

CRISPR/Cas9 递送系统的研究现状及应用进展

潘秀华,吴正红,祁小乐^{*}

(中国药科大学药学院药剂系,南京 211198)

摘要 针对 CRISPR/Cas9 系统在 DNA、RNA 和蛋白 3 种水平的递送形式,本文着重介绍了 CRISPR/Cas9 系统的病毒载体和非病毒载体的研究现状和 CRISPR/Cas9 系统递送的新策略,及其在生物医学领域和基因相关疾病治疗的应用进展。通过对 CRISPR/Cas9 系统递送和基因治疗策略进行总结与阐述,为创新药物的发现和基因治疗的开发提供新思路。

关键词 CRISPR/Cas9 系统;基因编辑;病毒载体;非病毒载体;基因治疗

中图分类号 R944 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2020)01-0010-09

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20200102

引用本文 潘秀华,吴正红,祁小乐. CRISPR/Cas9 递送系统的研究现状及应用进展[J]. 中国药科大学学报,2020,51(1):10-18.
Cite this article as: PAN Xiuhua, WU Zhenghong, QI Xiaole. Research status and application progress of CRISPR/Cas9 delivery system[J]. J China Pharm Univ, 2020, 51(1):10-18.

Research status and application progress of CRISPR/Cas9 delivery system

PAN Xiuhua, WU Zhenghong, QI Xiaole^{*}

Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract Based on the three delivery forms of CRISPR/Cas9 system at the levels of DNA, RNA and protein, this paper mainly approaches the development and new strategies of CRISPR/Cas9 delivery systems, as well as their application in the biomedical field and the clinical treatment of gene-related diseases. By summarizing and elaborating the CRISPR/Cas9 system delivery and gene therapy strategy, new ideas are provided for the discovery of innovative drugs and the development of gene therapy.

Key words CRISPR/Cas9 system; gene editing; viral vector; non-viral vector; gene therapy

This study was supported by the Double First-Class International Drug Registration Innovation Team of China Pharmaceutical University (No. CPU2018GY40)

规律成簇的间隔短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats sequences, CRISPR) 是能为细菌和古生菌提供对病毒和质粒的适应性免疫的 DNA 重复序列^[1]。CRISPR 系统有 I 型、II 型和 III 型,其中 CRISPR/Cas9 作为 II 型的标记基因研究最多,是锌指核酸内切酶 (zinc finger nuclease, ZFN)、类转录激活因子效应物核酸酶 (transcription activator-like effector nuclease, TALEN) 之外出现的第 3 代基因编辑技术,其介导的基因编辑可用于生成转基因模

型、调节转录、调控表观遗传等。

CRISPR/Cas9 系统主要是由 Cas9 蛋白和单链导向 RNA (single guide RNA, sgRNA) 组成,其中 Cas9 蛋白具有切割 DNA 双链功能,sgRNA 起导向作用,在原型间隔区相邻的基序 (protospacer-adjacent motif, PAM) 存在的情况下,Cas9 蛋白可以在 sgRNA 导向作用下通过碱基互补配对到达不同的靶部位,切割靶基因实现 DNA 双链断裂 (double strand break, DSB)。DSB 修复有两种机制:(1) 非同源末端连接 (non-homologous end joining,

NHEJ), NHEJ 介导的修复可在 DNA 双链断裂位点产生不精确的可变长度的插入和/或删除突变;(2) 同源重组修复(homology-directed repair,

HDR), HDR 介导的精确修复可以从单链或双链 DNA 供体模板引入精确的点突变或插入突变^[2](图 1)。

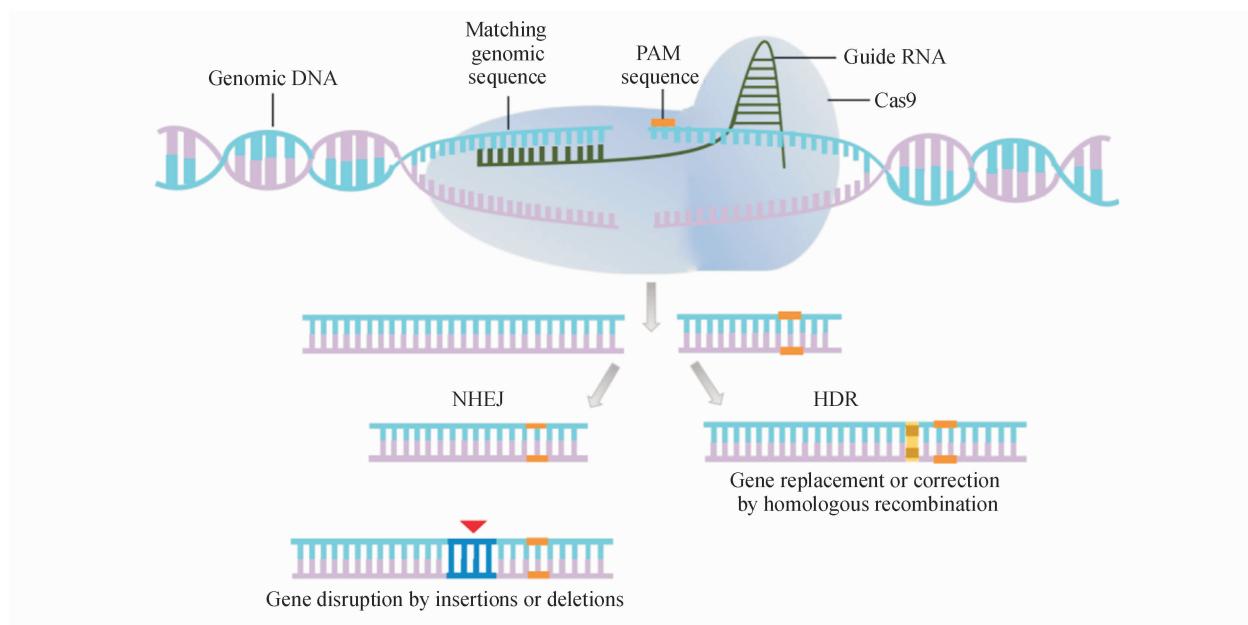


Figure 1 Schematic of CRISPR-Cas9-mediated genome editing^[3]

目前,CRISPR/Cas9 系统的递送可分为基于质粒、RNA 和蛋白质这 3 种水平的递送。其中,递送编码 Cas9 蛋白和 sgRNA 的质粒无需多次转染,方便快捷,稳定性高;递送编码 Cas9 蛋白的 mRNA 相较于递送质粒有更低的脱靶率;直接递送 Cas9 蛋白相较于 DNA 或 RNA 的递送方式有一定的优势,其免疫原性低且不存在将 CRISPR 基因永久整合到宿主基因组中的潜在问题。CRISPR/Cas9 系统的递送常用到的物理方法有电穿孔法^[4]、显微注射法^[5]和尾静脉高压注射法^[6]等。CRISPR/Cas9 系统的病毒载体有腺病毒(AAV)、慢病毒(LV)和噬菌体等。随着近几年纳米技术的发展,CRISPR/Cas9 系统的非病毒载体在体内和体外都有效地实现了向细胞和组织的递送,纳米载体逐渐成为 CRISPR/Cas9 系统基因治疗的潜力工具,新兴的递送策略也使得 CRISPR/Cas9 系统的递送更加成熟。

由于 CRISPR/Cas9 系统的高效性、多功能性和简便性,该系统已成为生物医学领域治疗多种疾病的新策略,如治疗传染病、治疗肿瘤、建立人类疾病模型等。然而由于基因水平的修饰存在局限性,CRISPR/Cas9 系统的发展仍需要进一步的探索研究以实现其更大的应用价值。

1 CRISPR/Cas9 系统的递送形式

CRISPR/Cas9 系统要实现 Cas9 蛋白和 sgRNA 两个元件的递送,其中 Cas9 蛋白的递送形式可以分为以下 3 种(图 2):(1)递送表达 Cas9 蛋白的质粒;(2)递送编码 Cas9 蛋白的 mRNA;(3)直接递送 Cas9 蛋白。3 种递送形式的 CRISPR/Cas9 系统都能在 sgRNA 的导向作用下到达靶部位从而有效地实现基因组编辑^[7]。

1.1 从 DNA 水平递送 CRISPR/Cas9 系统

由于稳定性高、操作简单、成本低等优点,从 DNA 水平递送编码 Cas9 蛋白和 sgRNA 的质粒是一种常用的递送形式。然而递送质粒会降低基因编辑效率,延长 Cas9 蛋白切割时间从而使脱靶率增加,另外还有基因整合风险等。

为了提高质粒转染的基因编辑效率,Shin 等^[8]将编码 Cas9 蛋白及 sgRNA 的质粒迭代转染到 CHO 细胞,与传统的单次转染方法相比,迭代转染将 Cas9 蛋白和 sgRNA 的表达水平提高了 3 倍。同时该研究还分别验证了将单个及多个 sgRNA 与 Cas9 蛋白共同编码进质粒,最终对单基因和多基因实现靶向基因编辑,通过迭代转染最终使单基因和多基因靶点的突变率平均都增加 2 倍。

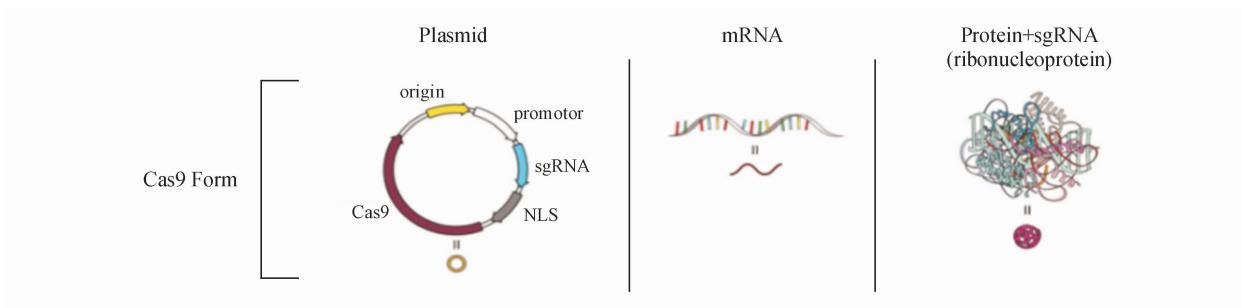


Figure 2 Schematic of CRISPR-Cas9-mediated genome editing^[7]

Ghassemi 等^[9]构建编码 Cas9 蛋白和双 sgRNA 的质粒,旨在靶向断裂 *Hbb-bs* 基因的外显子 2 和 3 位点,将重组质粒通过显微注射法递送到供体受精卵,将受精卵植入受孕小鼠进行后代筛选和基因分型,最终建立了 *Hbb-bs* 基因敲除的 β-地中海贫血小鼠模型。

1.2 从 RNA 水平递送 CRISPR/Cas9 系统

RNA 水平的递送是递送编码 Cas9 蛋白的 mRNA 和 sgRNA, mRNA 只需递送到细胞质,在细胞质中核糖体的作用下翻译成 Cas9 蛋白。该递送方式的局限性在于 mRNA 本身稳定性差且在体内和体外都易受到 RNA 酶的降解,因此需要合适的递送方法来保护 mRNA 不被酶降解。

Miller 等^[10]制备了可以包封长序列 RNA 的两性离子氨基脂质(zwitterionic amino lipid, ZAL)非病毒载体,其由阳离子脂质和两性离子脂质结合而成,阳离子脂质含 RNA 结合域并有助于内体逃逸,两性离子脂质帮助 RNA 溶解。利用该载体首次实现编码 Cas9 蛋白的 mRNA 和 sgRNA 的体内外共递送,且与瞬态疗法 RNAi 对比,ZAL 递送编码 Cas9 蛋白的 mRNA 和 sgRNA 能永久实现基因编辑并持续下调 95% 的蛋白表达。

1.3 从蛋白水平递送 CRISPR/Cas9 系统

递送 Cas9 蛋白和 sgRNA 是最直接简便的方法,该形式无转录和翻译过程,基因编辑更快速高效,脱靶率低且毒性小。Cas9 蛋白和 sgRNA 可形成核糖蛋白复合物(ribonucleoprotein complex, RNP),Cas9 蛋白通常带有核定位信号(nuclear localization sequence, NLS)帮助 RNP 入核完成基因编辑,该形式递送的难点在于 RNP 尺寸较大不易包封,因此探索其合适的递送载体尤为重要,目前 RNP 常用载体有脂质体、金纳米颗粒、阳离子聚合物等,近几年新型载体的开发也能帮助 RNP 完成

内体逃逸并入核,如 DNA 纳米花^[11],锌和咪唑复合框架^[12],ARRDC1 介导的细胞微泡^[13]等。

Zuris 等^[14]将带正电的 Cas9 蛋白与带负电的 GFP 蛋白融合,再与 sgRNA 形成复合物。体外结果显示,利用阳离子脂质体递送融合了 GFP 蛋白的 RNP 比直接递送质粒具有更高的基因编辑效率。体内研究结果表明,经阳离子脂质体体内递送 RNP 至小鼠内耳,最终基因编辑效率约为 20%。

2 CRISPR/Cas9 系统的病毒载体

近年来,CRISPR/Cas9 系统的病毒载体因其高效的转染效率和稳定的转基因表达,在体内外均得到了广泛的应用。常用的病毒载体包括腺相关病毒(adenoviral vectors, AAV)、腺病毒(adeno-associated viruses, AdV)、慢病毒(lentiviral vectors, LV)和噬菌体(bacteriophages)。

2.1 腺相关病毒(AAV)

由于 AAVs 具有良好的安全性和治疗潜力,其已经被批准用于基因增强治疗的一些人类临床试验。相对于其他病毒载体,腺相关病毒载体表现出更低的免疫原性,因此 AAVs 是递送 CRISPR/Cas9 系统应用最广泛的病毒载体。AAVs 载体的局限性在于其包封量仅 4.7 kb,而来源于酿脓链球菌的 Cas9 蛋白(*Streptococcus pyogenes* Cas9, SpCas9)的大粒径致使需要 AAVs 载体分别递送 Cas9 蛋白和 sgRNA,针对包封尺寸的限制,更小的 Cas9 蛋白的变体被研究出来。Ran 等^[15]筛选出来自金黄色葡萄球菌的 Cas9 蛋白(*Staphylococcus aureus* Cas9, SaCas9),与 SpCas9 有类似的基因编辑能力,同时缩短了超过 1 kb。

Bengtsson 等^[16]证实 AAV 可以递送靶向肌肉基因的 CRISPR/Cas9 系统,并在体内完成 HDR 介导的杜氏肌营养不良症(duchenne muscular dystro-

phy, DMD) 相关基因编辑。Yoon 等^[17] 通过重组腺相关病毒 (recombinant adeno-associated viruses, rAAVs) 将 CRISPR/Cas9 系统转导到小鼠胚胎中, 从而产生遗传改造的小鼠。由于 rAAVs 无需胚胎分离、显微注射、胚胎培养和转移到假孕雌性冗长的过程, 该研究可以进一步促进小鼠及其他哺乳动物的基因编辑。

2.2 腺病毒(AdV)

AdV 是一种无包膜的具有二十面体核衣壳结构的双链 DNA 病毒, 它具有良好的生物学特性、遗传稳定性、高基因转导效率和大规模易用性。Ehrke-Schulz 等^[18] 用高容量腺病毒 (high-capacity adenoviral vectors, HCAv) 作为载体, 该载体不表达任何降低免疫原性的病毒基因。该研究构建了人类乳突病毒 (human papilloma virus, HPV) 致癌基因 E6, 杜氏肌营养不良症 (DMD) 肌养蛋白相关基因, HIV 共受体 C-C 趋化因子受体 5 (C-C chemokine receptor type 5, CCR5) 2 种基因靶向的 CRISPR/Cas9 递送机制, 最高的基因插入缺失可达 93%, 但 HCAv 递送 CRISPR/Cas9 系统还未应用于体内。Jin 等^[19] 以 AdV 为载体开发了基于 CRISPR 的基因敲除的简化方法, 能进行基因敲除的表型分析, 且无需克隆选择和扩增。

2.3 慢病毒(LV)

慢病毒的包封量在 8 kb 左右, 是由单链 RNA 组成的球形结构, 在递送 CRISPR/Cas9 系统中被广泛应用。LV 同腺病毒相同, 其删除所有基因从而不会激活免疫系统。LV 作为对 CRISPR/Cas9 的递送载体, 宿主基因组整合可能导致不必要的非靶点插入突变, 存在安全性风险。目前大多数实验室不具备制备非基因组整合 LV 载体的能力, 因此 LV 的使用频率低于 AAV 和 AdV, 其最常用于建立疾病模型。

Holmgard 等^[20] 开发了基于慢病毒的递送载体, 其能够敲除血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, Vegfa) 基因。结果显示, 通过慢病毒载体递送的 SpCas9 蛋白和 sgRNA 可以实现小鼠视网膜中的 Vegfa 基因组编辑, 该发现为开发治疗眼部疾病的提供了新策略。Tagliafierro 等^[21] 利用慢病毒作为载体, 将 dCas9 与 DNA 甲基转移酶 3A (DNMT3A) 的催化域融合, 以递送 CRISPR/dCas9-DNA 甲基化系统。从表观遗传学

角度调控 SNCA 基因的表达水平, 为从基因层面上治疗帕金森疾病提供了依据。

Lu 等^[22] 开发了一种慢病毒生物纳米颗粒 (lentivirus-like bionanoparticle, LVLP) 载体, 能包封多达 100 个表达 SaCas9 蛋白的 mRNA。与用腺相关病毒或表达 SaCas9 的慢病毒转导的细胞相比, 用含有 SaCas9 mRNA 的 LVLP 转导的细胞中发生较低的脱靶率。

2.4 噬菌体

噬菌体载体主要用于抗多药耐药菌, 由于其狭窄的宿主选择性, 其研究应用相对较少。Yosef 等^[23] 利用裂解噬菌体递送 CRISPR/Cas9 系统择性地杀死多重耐药细菌。Qazi 等^[24] 从噬菌体 P22 衍生出类病毒颗粒 (virus-like particles, VLPs), 将 Cas9 蛋白和 sgRNA 包封到 P22 VLP 中, 结果表明包封了 Cas9 和 sgRNA 后的 P22 VLP 可以靶向断裂 DNA 双链从而有效地实现基因编辑, 该研究证实了 P22 作为 CRISPR/Cas9 系统细胞特异性靶向载体的潜力。

3 CRISPR/Cas9 系统的非病毒载体

尽管病毒载体通过细胞转导能够有效地递送 CRISPR/Cas9 系统, 但仍可能在宿主体内引起不必要的免疫原性和突变风险, 从而限制其临床转化。近年来非病毒载体尤其是纳米载体对 CRISPR/Cas9 系统递送的研究取得了一定进展。

3.1 脂质体

目前市面上有商业化的脂质体载体, 如 LipofectamineTM, TurboFectTM, 和 StemfectTM 等已经完成了对 CRISPR/Cas9 系统的递送, 在此基础上新型脂质体载体的开发也取得了初步进展。

Li 等^[25] 开发了含有二硫键的阳离子脂质体对 Cas9 蛋白和 sgRNA 递送并实现基因编辑, 载 CRISPR/Cas9 系统后的纳米颗粒有较高的靶向基因敲除能力并具有较低毒性, 同时还研究了其体内分布情况, 该研究为疾病造模和治疗方面提供了递送基因编辑工具的新途径。

Cho 等^[26] 在设计了靶向二肽基肽酶-4 基因 (dipeptidyl peptidase-4 gene, DPP-4) 的 sgRNA, 与 Cas9 蛋白形成复合物并用卵磷脂阳离子脂质体进行包封, 将纳米制剂静脉注射到二型糖尿病小鼠体内, 能显著实现 DPP-4 基因破坏, 同时还伴随着血

糖水平正常化,胰岛素反应和肝肾损伤降低,该研究开发的卵磷脂阳离子脂质体作为改善人肝病基因组编辑疗法的载体具有巨大潜力。

3.2 聚合物

聚合物广泛用于基因药物的递送。带正电荷的聚合物可以通过静电吸引与带负电荷的核酸复合完成对基因药物的包封,有研究表明聚合物载体是通过与相同的网格蛋白介导的内吞作用机制进入细胞。

二硫键和咪唑基团能够帮助载体 RNP 有效地包封、细胞摄取、内体逃逸以及在细胞质内成功释放 RNP。Wang 等^[27]制备了氧化还原响应型 PBAP 复合物和 CLPBAP 复合物(即非交联和交联),其含有二硫键和咪唑基团能够有效地包载带负电的 RNP。将金刚烷(adamantane, AD)和 β-环糊精(β-cyclodextrin, β-CD)与基于 PBAP 的聚合物缀合,通过 β-CD 和 AD 之间的主客体相互作用形成的交联 PBAP 复合物,在聚阴离子聚合物如血清白蛋白的存在下比非交联的 PBAP 复合物更稳定(图 3-A)。类似地,Chen 等^[28]制备了含有阳离子嵌段共聚物的载体,其含有二硫键和咪唑基团,是谷胱甘肽(glutathione, GSH)响应型纳米载体,实现了对带负电的 RNP 的包载并完成内体逃逸,该载体具有相对较高的转染效率和较低的细胞毒性。

3.3 金纳米颗粒

金纳米颗粒作为无机纳米材料具有优异的化学稳定性、良好的生物相容性和较大的比表面积,可进行化学修饰用作基因递送的良好平台。Mout 等^[29]用精氨酸金纳米颗粒(ArgNPs)实现了对 Cas9 蛋白和 sgRNA 的共递送,ArgNPs 将 RNP 有效地递送到细胞质,随后向细胞核转运,该方法实现了高达 90% 的递送效率和 30% 的基因编辑效率。

Lee 等^[30]证明由金纳米颗粒与 DNA 结合并与阳离子聚合物复合组成的递送载体 CRISPR-Gold 可以将 RNP 和供体 DNA 递送到多种细胞中,通过 HDR 编辑基因有效地纠正导致杜氏肌营养不良(DMD)小鼠的 DNA 突变。CRISPR-Gold 为治疗点突变和缺失引起的 DMD 提供了一种新的治疗策略。

Wang 等^[31]制备金纳米簇(GNs)为核心以脂质为外壳的纳米载体,递送编码 Cas9 蛋白和 sgRNA 的质粒,同时用转录肽的 HIV-1 反式激活因子修饰 GNs,可将 CRISPR/Cas9 系统递送到细胞核中。sgRNA 设计为靶向肿瘤的 *Plk1* 基因来治疗黑素瘤,在体外导致 A375 细胞的 Plk1 蛋白表达下调超过 70%(图 3-B)。

3.4 其他新型非病毒载体

Sun 等^[11]通过滚环复制的方法制备了 DNA 纳米花(DNA Nanoclews, DNA NC),纯化的 Cas9 蛋白和 sgRNA 在体外形成 RNP,RNP 通过 sgRNA 和 DNA 纳米花之间的碱基互补配对原则与 DNA 纳米花相结合,成功包载后将带正电荷的 PEI 包被在 DNA 纳米花外以促进内体逃逸。该研究以 U2OS. EGFP 作为报告细胞系,证实了 DNA 纳米花载 CRISPR/Cas9 系统在 sgRNA 导向作用下能靶向破坏 EGFP 基因(图 3-C)。

Alsaifi 等^[12]利用含有咪唑基和锌离子制备的结构型载体(zeolitic imidazole frameworks, ZIFs),有效地实现了大粒径 Cas9 蛋白和 sgRNA 的包封制成 CC-ZIF 纳米颗粒,入胞后载体中的咪唑基在 pH 条件下质子化促进了 CC-ZIF 内体逃逸并向细胞核转运,最终对 EGFP 蛋白的表达水平下调 37%(图 3-D)。

除了上述新型的纳米载体之外,还有抑制蛋白结构域蛋白 1(ARRDC1)介导的微泡(ARRDC1-mediated microvesicles, ARMMs)^[13],氧化石墨烯(graphene oxide, GO)纳米载体^[32]等也实现了 CRISPR/Cas9 系统的递送。

4 CRISPR/Cas9 系统递送的新策略

4.1 Cas9 蛋白和 sgRNA 的修饰

为了更好地实现 CRISPR/Cas9 系统的递送,对 Cas9 蛋白和 sgRNA 修饰也被广泛研究,修饰后的 Cas9 蛋白和 sgRNA 可以降低脱靶率以及增加稳定性等。Ferdosi 等^[33]将 T 细胞受体接触残基疏水性与 HLA 结合,通过增强预测算法鉴定 HLA-A * 02:01 的两种免疫显性 SpCas9 T 细胞表位,研究发现 SpCas9 蛋白进行修饰后能消除免疫显性表位,同时保留其功能和特异性。

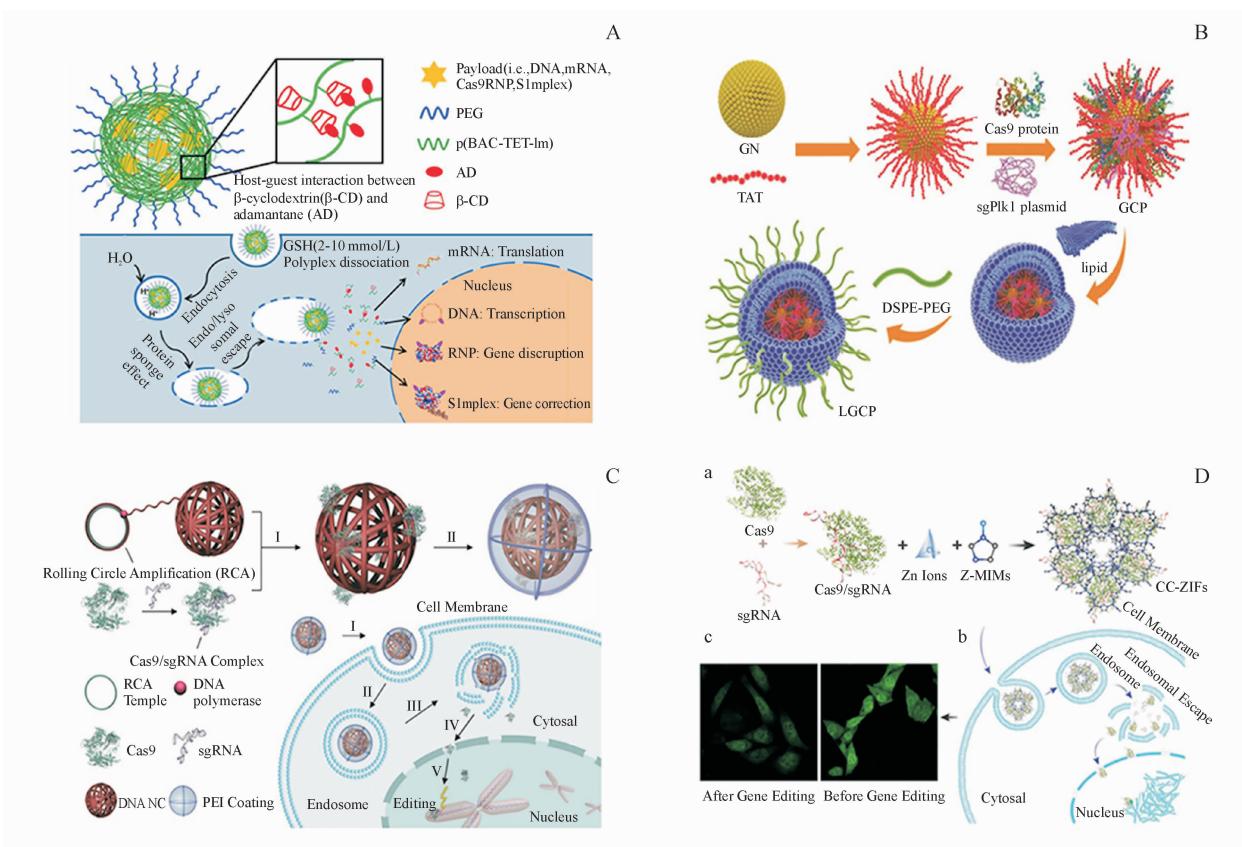


Figure 3 Nonviral vectors for CRISPR/Cas9 delivery

A; Illustration of a CLPBAP polyplex and the intracellular tracking pathway^[27]; B; Schematic diagram of the synthesis process of the LGCP^[31]; C; Preparation of Cas9/sgRNA/NC/PEI and delivery pathway to the nucleus^[11]; D; Schematic for the preparation of CC-ZIFs and endosomal escape^[12]

除了对 Cas9 蛋白进行修饰外,还可将 sgRNA 由 20 个核苷酸缩短到 17 或 18 个以降低脱靶率。Hendel 等^[34]合成 100 nt 全长 sgRNA 后,在 5' 端和 3' 端进行 2'-O-甲基(M),2'-O-甲基 3'-硫代磷酸酯 (MS) 或 2'-O-甲基 3'-硫代膦酰基乙酸酯 (MSP) 的 3 种不同化学修饰,结果表明,对 sgRNA 进行化学修饰后能增强人类原发性 T 细胞、CD34⁺ 造血干细胞和祖细胞的基因组编辑效率。

4.2 细胞穿透肽

细胞穿透肽 (cell penetrating peptide, CPP), 是一种具有跨细胞膜转运能力的短肽, 已被用作实现高效 Cas9 蛋白和 sgRNA 递送的工具。Suresh 等^[35]利用 CPP 的缀合实现了 CRISPR/Cas9 系统的递送并实现基因破坏。Ramakrishna 等^[36]证实 CPP 介导的重组 Cas9 蛋白和 sgRNA 的递送实现了有效的基因破坏, 并且与质粒转染相比脱靶突变率降低。

Lostalé-Seijo 等^[37]通过两亲性穿透肽与 Cas9

蛋白融合实现 RNP 的递送, 该两亲性穿透肽通过阳离子肽支架和疏水性醛尾之间的腙键形成。此类肽/蛋白质非共价纳米颗粒递送 CRISPR/Cas9 系统获得的最大基因编辑效率为 30% ~ 40%。

5 CRISPR/Cas9 系统在医学领域的应用

5.1 建立肿瘤疾病模型

CRISPR/Cas9 系统主要用于细胞水平和动物水平的疾病模型建立。在肿瘤研究中, 体细胞的遗传缺陷与病因和病理表型密切相关, 为从根本上寻求治疗肿瘤的方法, 现已建立多种基于 CRISPR/Cas9 系统的细胞水平肿瘤模型, 用于肿瘤基因、药物靶点和肿瘤耐药性的临床前验证。目前基于 CRISPR/Cas9 系统建立较多的肿瘤细胞模型有肺癌细胞系、乳腺癌细胞系和急性髓细胞性白血病细胞等。Annunziato 等^[38]建立了 CRISPR 介导的乳腺癌细胞株模型, 揭示了一种新的 HER2 基因靶向抗肿瘤机制, 该方法可以替代临床药物曲妥珠单

抗。Yamauchi 等^[39]为了确定急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 治疗的新靶点,首先对 AML 细胞系进行基因组 CRISPR-Cas9 筛选,最后在体内进行二次筛选。

目前用 CRISPR/Cas9 系统建立动物水平的肿瘤疾病模型主要为小鼠。Wang 等^[40]利用 CRISPR/Cas9 建立 KRAS-突变体肺腺癌 (lung adenocarcinomas, LUAD) 的小鼠模型,评估了 *Nfl* 基因缺失对 LUAD 发展的影响。Ideno 等^[41]利用 CRISPR/Cas9 介导的体细胞重组构建了小鼠模型用于研究胰腺癌的治疗。除肿瘤模型的建立,基于 CRISPR/Cas9 系统的小鼠模型还应用于其他疾病模型应用^[42],如帕金森病、阿尔茨海默病等。为了减小了和患者之间的差距且更适于进行药理研究,基于 CRISPR/Cas9 系统的大鼠^[43]、猪和猴等动物的多种疾病模型已被建立。

5.2 抗病毒研究

特异性破坏病毒基因是抗病毒策略的新途径,CRISPR/Cas9 系统由于其相对的通用性、特异性、灵活性和易用性,已成为各种抗病毒应用的首选之一。目前基于 CRISPR/Cas9 系统已经有针对人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV)、乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV)、疱疹病毒、人类乳头瘤病毒 (HPV) 等病毒的研究。

获得性免疫缺陷综合征 (acquired immune deficiency syndrome, AIDS) 是由人类免疫缺陷病毒 (HIV) 感染引起的,并且仍然无法治愈,抗逆转录病毒疗法可以抑制 HIV 的生命周期并大幅减少病毒复制,然而这种方法不能完全清除病毒,基因疗法能破坏 DNA 来永久性抑制 HIV 基因组,是治疗 AIDS 的新策略。人类免疫缺陷病毒 1 型 (HIV-1) 在人体中引起持续感染并在感染细胞中诱导 miR-146a 表达,Teng 等^[44]利用慢病毒作为载体递送 CRISPR/Cas9 系统,在 miR-146a 基因组序列中引入突变,抑制 miR-146a 表达增强细胞因子和 HIV-1 限制因子的表达,使 HIV-1 难以复制且原病毒无法再激活,该研究表明 CRISPR/Cas9 系统在为 AIDS 基因治疗领域带来巨大潜力。

疱疹病毒的基因治疗也用到了 CRISPR/Cas9 系统的基因编辑能力。人巨细胞病毒 (human cytomegalovirus, HCMV) 是疱疹病毒中最大的病毒,因其感染细胞后细胞肿大且内涵体巨大而得名。

Gergen 等^[45]通过多重 CRISPR/Cas9 递送敲除了 HCMV 基因 *UL122/123*,导致 HCMV 复制受损。Ynen 等^[46]针对 EB 疱疹病毒 (Epstein-Barr virus, EBV) 的治疗设计了靶向 EBV 基因组的 sgRNA,将 CRISPR/Cas9 系统转染到 C666-1 细胞中,转染细胞中 EBV 的 DNA 水平降低了约 50%。

5.3 治疗单基因及多基因疾病

最近的临床试验表明,基因疗法在治疗遗传性疾病方面取得了成功。血友病是一种单基因连锁隐性遗传疾病,*FIX* 基因突变会导致蛋白质功能下降和血液凝固异常。Stephens 等^[47]探索了腺病毒作为纠正 CRISPR/Cas9 介导的基因编辑的载体,以幼年 HB 小鼠作为模型,最终增强 *FIX* 基因表达活性及表型矫正。

通过 CRISPR/Cas9 系统对实现等位基因的选择性编辑有望在多种神经退行性疾病中得到更广泛的应用。亨廷顿舞蹈病 (Huntington's disease, HD) 是一种来源于功能获得性胞嘧啶-腺嘌呤-鸟嘌呤 (CAG) 扩增突变的单基因显性遗传神经退行性疾病。Shin 等^[48]提出了一种策略,通过 CRISPR/Cas9 系统使突变等位基因失活,以选择性地切除转录起始位点和 CAG 扩增突变。该策略导致突变等位基因的完全失活而不影响正常的等位基因。Dunbar 等^[49]证实 CRISPR/Cas9 系统可以在 HD 的体外模型中诱导插入缺失突变,可以降低线粒体生物标志物,然而还需要进一步证明该策略的安全性和有效性,以更快地向临床应用转化。

除治疗单基因遗传疾病外,CRISPR/Cas9 系统的优势在于可通过设计多种 sgRNA 序列实现多种靶位点的基因编辑,该基因编辑系统已经实现了阿尔茨海默病、肿瘤等多种多基因疾病的治疗。

6 总结与展望

病毒载体具有较高的转染效率,但其具有很高的突变率和致癌风险,这使得病毒载体应用于临床面临巨大挑战。此外,病毒装载能力有限,难以实现 CRISPR/Cas9 系统的高效递送,因此开发新的非病毒递送载体对 CRISPR/Cas9 系统介导的治疗至关重要。非病毒载体面临载药难、稳定性差、脱靶率高、靶向递送、免疫原性高以及生产制备困难等的局限性,在纳米技术的发展中也取得了突破性的进展。

多学科的共同发展交互融合有利于新型纳米递送载体的开发,材料化学方面的创新将继续推动 Cas9/sgRNA 系统纳米载体的发展,近年来,生物材料因其可调性、生物相容性和药物传递效率的不断提高而成为 CRISPR/Cas9 系统载体材料的绝佳选择。随着新生物材料技术的发展,开发出递送 CRISPR/Cas9 系统的生物材料载体需具有高基因编辑效率、高组织/细胞特异性、低免疫原性等优点,生物材料载体的开发将加速 CRISPR/Cas9 系统的临床转化。

CRISPR/Cas9 系统给基因治疗领域和各科学领域带来了曙光,尽管其面临着多方面的挑战,但新兴材料和新技术的发展为其向临床转化带来了希望,因此合理设计高效递送和靶向定位病灶组织的载体是现阶段的主要任务,相信随着研究的不断深入,CRISPR/Cas9 系统将有望发挥其应有的临床应用价值。

参 考 文 献

- [1] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. *Science*, 2012, **337**(6096):816–821.
- [2] Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, **32**(4):347–355.
- [3] Ghosh D, Venkataramani P, Nandi S, et al. CRISPR-Cas9 a boon or bane: the bumpy road ahead to cancer therapeutics [J]. *Cancer Cell Int*, 2019, **19**:12.
- [4] Laustsen A, Bak RO. Electroporation-based CRISPR/Cas9 gene editing using Cas9 protein and chemically modified sgRNAs [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, **1961**:127–134.
- [5] Strich JR, Chertow DS. CRISPR-cas biology and its application to infectious diseases [J]. *J Clin Microbiol*, 2019, **57**(4):e01307–e01318.
- [6] Goodwin T, Huang L. Nonviral vectors: we have come a long way [J]. *Adv Genet*, 2014, **88**:1–12.
- [7] Eoh J, Gu L. Biomaterials as vectors for the delivery of CRISPR-Cas9 [J]. *Biomater Sci*, 2019, **7**(4):1240–1261.
- [8] Shin J, Lee N, Song Y, et al. Efficient CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing in CHO cells via high-level sgRNA-Cas9 complex [J]. *Biotechnol Bioproc E*, 2015, **20**(5):825–833.
- [9] Ghassemi B, Shamsara M, Soleimani M, et al. Pipeline for the generation of gene knockout mice using dual sgRNA CRISPR/Cas9-mediated gene editing [J]. *Anal Biochem*, 2019, **568**:31–40.
- [10] Miller JB, Zhang SY, Kos P, et al. Non-viral CRISPR/cas gene editing *in vitro* and *in vivo* enabled by synthetic nanoparticle Co-delivery of Cas9 mRNA and sgRNA [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2017, **56**(4):1059–1063.
- [11] Sun WJ, Ji WY, Hall JM, et al. Self-assembled DNA nanoclews for the efficient delivery of CRISPR-Cas9 for genome editing [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015, **54**(41):12029–12033.
- [12] Alsaiari SK, Patil S, Alyami M, et al. Endosomal escape and delivery of CRISPR/Cas9 genome editing machinery enabled by nanoscale zeolitic imidazolate framework [J]. *J Am Chem Soc*, 2018, **140**(1):143–146.
- [13] Wang QY, Yu JJ, Kadungure T, et al. ARMMs as a versatile platform for intracellular delivery of macromolecules [J]. *Nat Commun*, 2018, **9**(1):960.
- [14] Zuris JA, Thompson DB, Shu YL, et al. Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing *in vitro* and *in vivo* [J]. *Nat Biotechnol*, 2015, **33**(1):73–80.
- [15] Ran FA, Cong L, Yan WX, et al. *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9 [J]. *Nature*, 2015, **520**(7546):186–191.
- [16] Bengtsson NE, Hall JK, Odom GL, et al. Muscle-specific CRISPR/Cas9 dystrophin gene editing ameliorates pathophysiology in a mouse model for Duchenne muscular dystrophy [J]. *Nat Commun*, 2017, **8**:14454.
- [17] Yoon Y, Wang D, Tai PWL, et al. Streamlined *ex vivo* and *in vivo* genome editing in mouse embryos using recombinant adeno-associated viruses [J]. *Nat Commun*, 2018, **9**(1):412.
- [18] Ehrke-Schulz E, Schiwon M, Leitner T, et al. CRISPR/Cas9 delivery with one single adenoviral vector devoid of all viral genes [J]. *Sci Rep*, 2017, **7**(1):17113.
- [19] Jin YH, Joo H, Lee K, et al. Streamlined procedure for gene knockouts using all-in-one adenoviral CRISPR-Cas9 [J]. *Sci Rep*, 2019, **9**(1):277.
- [20] Holmggaard A, Alsing S, Askou AL, et al. CRISPR gene therapy of the eye: targeted knockout of Vegfa in mouse retina by lentiviral delivery [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, **1961**:307–328.
- [21] Tagliafierro L, Ilich E, Moncalvo M, et al. Lentiviral vector platform for the efficient delivery of epigenome-editing tools into human induced pluripotent stem cell-derived disease models [J]. *J Vis Exp*, 2019(145). doi:10.3791/59241.
- [22] Lu BS, Javidi-Parsijani P, Makani V, et al. Delivering SaCas9 mRNA by Lentivirus-like bionanoparticles for transient expression and efficient genome editing [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, **47**(8):e44. doi:10.1093/nar/gkz093.
- [23] Yosef I, Manor M, Kiro R, et al. Temperate and lytic bacteriophages programmed to sensitize and kill antibiotic-resistant bacteria [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, **112**(23):7267–7272.
- [24] Qazi S, Miettinen HM, Wilkinson RA, et al. Programmed self-assembly of an active P22-Cas9 nanocarrier system [J]. *Mol*

- Pharm*, 2016, **13**(3):1191–1196.
- [25] Li YM, Bolinger J, Yu YJ, et al. Intracellular delivery and biodistribution study of CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein loaded biodegradable lipid nanoparticles [J]. *Biomater Sci*, 2019, **7**(2):596–606.
- [26] Cho EY, Ryu JY, Lee HAR, et al. Lecithin nano-liposomal particle as a CRISPR/Cas9 complex delivery system for treating type 2 diabetes [J]. *J Nanobiotechnology*, 2019, **17**(1):19.
- [27] Wang YY, Ma B, Abdeen AA, et al. Versatile redox-responsive polyplexes for the delivery of plasmid DNA, messenger RNA, and CRISPR-Cas9 genome-editing machinery [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, **10**(38):31915–31927.
- [28] Chen GJ, Ma B, Wang YY, et al. A universal GSH-responsive nanoplatform for the delivery of DNA, mRNA, and Cas9/sgRNA ribonucleoprotein [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, **10**(22):18515–18523.
- [29] Mout R, Rotello VM. Cytosolic and nuclear delivery of CRISPR/Cas9-ribonucleoprotein for gene editing using arginine functionalized gold nanoparticles [J]. *Bio Protoc*, 2017, **7**(20):e2586.
- [30] Lee K, Conboy M, Park HM, et al. Nanoparticle delivery of Cas9 ribonucleoprotein and donor DNA *in vivo* induces homology-directed DNA repair [J]. *Nat Biomed Eng*, 2017, **1**:889–901.
- [31] Wang P, Zhang LM, Xie Y, et al. Genome editing for cancer therapy: delivery of Cas9 protein/sgRNA plasmid via a gold nano-cluster/lipid core-shell nanocarrier [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2017, **4**(11):1700175.
- [32] Yue HH, Zhou XM, Cheng M, et al. Graphene oxide-mediated Cas9/sgRNA delivery for efficient genome editing [J]. *Nanoscale*, 2018, **10**(3):1063–1071.
- [33] Ferdosi SR, Ewaisha R, Moghadam F, et al. Multifunctional CRISPR-Cas9 with engineered immunosilenced human T cell epitopes [J]. *Nat Commun*, 2019, **10**(1):1842.
- [34] Hendel A, Bak RO, Clark JT, et al. Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2015, **33**(9):985–989.
- [35] Suresh B, Ramakrishna S, Kim H. Cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA for genome editing [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, **1507**:81–94.
- [36] Ramakrishna S, Kwaku Dad AB, Beloore J, et al. Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA [J]. *Genome Res*, 2014, **24**(6):1020–1027.
- [37] Lostalé-Seijo I, Louza I, Juanes M, et al. Peptide/Cas9 nanostructures for ribonucleoprotein cell membrane transport and gene edition [J]. *Chem Sci*, 2017, **8**(12):7923–7931.
- [38] Annunziato S, Kas SM, Nethe M, et al. Modeling invasive lobular breast carcinoma by CRISPR/Cas9-mediated somatic genome editing of the mammary gland [J]. *Genes Dev*, 2016, **30**(12):1470–1480.
- [39] Yamauchi T, Masuda T, Canver MC, et al. Genome-wide CRISPR-Cas9 screen identifies leukemia-specific dependence on a pre-mRNA metabolic pathway regulated by DCPS [J]. *Cancer Cell*, 2018, **33**(3):386–400.e5.
- [40] Wang XJ, Min SP, Liu HL, et al. Nfl loss promotes Kras-driven lung adenocarcinoma and results in Psat1-mediated glutamate dependence [J]. *EMBO Mol Med*, 2019, **11**(6):e9856.
- [41] Ideno N, Yamaguchi H, Okumura T, et al. A pipeline for rapidly generating genetically engineered mouse models of pancreatic cancer using *in vivo* CRISPR-Cas9-mediated somatic recombination [J]. *Lab Invest*, 2019, **99**(8):1233–1244.
- [42] Lee J, Bayarsaikhan D, Arivazhagan R, et al. CRISPR/Cas9 edited sRAGE-MSCs protect neuronal death in parkinson's disease model [J]. *Int J Stem Cells*, 2019, **12**(1):114–124.
- [43] Arias EB, Zheng XH, Agrawal S, et al. Whole body glucoregulation and tissue-specific glucose uptake in a novel Akt substrate of 160 kDa knockout rat model [J]. *PLoS One*, 2019, **14**(4):e0216236. doi:10.1371/journal.pone.0216236.
- [44] Teng Y, Luo MQ, Yu T, et al. CRISPR/Cas9-mediated deletion of miR-146a enhances antiviral response in HIV-1 infected cells [J]. *Genes Immun*, 2019, **20**(4):327–337.
- [45] Gergen J, Coulon F, Creneguy A, et al. Multiplex CRISPR/Cas9 system impairs HCMV replication by excising an essential viral gene [J]. *PLoS One*, 2018, **13**(2):e0192602. doi:10.1371/journal.pone.0192602.
- [46] Yuen KS, Wang ZM, Wong NM, et al. Suppression of Epstein-Barr virus DNA load in latently infected nasopharyngeal carcinoma cells by CRISPR/Cas9 [J]. *Virus Res*, 2018, **244**:296–303.
- [47] Stephens CJ, Lauron EJ, Kashentseva E, et al. Long-term correction of hemophilia B using adenoviral delivery of CRISPR/Cas9 [J]. *J Control Release*, 2019, **298**:128–141.
- [48] Shin JW, Kim KH, Chao MJ, et al. Permanent inactivation of Huntington's disease mutation by personalized allele-specific CRISPR/Cas9 [J]. *Hum Mol Genet*, 2016, **25**(20):4566–4576.
- [49] Dunbar GL, Koneru S, Kolli N, et al. Silencing of the mutant huntingtin gene through CRISPR-Cas9 improves the mitochondrial biomarkers in an *in vitro* model of Huntington's disease [J]. *Cell Transplant*, 2019, **28**(4):460–463.