬机制参与Sorafenib耐药^[46]。

总而言之, CRISPR-Cas9功能基因筛选技术不仅可以研究肿瘤药物的耐药机制, 还可以筛选潜在联合用药策略指导临床用药。

3 利用CRISPR-Cas9功能基因筛选技术探索肝癌发生发展机制及潜在靶点

肝细胞癌通常在多年慢性肝病后形成, 从肝硬化发展到低级别不典型增生, 再发展到高级别不典型增生, 最后发展为肝细胞癌。如何鉴别肝癌形成的驱动因子和抑制因子, 并阐明这些基因在肝癌的起始和发展过程中的作用, 是研究肝癌致病机制的关键问题之一。无偏倚的CRISPR-Cas9功能基因筛选可以帮助鉴别调控该过程的关键基因(图2B)。对遗传背景为*Trp53*缺失和*Myc*过表达的小鼠胚胎肝前体细胞进行全基因组编辑, 研究发现*Nf1*、*Plxnb1*、*Flrt2*和*B9d1*是肝癌形成的潜在抑制因子基因。*Nf1*负调控RAS信号通路, 缺失*Nf1*或激活RAS信号均能促进小鼠肝癌发生^[47]。在人源肝癌细胞系中, *NF1*表达水平的降低以及下游蛋白HMGA2水平的增加均与肝癌患者的不良预后具有显著相关性^[47]。这提示开发抑制或减少HMGA2表达量的方法在进展期肝癌治疗中具有潜在应用价值^[47]。

研究者利用靶向激酶组的CRISPR-Cas9筛选和化合物库筛选, 发现抑制CDC7可选择性诱导TP53突变型肝癌细胞衰老。在CDC7抑制剂处理的细胞中, mTOR信号通路的负反馈激活通路被阻断, 因而对mTOR抑制剂高度敏感。在异种移植和免疫健全小鼠肝癌模型中也验证了该治疗策略的有效性。此研究证实了“one-two punch”分步式肝癌治疗策略的潜在应用价值, 即先用第一种药物诱导肿瘤细胞衰老, 而后再用第二种药物杀死衰老的肝癌细胞^[48]。相似地, 通过CRISPRko筛选及整合生物信息学分析, 研究确定ATR-CHK1信号通路可作为肝癌的潜在治疗靶点。对于高水平DNA复制应激背景的肝癌细胞, 抑制ATR或CHK1的表达可直接诱导细胞凋亡。对ATR或CHK1抑制剂不敏感的肝癌细胞, 使用CDC7抑制剂可增强DNA复制应激, 进而与ATR或CHK1抑制剂表现出显著协同作用^[49]。

此外, 代谢相关基因也可作为肝癌潜在治疗靶点。通过分析DepMap(Cancer Dependency Map)公共数据库(625个癌症细胞株的18 333个基因)的CRISPR筛选数据, PERKSONS等^[50]指出, HCC比其

他肿瘤细胞更依赖乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)。他们进一步在肝癌细胞株SNU449和患者活检细胞株PGM-898中进行CRISPR筛选,亦证实肝癌细胞对LDH的依赖性。该研究建立了一个诊断学平台,即利用动态核极化增强 ^{13}C 核磁共振波谱成像(DNP-enhanced ^{13}C magnetic resonance spectroscopic imaging, DNP-MRSI)评估瘤内丙酮酸代谢,预测抑制LDH后的治疗效果^[50]。

CRISPR-Cas9功能基因筛选技术不仅可用于研究HCC,也可应用于研究肝内胆管癌。目前人们对肝内胆管癌发生发展机制的认识相当不完善,因而缺乏针对性的有效治疗药物,导致治疗十分困难。研究者在肝脏特异性敲除*Smad4/Pten*基因的小鼠中导入全基因组CRISPR文库,鉴别出15个潜在的肿瘤抑制基因,其中包括*Cul3*(Cullin3)。基质细胞中,*Cul3*缺失使Cxc19分泌量增加,进而引起T细胞浸润,导致胆管癌进展^[51]。另外,在类器官介导的药敏试验中,Sorafenib与PD1/PD-L1阻断疗法联合使用可显著抑制胆管癌生长^[51]。

4 CRISPR-Cas9功能基因筛选技术在肝癌研究中的前景与挑战

尽管肝癌研究获得了一定的突破性进展,但是在肝癌治疗方面仍然存在诸多难点,新的治疗策略有待进一步开发(图2C)。CRISPR-Cas9功能基因筛选技术可用于探索肿瘤异质性和推进肝癌个体化治疗。由于患者间异质性、肿瘤间异质性和肿瘤内异质性,不同肝癌患者具有难以预测的高度异质性的药物反应^[52]。通过高通量药物筛选,研究者深入探究了HCC的药物反应,结果表明,不同转录组背景的HCC细胞亚型对同一药物处理的反应不同,该研究有助于针对不同个体的分子特征设计治疗方案^[53]。既往研究表明,转录组水平的异质性是导致肝癌患者临床反应存在差异的重要原因之一。因此,利用功能基因筛选技术研究不同转录组亚型肝癌细胞的特异性弱点,可能会在分子层面提供新的潜在治疗靶点,最终有助于个体化治疗策略的发展。值得注意的是,目前DepMap数据库仅收录大约20种肝癌细胞株的基因依赖性分析数据,这并不足以代表肝癌这种高度异质性疾病的分子水平多样性。因此,需要建立更多的肝癌细胞模型,以促进肝癌精确治疗的发展^[54]。

高复发率或高转移率也是改善肝癌患者预后的主要障碍之一。高达70%的肝癌患者会在手术治疗后5年内发生肿瘤复发或转移^[1]。虽然CRISPR-Cas9功能基因筛选技术可以用来探索实体瘤转移过程相关调控基因,但该技术仍然存在一定局限性^[55]。移植瘤模型并不能完美地模拟体内微环境,这意味着该模型无法完全呈现肝癌转移的真实过程,因而影响研究结果的可信度。此外,功能缺失型筛选通常用于鉴别抑制转移的调控因子,但研发抑制转移的小分子药物十分困难,故而功能获得型筛选可能更有助于揭示调控癌症转移的新靶点^[56]。正因为复发和转移是影响肝癌患者预后的重要因素之一,所以亟需建立一种更合适的可用于探究肝癌转移相关调控因子的体内模型。

除此之外,为了解析与抗肿瘤免疫相关的复杂调控过程,研究者开发了多种筛选模型,包括单一细胞模型、肿瘤细胞和免疫细胞共培养模型,以及体内模型^[57]。通过单一细胞筛选,研究者发现CMTM6和CMTM4是PDL1的调节因子,它们可能在免疫疗法导致的耐药过程中发挥作用^[58-59]。利用肿瘤细胞和免疫细胞相互作用,一项在6种小鼠癌细胞系与T细胞共培养过程中分别进行的全基因组CRISPRko筛选,确定了一组包含182个基因的调控因子,这些基因可能帮助癌细胞逃避细胞毒性T细胞对它的杀伤作用^[60]。与体外模型相比,体内模型能更精确地模拟肿瘤微环境。研究者使用B16黑色素瘤细胞系进行体内CRISPRko筛选,分别收集免疫治疗后对照组和处理组小鼠的肿瘤,进行测序比较,结果发现*Ptpn2*缺失使肿瘤细胞对免疫治疗更敏感^[61]。在肝癌研究领域,为了探究肝癌细胞与免疫细胞之间的关系,研究者利用肝癌原位移植模型,针对人类癌症中常见的突变基因进行了体内筛选,以鉴定免疫检查点抑制剂的潜在调节因子,结果提示*Kmt2d*缺失可促进抗原提呈和免疫浸润,从而增强抗肿瘤免疫应答反应,提高免疫治疗效果^[62]。

当前,进展期HCC患者对免疫检查点阻断疗法的应答率提示了肝癌研究的两个迫切需求:一是了解为什么只有小部分HCC患者对免疫治疗有反应;二是确定新的治疗方法来增加抗肿瘤免疫反应。就体内筛选而言,考虑到肝脏免疫微环境具有一定的独特性,原位移植模型可能更优于异位移植模型。然而,由于模型构建存在复杂性,原位移植模

型尚未广泛应用于肝癌免疫治疗研究。此外,选择合适的细胞系来研究抗肿瘤免疫也至关重要。例如,只有对免疫检查点阻断疗法具有抵抗作用的细胞系才适用于探究免疫疗法的联合策略。总的来说,CRISPR-Cas9功能基因筛选可以帮助人们理解肿瘤-免疫的相互调控关系,并为改善当前免疫治疗效果提供思路。

5 结语

新兴的先进生物技术为深入了解肝癌的发病机制提供了基础,为寻找关键生物学过程的潜在调控因子提供了有效研究手段。通过CRISPR功能基因筛选,研究者对肿瘤发生的分子机制将有新的认识,该技术有助于寻找驱动耐药的调控因子和发现具有潜在治疗价值的新靶点。此外,目前肝癌领域正在开展一系列针对肿瘤异质性、肿瘤转移和复发、肿瘤-免疫相互作用的功能基因筛选研究。这些研究可能改变目前肝癌领域“一刀切”的治疗原则,为开创新治疗格局提供思路。

参考文献 (References)

- [1] LLOVET J M, KELLEY R K, VILLANUEVA A, et al. Hepatocellular carcinoma [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2021, 7(1): 6.
- [2] VILLANUEVA A. Hepatocellular carcinoma [J]. *New Engl J Med*, 2019, 380(15): 1450-62.
- [3] PONS F, VARELA M, LLOVET J M. Staging systems in hepatocellular carcinoma [J]. *HPB*, 2005, 7(1): 35-41.
- [4] LLOVET J M, SCHWARTZ M, MAZZAFERRO V. Resection and liver transplantation for hepatocellular carcinoma [J]. *Semin Liver Dis*, 2005, 25(2): 181-200.
- [5] LLOVET J M, BRUIX J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: chemoembolization improves survival [J]. *Hepatology*, 2003, 37(2): 429-42.
- [6] SALEM R, GORDON A C, MOULI S, et al. Y90 Radioembolization significantly prolongs time to progression compared with chemoembolization in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Gastroenterology*, 2016, 151(6): 1155-63, e2.
- [7] FINN R S, ZHU A X. Evolution of systemic therapy for hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2021, 73(Suppl 1): 150-7.
- [8] LLOVET J M, MONTAL R, SIA D, et al. Molecular therapies and precision medicine for hepatocellular carcinoma [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15(10): 599-616.
- [9] SOSMAN J A, KIM K B, SCHUCHTER L, et al. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib [J]. *New Engl J Med*, 2012, 366(8): 707-14.
- [10] LYNCH T J, BELL D W, SORDELLA R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib [J]. *New Engl J Med*, 2004, 350(21): 2129-39.
- [11] LLOVET J M, RICCI S, MAZZAFERRO V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma [J]. *New Engl J Med*, 2008, 359(4): 378-90.
- [12] KUDO M, FINN R S, QIN S, et al. Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial [J]. *Lancet*, 2018, 391(10126): 1163-73.
- [13] FINN R S, RYOO B Y, MERLE P, et al. Pembrolizumab As second-line therapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma in KEYNOTE-240: a randomized, double-blind, phase III trial [J]. *J Clin Oncol*, 2020, 38(3): 193-202.
- [14] YAU T, KANG Y K, KIM T Y, et al. Efficacy and safety of Nivolumab plus Ipilimumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma previously treated with sorafenib: the CheckMate 040 randomized clinical trial [J]. *JAMA Oncol*, 2020, 6(11): e204564.
- [15] FINN R S, QIN S, IKEDA M, et al. Atezolizumab plus Bevacizumab in unresectable hepatocellular carcinoma [J]. *New Engl J Med*, 2020, 382(20): 1894-905.
- [16] ZUCMAN-ROSSI J, VILLANUEVA A, NAULT J C, et al. Genetic landscape and biomarkers of hepatocellular carcinoma [J]. *Gastroenterology*, 2015, 149(5): 1226-39, e4.
- [17] REBOUISSOU S, NAULT J C. Advances in molecular classification and precision oncology in hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol*, 2020, 72(2): 215-29.
- [18] YANG C, HUANG X, LIU Z, et al. Metabolism-associated molecular classification of hepatocellular carcinoma [J]. *Mol Oncol*, 2020, 14(4): 896-913.
- [19] VASAN N, BASELGA J, HYMAN D M. A view on drug resistance in cancer [J]. *Nature*, 2019, 575(7782): 299-309.
- [20] BERNARDS R, BRUMMELKAMP T R, BEIJERSBERGEN R L. shRNA libraries and their use in cancer genetics [J]. *Nat Methods*, 2006, 3(9): 701-6.
- [21] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-23.
- [22] MALI P, YANG L, ESVELT K M, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9 [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 823-6.
- [23] EVERS B, JASTRZEBSKI K, HEIJMANS J P, et al. CRISPR knockout screening outperforms shRNA and CRISPRi in identifying essential genes [J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(6): 631-3.
- [24] WANG C, CAO Y, YANG C, et al. Exploring liver cancer biology through functional genetic screens [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(10): 690-704.
- [25] HSU P D, LANDER E S, ZHANG F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering [J]. *Cell*, 2014, 157(6): 1262-78.
- [26] MILES L A, GARIPPA R J, POIRIER J T. Design, execution, and analysis of pooled *in vitro* CRISPR/Cas9 screens [J]. *FEBS J*, 2016, 283(17): 3170-80.
- [27] BEHAN F M, IORIO F, PICCO G, et al. Prioritization of cancer therapeutic targets using CRISPR-Cas9 screens [J]. *Nature*, 2019, 568(7753): 511-6.
- [28] RUIZ S, MAYOR-RUIZ C, LAFARGA V, et al. A Genome-wide CRISPR Screen Identifies CDC25A as a Determinant of Sensitivity to ATR Inhibitors [J]. *Mol Cell*, 2016, 62(2): 307-13.
- [29] QI L S, LARSON M H, GILBERT L A, et al. Repurposing CRIS-

- PR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression [J]. *Cell*, 2013, 152(5): 1173-83.
- [30] GILBERT L A, LARSON M H, MORSUT L, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes [J]. *Cell*, 2013, 154(2): 442-51.
- [31] GILBERT L A, HORLBECK M A, ADAMSON B, et al. Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation [J]. *Cell*, 2014, 159(3): 647-61.
- [32] KONERMANN S, BRIGHAM M D, TREVINO A E, et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex [J]. *Nature*, 2015, 517(7536): 583-8.
- [33] WANG T, WEI J J, SABATINI D M, et al. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system [J]. *Science*, 2014, 343(6166): 80-4.
- [34] LI F, HUANG Q, LUSTER T A, et al. *In vivo* epigenetic CRISPR screen identifies *Asf1a* as an immunotherapeutic target in *Kras*-Mutant lung adenocarcinoma [J]. *Cancer Discov*, 2020, 10(2): 270-87.
- [35] JOUNG J, KONERMANN S, GOOTENBERG J S, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout and transcriptional activation screening [J]. *Nat Protoc*, 2017, 12(4): 828-63.
- [36] FAIVRE S, RIMASSA L, FINN R S. Molecular therapies for HCC: looking outside the box [J]. *J Hepatol*, 2020, 72(2): 342-52.
- [37] BOSHUIZEN J, PEEPER D S. Rational cancer treatment combinations: an urgent clinical need [J]. *Mol Cell*, 2020, 78(6): 1002-18.
- [38] WEI L, LEE D, LAW C T, et al. Genome-wide CRISPR/Cas9 library screening identified PHGDH as a critical driver for Sorafenib resistance in HCC [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 4681.
- [39] LU Y, SHEN H, HUANG W, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in hepatocellular carcinoma with lenvatinib resistance [J]. *Cell Death Discov*, 2021, 7(1): 359.
- [40] JIN H, SHI Y, LV Y, et al. EGFR activation limits the response of liver cancer to lenvatinib [J]. *Nature*, 2021, 595(7869): 730-4.
- [41] WANG C, WANG H, LIEFTINK C, et al. CDK12 inhibition mediates DNA damage and is synergistic with sorafenib treatment in hepatocellular carcinoma [J]. *Gut*, 2020, 69(4): 727-36.
- [42] WANG C, JIN H, GAO D, et al. Phospho-ERK is a biomarker of response to a synthetic lethal drug combination of sorafenib and MEK inhibition in liver cancer [J]. *J Hepatol*, 2018, 69(5): 1057-65.
- [43] XU F, TONG M, TONG C S W, et al. A combinatorial CRISPR-Cas9 screen identifies Ifenprodil as an adjunct to Sorafenib for liver cancer treatment [J]. *Cancer Res*, 2021, 81(24): 6219-32.
- [44] CHEN Y, LI L, LAN J, et al. CRISPR screens uncover protective effect of PSTK as a regulator of chemotherapy-induced ferroptosis in hepatocellular carcinoma [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 11.
- [45] WANG K, ZHANG Z, TSAI H I, et al. Branched-chain amino acid aminotransferase 2 regulates ferroptotic cell death in cancer cells [J]. *Cell Death Differ*, 2021, 28(4): 1222-36.
- [46] LI L, YU S, HU Q, et al. Genome-scale CRISPRa screening identifies *MTX1* as a contributor for sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma by augmenting autophagy [J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(12): 3133-44.
- [47] SONG C Q, LI Y, MOU H, et al. Genome-wide CRISPR screen identifies regulators of mitogen-activated protein kinase as suppressors of liver tumors in mice [J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(5): 1161-73, e1.
- [48] WANG C, VEGNA S, JIN H, et al. Inducing and exploiting vulnerabilities for the treatment of liver cancer [J]. *Nature*, 2019, 574(7777): 268-72.
- [49] GUO Y, WANG J, BENEDICT B, et al. Targeting CDC7 potentiates ATR-CHK1 signaling inhibition through induction of DNA replication stress in liver cancer [J]. *Genome Med*, 2021, 13(1): 166.
- [50] PERKONS N R, JOHNSON O, PILLA G, et al. Functional genetic screening enables theranostic molecular imaging in cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(17): 4581-9.
- [51] ZHAO M, QUAN Y, ZENG J, et al. Cullin3 deficiency shapes tumor microenvironment and promotes cholangiocarcinoma in liver-specific *Smad4*/*Pten* mutant mice [J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(15): 4176-91.
- [52] CRAIG A J, VON FELDEN J, GARCIA-LEZANA T, et al. Tumour evolution in hepatocellular carcinoma [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 17(3): 139-52.
- [53] CARUSO S, CALATAYUD A L, PILET J, et al. Analysis of liver cancer cell lines identifies agents with likely efficacy against hepatocellular carcinoma and markers of response [J]. *Gastroenterology*, 2019, 157(3): 760-76.
- [54] BOEHM J S, GOLUB T R. An ecosystem of cancer cell line factories to support a cancer dependency map [J]. *Nat Rev Genet*, 2015, 16(7): 373-4.
- [55] ZHOU X, LI R, JING R, et al. Genome-wide CRISPR knockout screens identify *ADAMTSL3* and *PTEN* genes as suppressors of HCC proliferation and metastasis, respectively [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2020, 146(6): 1509-21.
- [56] MORRIS L G, CHAN T A. Therapeutic targeting of tumor suppressor genes [J]. *Cancer*, 2015, 121(9): 1357-68.
- [57] LIU D, ZHAO X, TANG A, et al. CRISPR screen in mechanism and target discovery for cancer immunotherapy [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2020, 1874(1): 188378.
- [58] MEZZADRA R, SUN C, JAE L T, et al. Identification of *CMTM6* and *CMTM4* as PD-L1 protein regulators [J]. *Nature*, 2017, 549(7670): 106-10.
- [59] BURR M L, SPARBIER C E, CHAN Y C, et al. *CMTM6* maintains the expression of PD-L1 and regulates anti-tumour immunity [J]. *Nature*, 2017, 549(7670): 101-5.
- [60] LAWSON K A, SOUSA C M, ZHANG X, et al. Functional genomic landscape of cancer-intrinsic evasion of killing by T cells [J]. *Nature*, 2020, 586(7827): 120-6.
- [61] MANGUSO R T, POPE H W, ZIMMER M D, et al. *In vivo* CRISPR screening identifies *Ptpn2* as a cancer immunotherapy target [J]. *Nature*, 2017, 547(7664): 413-8.
- [62] WANG G, CHOW R D, ZHU L, et al. CRISPR-GEMM pooled mutagenic screening identifies *KMT2D* as a major modulator of immune checkpoint blockade [J]. *Cancer Discov*, 2020, 10(12): 1912-33.