



基因编辑药物的纳米递送系统

张瑶¹, 平渊^{1,2*}

1. 浙江大学药学院, 杭州 310058

2. 浙江大学医学院良渚实验室, 杭州 311121

* 联系人, E-mail: pingy@zju.edu.cn

2025-02-20 收稿, 2025-05-07 修回, 2025-05-09 接受, 2025-05-12 网络版发表

国家杰出青年科学基金(82425055)资助

摘要 随着基因组学和生物技术的快速发展, 基因编辑技术, 特别是CRISPR-Cas9系统, 已成为生物医学研究和治疗中的重要工具。然而, 传统的基因编辑器递送方法在递送效率和靶向性方面仍面临诸多挑战, 同时, 临床上最常用的病毒载体因其安全性问题也受到诸多限制。在此背景下, 纳米递送系统凭借其优越的物理化学性能逐渐成为递送基因编辑器的重要工具。纳米递送系统具备可调节的化学结构、良好的生物相容性以及针对特定器官组织的靶向能力。探讨纳米递送系统在基因编辑中的应用, 能够推动基因编辑技术的发展, 为更多疾病的治疗提供新的思路。本文将介绍当前研究较为广泛的基因编辑系统和纳米递送系统, 并重点分析不同纳米递送系统尤其是脂质纳米颗粒在基因编辑中的应用案例, 旨在探讨纳米递送系统在基因编辑领域的发展和未来, 期望其能够在临床治疗中得到更为广泛的实际应用, 为基因治疗的发展提供坚实支持。

关键词 基因编辑, 核酸药物, 纳米材料, 药物递送, 纳米药物

基因编辑技术依靠工程化核酸酶对生物体的目的基因进行特定的编辑, 从而实现基因的插入、缺失或替换, 最终改变生物体的遗传信息和表现特性。早在20世纪80年代初, 科学家就引入了重组DNA技术, 这也是基因编辑技术的开端^[1]。第一代基因编辑器是1982年发现的归巢核酸内切酶(meganuclease)^[2,3], 它能够识别并切割长DNA序列(12~40个碱基对), 该酶的切割位点具有非常高的特异性, 然而, 由于其设计与操作非常复杂, 应用受到显著限制。到2002年, 出现了以人工核酸酶为基础的二代基因编辑器, 包括锌指核酸酶(zinc finger nuclease, ZFN)和转录激活因子样效应核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)。ZFN通过锌指蛋白与特定DNA序列结合并进行切割(9~18个碱基对), 实现精准的基因编辑^[4]; 而TALEN则通过TALE蛋白实现对DNA的编辑(14~20个碱基对), 其设计相较于ZFN更为简便, 且特异性更高^[5]。转座子

技术和工程化核酸酶的出现进一步提升了基因编辑的效率与特异性。然而, 二代基因编辑器极度依赖于蛋白设计, 在操作复杂性和成本方面仍然存在一定限制。直到2012年, 成簇的规律间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)及CRISPR相关蛋白9 (CRISPR-associated protein 9, Cas9)技术的出现, 才使基因编辑技术真正进入公众视野^[6,7]。CRISPR-Cas9利用细菌的免疫系统, 通过向导RNA (sgRNA)找到目标DNA序列并进行切割, 能够实现快速而精准的基因修饰^[8](图1(a))。CRISPR-Cas9系统的特异性较高, 但在某些情况下会出现脱靶效应, 即编辑目标基因以外的基因也被误剪切。这种非特异性编辑可能导致难以预测的遗传变异, 进而引发潜在的安全隐患^[9]。随着基因编辑工具的迅速发展, 碱基编辑(base edit, BE)和先导编辑(prime edit, PE)在CRISPR-Cas9的基础上被开发出来, 它们能够对特定的

引用格式: 张瑶, 平渊. 基因编辑药物的纳米递送系统. 科学通报, 2025, 70: 3983–3998

Zhang Y, Ping Y. Nanodelivery systems for gene editing drugs (in Chinese). Chin Sci Bull, 2025, 70: 3983–3998, doi: [10.1360/TB-2025-0178](https://doi.org/10.1360/TB-2025-0178)

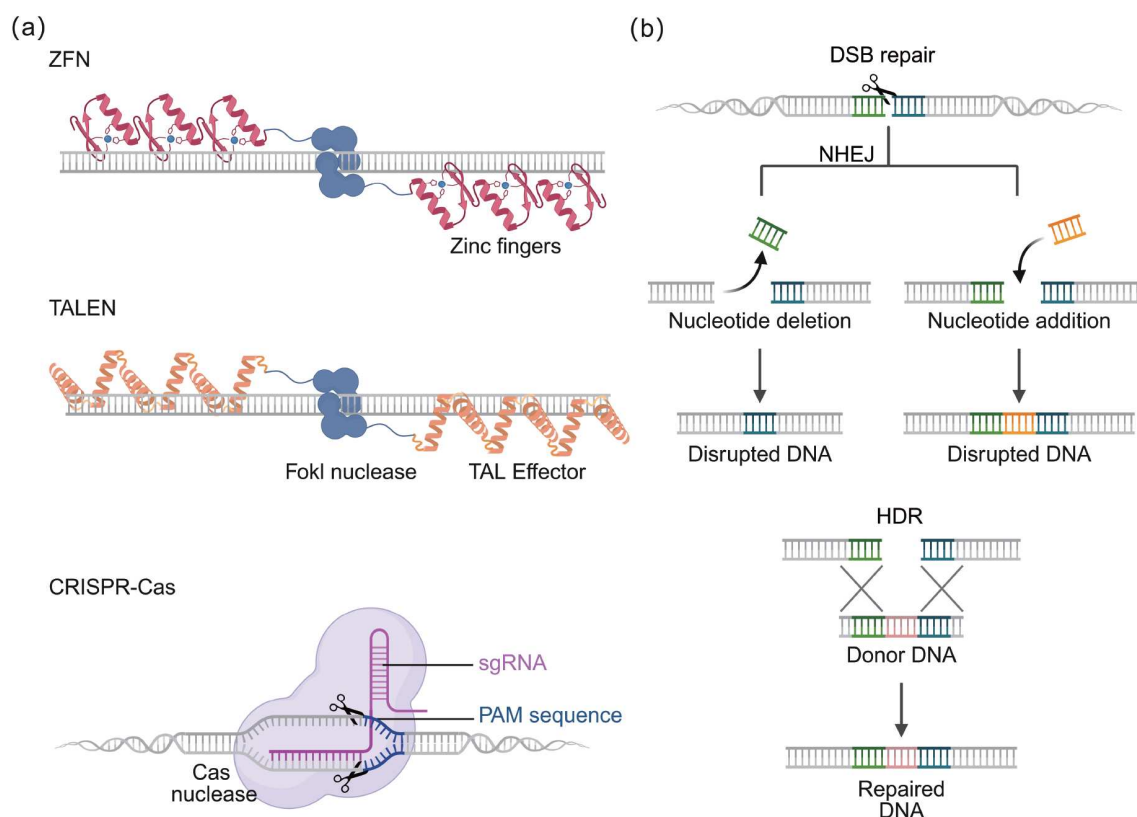


图 1 (网络版彩色)基因编辑示意图^[8]. (a) ZFN、TALEN和CRISPR-Cas编辑系统; (b) 非同源末端重组和同源末端重组修复机制
Figure 1 (Color online) Schematic diagram of gene editing^[8]. (a) ZFN, TALEN, and CRISPR-Cas editing systems; (b) non-homologous end-reorganization and homologous end-reorganization repair mechanisms

碱基进行编辑, 并且无需断裂DNA双链, 这两种编辑器都显著地增强了基因编辑的精确性和安全性^[10,11]. 与传统疗法相比, 基因编辑治疗具有其独特的优势, 它可以直接修复致病基因, 从而在根本上消除疾病, 并且疗效也非常持久, 从理论上讲, 对目的基因进行一次处理就可以获得终生的治愈效果. 此外, 基因编辑疗法还具有个性化的潜力, 通过对患者自身基因组的分析, 医生能够为每位患者量身定制治疗方案, 以实现更加安全高效的治疗^[12].

基因编辑药物的主要形式为核酸药物, 但由于核酸分子具有负电荷、高分子量及显著的亲水性, 这些特性限制了其穿透细胞膜的能力, 同时核酸药物的稳定性较差, 体内清除速度较快^[13]. 如何高效地将核酸药物递送至细胞内, 是目前基因治疗面临的挑战之一. 为此, 开发高效且稳定的递送载体对基因编辑药物的应用至关重要. 理想的递送载体不仅需要有效保护核酸药物免受体内酶的降解, 还应具备改善其生物相容性、提高细胞摄取效率和增强靶向性等多种功能^[14]. 近年

来, 纳米递送系统的研究逐渐成为基因编辑治疗领域的研究重点, 包括脂质纳米颗粒、脂质体、聚合物纳米颗粒和无机纳米颗粒等多种形式^[15]. 这些载体因其卓越的生物相容性及可调节的物理化学特性, 能够有效负载和递送核酸药物, 并实现特异性靶向. 本综述将系统探讨用于基因编辑的纳米递送系统, 分析各类纳米递送系统在基因编辑中的应用研究, 评估其在基因编辑药物递送中的特点, 通过讨论不同纳米递送系统的优势及其面临的挑战, 以期为纳米递送系统未来的发展提供更多的研究方向, 尤其是其在临床转化上的应用.

1 基因编辑系统

基因编辑技术不仅在基础研究中展现了巨大的应用潜力, 同时也在医学、农业等多个领域引发了革命性的变革. 早期的ZFN和TALEN技术因其操作复杂、成本较高以及可编辑靶点序列有限而受到限制, 需进一步优化以拓宽应用范围^[16]. 而CRISPR-Cas9编辑技

术的引入则彻底改变了这一现状，通过sgRNA与Cas9核酸酶的结合，实现了对特定基因的切割与编辑，过程更加简便且高效^[17]。CRISPR-Cas9技术的快速发展以及诸多新型基因编辑工具相继问世，为克服基因编辑领域所面临的各种挑战提供了全新的思路，极大地推动了基因治疗的发展(表1)。

1.1 CRISPR-Cas编辑系统

CRISPR-Cas系统是存在于原核生物中的一种防御机制，主要用于抵御噬菌体及外源遗传物质的侵袭^[18]。该系统主要由成簇的短回文重复序列(CRISPR)以及相关的Cas蛋白构成。在原核生物遭受外源序列的攻击时，CRISPR-Cas系统的适应模块会通过外源基因的PAM (protospacer adjacent motifs)序列确定其原间隔序列。随后，原间隔序列会被Cas蛋白切割并被整合进宿主的CRISPR序列，形成全新的间隔序列。该间隔序列能提供类似抗原的作用，在下次相同外源遗传物质进入时转录为CRISPR RNA (crRNA)，并引导Cas蛋白对其进行特异性切割。由于CRISPR-Cas系统是由crRNA引导的，因此通过改变crRNA的序列可实现对不同靶基因的切割，这为基因编辑技术的应用提供了全新的可能性。

化脓性链球菌来源的CRISPR-Cas9系统(SpCas9)

是首个用于人类基因编辑的CRISPR-Cas系统，同时也是当前应用最广泛的基因编辑工具^[19]。CRISPR-Cas9系统由两个部分组成：一部分是具备核酸内切酶功能的Cas9蛋白；另一部分则是具备导向功能的sgRNA(由crRNA和tracrRNA融合而成的单链RNA)。sgRNA可在指定的剪切位点进行互补配对，并引导Cas9蛋白对其进行切割，从而引发双链断裂(double-strand break, DSB)。在人体细胞内，这些DSB通过非同源末端重组(non-homologous end joining, NHEJ)进行修复，此过程常常会导致插入或缺失突变，从而沉默目标基因。如果在修复过程中引入一个含有所需改变的同源模板DNA，细胞就能利用同源重组(homologous recombination, HDR)机制，在目标基因上进行基因的插入或替换，从而实现更精准的基因编辑^[8](图1(b))。相比早期的一些基因编辑器，CRISPR-Cas9系统更为经济高效，通过设计不同的sgRNA，可实现对不同位点的靶基因进行切割，使其在临床上的应用范围显著扩大。目前已有多项基于CRISPR技术的基因编辑疗法进入临床试验阶段，如用于治疗ATTR淀粉样变性的NTLA-2001以及用于治疗遗传性血管水肿的NTLA-2002^[20,21]。然而，CRISPR-Cas9技术也面临一些挑战和局限性，主要包括存在脱靶效应、编辑效率需要优化，以及在细胞和组织中的递送困难等^[22]。

表 1 不同基因编辑系统的特点
Table 1 Characteristics of different gene editing systems

系统名称	核心机制	优势	挑战
归巢核酸内切酶	通过蛋白质直接识别并切割长DNA序列，依赖二聚体结构实现双链切割	早期基因编辑技术的代表，具有高特异性	设计复杂，需针对每个新靶点重新设计蛋白质，成本高，应用范围小
锌指核酸酶	锌指蛋白识别DNA序列，结合FokI核酸酶切割DNA双链	早期临床应用验证，特异性较高	设计依赖上下游序列，编辑位点少，细胞毒性大
转录激活因子样效应物核酸酶	TAL蛋白模块识别单碱基，结合FokI核酸酶切割DNA	设计比ZFN简单，特异性更高，成本更低	模块组装繁琐，大分子递送困难，具有细胞毒性
CRISPR-Cas编辑系统	RNA引导的DNA双链切割(gRNA与DNA配对)，依赖PAM序列(如NGG)	设计简单、成本低，编辑效率高，可多靶点编辑	PAM序列限制靶点选择，存在脱靶效应
碱基编辑器	无需DNA双链断裂，通过嘌呤或嘧啶脱氨酶实现单碱基修改(如C→T或A→G)	能够精准修复点突变，准确性和安全性更高	无法处理长片段基因编辑，存在旁观者编辑
先导编辑器	逆转录酶与Cas9结合，直接写入新序列	可插入、删除或替换长片段DNA，脱靶风险更低	pegRNA设计复杂，编辑效率较低
表观遗传编辑器	通过DNA甲基化或组蛋白修饰调控基因表达(如DNMT3A/dCas9融合蛋白)	不改变DNA序列，编辑具有持久性和可逆性，安全性高	编辑效率依赖细胞类型，长期安全性和免疫原性需验证
线粒体编辑器	基于添加MTS信号的ZFN或TALE骨架，与其他编辑器进行结合	突破线粒体基因编辑限制，高效精准	真正实现线粒体靶向递送仍具挑战，编辑窗口小

除了SpCas9系统,其他许多CRISPR-Cas系统也逐渐被探索和开发出来.例如,通过对SpCas9的HNH (hepatitis nuclease)和RuvC (recombination protein UvrC)结构域的突变,产生的突变型Cas9蛋白已经丧失了对DNA的剪切活性,但这种突变型Cas9 (dCas9)在与DNA序列结合后,能够抑制转录激活因子与靶序列的结合,从而实现基因的暂时沉默^[23].此外,dCas9可以与转录激活因子(如VP64、P65激活结构域)融合,以实现靶基因的转录激活.另一方面,各种Cas9的直接同源物也正在被研究作为基因编辑工具,例如金色葡萄糖菌Cas9 (SaCas9)和脑膜炎奈瑟菌Cas9 (Nme-Cas9)^[24,25].此外,其他DNA内切酶,如Cas12,和RNA内切酶,如Cas13,也在进行相关的研究^[26,27].

1.2 碱基编辑和先导编辑

碱基编辑和先导编辑都是新兴的基因编辑工具,与传统的CRISPR-Cas9系统相比,它们具有更高的准确性和更低的脱靶效应^[28].

碱基编辑器目前主要包括胞嘧啶碱基编辑器(cytosine base editor, CBE)和腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editor, ABE)^[29](图2(a), (b)).该技术通过对Cas9蛋白的催化核酸酶结构域进行突变,生成仅切割DNA链的缺口酶,随后引入胞嘧啶脱氨酶或腺嘌呤脱氨酶. Cas9蛋白能够与脱氨酶形成融合蛋白,然后在sgRNA的引导下,实现对DNA序列的精确定位.当融合蛋白靶向含有R-loop结构的单链DNA (ssDNA)时,胞嘧啶脱氨酶能够将该ssDNA上特定范围内的胞嘧啶转化为尿嘧啶,从而实现C-G碱基对向T-A的替换^[30];而腺嘌呤脱氨酶则将腺嘌呤转化为肌苷,带有肌苷的碱基在配对时会被识别为鸟嘌呤,从而将T-A碱基对替换为C-G^[31].需要注意的是,细胞内存在的尿嘧啶DNA糖基化酶会修复错配的尿嘧啶碱基,从而严重影响胞嘧啶碱基编辑器的体内编辑效率,一般需要额外加入尿嘧啶DNA糖基化酶抑制剂(uracil glycosylase inhibitor, UGI).碱基编辑器在不引起双链断裂的情况下,实现了对单一碱基的高精度替换,极大地提高了编辑的准确性和安全性.然而,由于其对ssDNA特定区域内的范围碱基进行编辑,仍然存在脱靶效应,尤其是在旁观者编辑(bystander editing)方面,其遗传毒性的潜在影响亦不可忽视^[32,33].

先导编辑器的开发旨在克服碱基编辑仅限于特定碱基对替换的局限性.该技术能够实现所有碱基的转

换,并具备碱基对的删除与插入功能^[11](图2(c)).先导编辑器由两部分组成:由Cas9-H840A切口酶(nCas9)与逆转录酶(reverse transcriptase, RT)形成的融合蛋白,以及引导序列pegRNA^[34].pegRNA是经过特殊改造的gRNA,除了引物结合位点外,还在3'末端添加了含有编辑序列的逆转录模板.借助pegRNA的引导,nCas9会在DNA的非互补链PAM上游第三个碱基处切割,生成ssDNA. ssDNA与pegRNA的引物序列结合,随后按照逆转录模板进行逆转录反应,将编辑序列整合至ssDNA中.其中未经编辑的5' ssDNA会被5'核酸内切酶或5'核酸外切酶切除,最终通过内源性基因错配修复机制实现基因编辑^[10].与碱基编辑相比,先导编辑展现出更低的脱靶效应和更广泛的应用前景^[35],然而其pegRNA序列较长且设计复杂,编辑效率仍需进一步优化^[36].

1.3 其他基因编辑系统

除了上述广泛研究的基因编辑系统外,许多其他基因编辑器也在不断被开发. Nuñez等人^[23]将dCas9和DNA甲基转移酶结合,发明了一种可编程表观遗传编辑器CRISPRoff,成功实现了高度特异性的DNA甲基化和基因抑制. Schubert等人^[37]将细菌中的逆转录子转化为RLR (retron library recombineering)基因编辑器,该系统能够同时生成数百万种突变,从而构建出规模远超CRISPR的筛选文库,以对数百万个序列进行筛选和分析. Xiang等人^[38]发现, Cas12核酸酶的祖先转座酶关联蛋白B (transposase-associated protein B, TnpB)同样展现出作为基因编辑工具的潜力,且其相较于CRISPR系统体积更小. Hu等人^[39]开发的CyDENT碱基编辑器(strand-preferred base editing system)是一种无CRISPR、具有链选择性及模块化特征的碱基编辑器,能够有效地对核基因组、线粒体基因组及叶绿体基因组进行碱基编辑.此外,线粒体编辑器也受到广泛关注,因为线粒体缺少sgRNA进入的途径,目前线粒体编辑器大多通过在ZFN或TALEN编辑器的骨架上引入基质导入序列(matrix-targeting sequence, MTS)来实现编辑器的线粒体定位,从而进行线粒体基因编辑^[40,41].例如,Shoop等人^[42]开发了特异性靶向和切割线粒体DNA的ARCUS核酸酶(mitoARCUS),并证明其能够精准切割m.3243A>G突变,从而提升线粒体蛋白的稳态水平和呼吸功能.这些基因编辑工具同样展现出巨大的治疗潜力,但要实现其治疗效能,必须安全、有效且精准地将其递送至目标病灶.

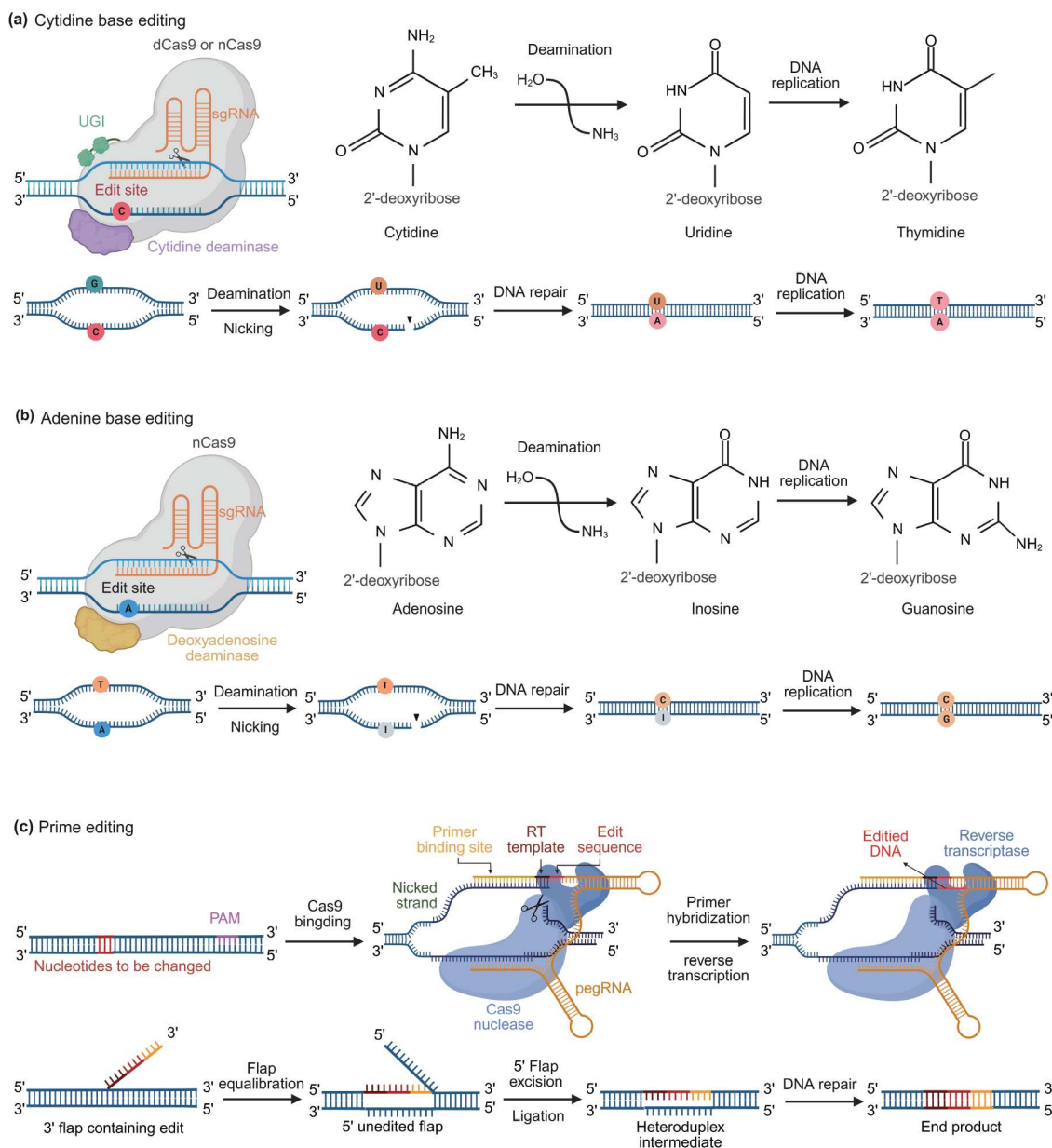


图2 (网络版彩色) 碱基编辑和先导编辑的机制。(a) 胞嘧啶编辑^[29]；(b) 腺嘌呤编辑^[29]；(c) 先导编辑^[11]

Figure 2 (Color online) The mechanism of base editing and prime editing. (a) Cytosine base editing^[29]；(b) adenine base editing^[29]；(c) prime editing^[11]

2 纳米递送系统

基因编辑器目前已经展现出巨大的治疗潜力，但它们一般都是大型核酸分子或蛋白分子，依赖自然扩散难以实现高效的胞内递送。同时，它们在体内很容易被免疫系统识别和清除，导致半衰期极短，从而影响基因编辑效率。此外，如果基因编辑器未能准确到达治疗靶点，则会引发脱靶效应，造成严重的基因毒性^[43]。目

前，基因编辑器的递送系统主要分为两类：病毒载体和非病毒载体。常见的病毒载体包括腺病毒、慢病毒和腺相关病毒。这些病毒载体凭借其天然的感染能力，能够高效将基因编辑工具递送至胞内，并将外源基因整合到宿主基因组中^[44]。然而，使用病毒载体也面临许多问题，如强免疫原性、基因整合引发的遗传毒性及高生产成本等。因此，研究人员逐渐转向非病毒载体，特别是纳米递送系统进行研究，以克服这些挑战^[45]。纳米

递送系统作为一种新兴的基因递送策略，具有多种优势，尤其是其可调节的物理化学特性，以及良好的生物相容性和低毒性，使得它们在疾病治疗中有非常大的应用潜力^[46,47](表2)。目前，脂质纳米颗粒、脂质体、聚合物纳米颗粒和无机纳米颗粒等纳米递送系统都已经被广泛应用于基因编辑器的递送，其中脂质纳米颗粒已成为目前研究最为成熟的纳米递送系统^[48]。

2.1 脂质纳米颗粒

脂质纳米颗粒(lipid nanoparticles, LNPs)是当前研究最为广泛的非病毒载体。首先，LNPs具有优异的生物相容性，通常由天然脂质或高生物相容性的合成脂质组成，这确保了它们在体内代谢及排泄过程中表现出良好的安全性及低毒性。其次，LNPs具备较高的递送效率，其脂质双层结构与纳米级的尺寸使其能够有效穿越细胞膜，从而将更多的核酸分子输送至细胞内^[49,50]。通过对LNP的脂质结构以及核酸药物进行进一步优化，基因编辑器在编辑效率和安全性方面进一步提高^[51,52]。传统的LNPs递送系统通常由四种关键成分构成：可电离脂质、磷脂、胆固醇和聚乙二醇化脂质^[53](图3)。每种组分通过不同的机制影响递送过程，从而为LNPs的应用提供了更多的可能性。通过调整脂

质的种类及其比例，可以调控LNPs的物理化学特性，从而优化其药物递送性能。例如，传统LNPs在静脉注射后，其表面会迅速吸附血浆中的载脂蛋白E，很容易在高度表达载脂蛋白受体的肝脏中蓄积^[54,55]。通过筛选获得具有肺部特异性的可电离脂质，有助于实现LNPs的肺部特异性靶向递送^[56]。此外，通过改变LNP的组分，例如去除胆固醇使LNPs变为三组分或者掺入硅氧烷使LNPs变为五组分，同样能改善LNPs的肺部靶向性^[57,58]；向LNPs中添加选择性器官靶向脂质(selective organ targeting lipid, SORT)作为第五种成分，亦可促进其在肝外的递送效果^[59]；调整LNPs组分的比例，例如聚乙二醇化脂质的比例，可以使其靶向眼部，从而实现基因治疗^[60]。这种多样性赋予LNPs在疫苗开发、基因治疗及靶向药物递送等领域展现出广阔的应用前景。

LNPs获得FDA批准用于RNA递送，表明其在基因药物传递方面具有显著潜力^[61]。LNPs所递送的基因编辑器的种类主要包括质粒DNA (plasmid DNA, pDNA)、mRNA及核糖核蛋白复合物(ribonucleoprotein, RNP)，每种形式各具优势和局限，因此需对LNPs的配方进行优化，以实现最佳的编辑效果^[62]。pDNA或mRNA形式的基因编辑器尺寸较大，通常会限制LNPs

表 2 不同纳米递送系统的特点

Table 2 Characteristics of different nanodelivery systems

纳米粒子类型	结构特点	优势	挑战	基因编辑器种类适配性
脂质纳米颗粒	由离子化脂质、辅助脂质、胆固醇和PEG脂质组成，形成稳定复合脂质结构	不同组分分配具有多样性的合成配方，可合理设计主动和被动靶向能力，高包封率，稳定性强，细胞内递送稳定，可大规模生产	储存条件严格，存在潜在免疫原性，器官靶向性有限	mRNA: 极高 质粒: 中等 RNP: 较低
脂质体	磷脂双层包裹水性核心，可装载亲水/疏水药物	生物相容性好，表面易修饰，可与其他递送系统相结合，毒性低	核酸包封效率低，易被网状内皮系统清除，储存稳定性差	mRNA: 较高 质粒: 中等 RNP: 较低
聚合物纳米颗粒	由天然或合成高分子(如PBAAE、PEI)形成，结构多样	药物负载能力高，单体可改造性强，表面功能化灵活，可与其他递送系统相结合	部分材料毒性高(如PEI)，体内代谢复杂，降解速度快	mRNA: 中等 质粒: 较高 RNP: 中等
无机纳米颗粒	金属(金)或氧化物(二氧化硅)材料，具有独特物理性质(磁性、光学)	高稳定性，多功能性(成像/治疗协同)，表面易修饰	生物降解性差，存在长期毒性隐患，制备工艺复杂，核酸负载效率低	mRNA: 较低 质粒: 中等 RNP: 中等
外泌体	天然来源的纳米囊泡，能够携带天然膜蛋白和核酸	低免疫原性，可穿透生物屏障(血脑屏障)，具有天然靶向性(膜蛋白介导)	分离纯化困难，载药量低，规模化生产难	mRNA: 较高 质粒: 中等 RNP: 较高
金属有机框架	金属离子与有机配体自组装的晶体材料，高孔隙率负载核酸	超高负载能力，可控释放(pH/酶响应)，多功能表面修饰	材料复杂，毒性和降解性具有不确定	mRNA: 中等 质粒: 中等 RNP: 中等
胶束	两亲性聚合物自组装形成疏水核-亲水壳结构，负载疏水药物或修饰后结合核酸	小尺寸易渗透肿瘤，循环时间长(PEG化)，低毒性	核酸负载性能差，稳定性差(易解离)	mRNA: 较低 质粒: 中等 RNP: 中等

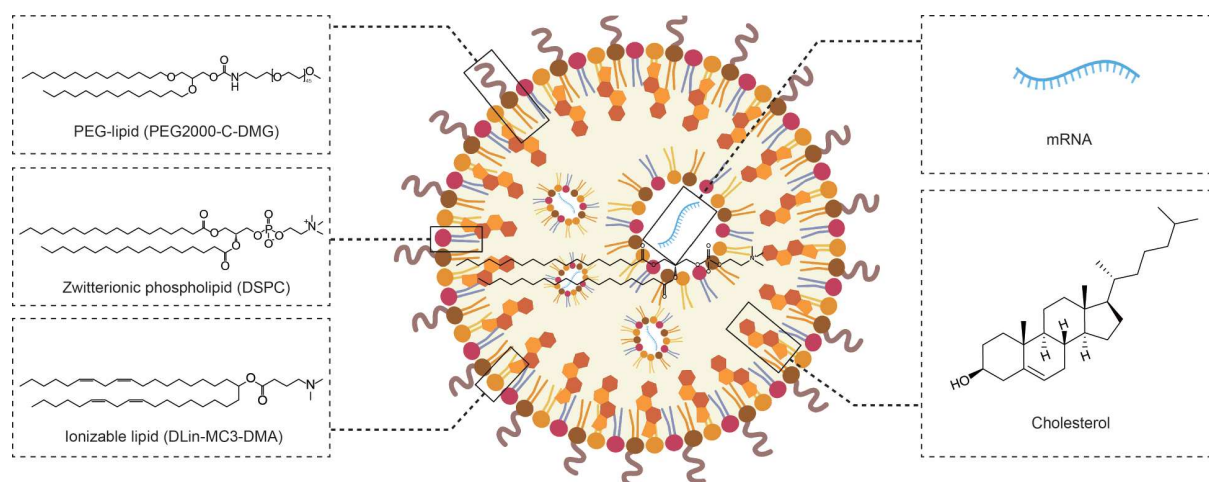


图3 (网络版彩色)美国食品和药物管理局批准的由四种简单的脂质成分组成的LNP^[53]

Figure 3 (Color online) Food and Drug Administration (FDA)-approved LNPs consist of four simple lipid components^[53]

的递送效率, 因此通过对大量LNPs配方进行筛选以获得高递送效率的基因编辑器已成为当前研究的常用策略. Kieu等人^[63]构建并筛选了一个包含16种新型可电离脂质的库, 最终获得了一种通用的可电离脂质Lipid 10, 该脂质在mRNA肝脏递送中展现出优异的效率, 并在血凝素小鼠疫苗模型中诱导了显著的抗体滴度. Kim等人^[64]通过筛选数百个LNPs配方, 确定LNP496和LNP470能够高效地将Cas13a-gRNA质粒递送至大肠杆菌, 成功实现了对细菌感染模型的治疗. Zhu等人^[65]通过对辅助脂质类型和脂质成分比例进行筛选, 实现了肿瘤抗原编码mRNA到树突状细胞的高效递送, 在小鼠体内表现出强烈的免疫反应以及抗肿瘤活性. 虽然某些具有特殊物理化学特性的LNPs在基因编辑器的递送方面表现出优异的效率, 但从大量候选分子中进行筛选的工作量往往是巨大的, 通过使用高通量筛选方法可大幅加速高效能递送载体的开发. Sago等人^[66]同时递送Cre mRNA和Barcode到转基因小鼠体内, 通过分析Cre酶在不同编辑部位的Barcode富集程度实现LNPs的高通量筛选. 在此基础上, Rhym等人^[67]和Xue等人^[68]通过肽编码的条形码技术以及DNA条形码技术同样实现了LNPs的高通量筛选, 实现了小鼠体内基因编辑递送载体的高效和靶向筛选. 直接递送RNP进行基因编辑被认为能提高编辑效率并减少脱靶效应^[69], 但RNP递送的复杂性, 如基因编辑蛋白的较大尺寸和在LNP制备过程中RNP可能发生变性, 均是亟待克服的挑战. Tao等人^[70]利用LNPs递送CRISPR-Cas9 RNP, 对听力损失的突变小鼠进行特异性基因编辑, 成功促

进了外毛细胞的存活并恢复了听力功能, 然而基因编辑的效率仍显不足. Holubowicz等人^[71]通过优化封装碱基编辑和先导编辑的LNPs, 筛选出合适的可电离阳离子脂质, 并调整聚乙二醇化脂质的比例, 使得体内的基因编辑效率提升超过300倍(与裸RNP递送相比), 同时显著降低了脱靶编辑的发生. 大多数递送基因编辑器的LNPs在注入血液循环后会被肝脏吸收, 从而限制了其他器官的基因治疗效果. 通过针对LNPs进行特定的改造, 以改变其物理化学性质, 可以实现对肝外器官的靶向递送. Wei等人^[72]通过工程化改造LNPs, 调整DOTAP的比例, 开发出树枝状聚合物脂质纳米颗粒、稳定核酸脂质颗粒和类脂质纳米颗粒, 实现了在小鼠肌肉、肝脏和肺组织中对RNP的靶向递送. 此外, 通过改变给药方式也能有效实现肝外递送. Elia等人^[73]采用雾化方式将LNPs通过呼吸道给药, 成功将CRISPR-RNP送达小鼠肺部, 实现基因编辑. 另外, 特殊策略抑制肝脏内Cas9活性也为肝外基因编辑提供了可能. Sago等人^[74]在递送Cas9 mRNA和sgRNA之前, 首先将降解Cas9的siRNA递送至肝脏, 从而成功降低了肝细胞中基因编辑的比例, 实现了小鼠肺和脾脏的基因编辑.

总而言之, LNPs在递送基因编辑器方面展现出了广阔的应用前景. 目前, LNPs面临的挑战主要有两个: 一是解决LNPs的内体逃逸问题以提高其递送效率, 二是实现LNPs的肝外靶向递送. 实际上, LNPs的各个成分对其递送性能都发挥着重要作用, 这也代表了它能够在很多方面有进一步优化的可能, 在靶向递送方面仍然有相当大的潜力待挖掘. 而在未来, 采用高通量筛

选方法来快速筛选具有优异递送性能的LNPs载体将成为一种发展趋势, 如何改进现有的高通量筛选方法也是目前的重要研究方向之一。此外, 通过对LNPs进行化学修饰或添加功能化成分, 能够改变其靶向特性, 从而实现肝外器官组织的靶向递送。例如, 许多生物分子在人体各个器官及组织中存在丰富的受体, 将这些受体的配体分子或其类似物整合进LNPs递送系统, 可能会进一步拓宽LNPs靶向递送的范围。相信随着研究人员对LNPs的开发, 会有越来越多的疾病得到治疗。

2.2 脂质体

脂质体(liposomes)是一种由脂质双层构成的小型囊泡, 通常由具有极性头基和非极性尾基的磷脂以及稳定剂(如胆固醇)组成, 通过其两亲性的特性组装成囊泡^[75,76](图4)。相较于复合脂质基质的LNPs, 脂质体具有明确的双层囊泡结构, 并且需要通过超声处理、挤

出法等外力制备形成。其内部水核心能够有效包裹并保护水溶性药物, 延长其在血液中的循环时间, 脂质体进入细胞后通过膜融合、渗透作用或降解释放药物。这一结构特征使脂质体在药物递送领域受到广泛关注, 尤其是在治疗性核酸和基因编辑药物的应用中, 它能够有效保护基因编辑工具免受体内酶的降解^[77]。尽管具有诸多优势, 脂质体的应用也面临一些挑战。除了生产成本较高和储存稳定性不足外, 脂质体还需要进一步优化来获得高递送效率以及组织特异性靶向能力^[78]。

目前, 脂质体的优化策略多种多样。例如, 通过改善其粒径、表面电荷等物理化学特性, 可以显著提升细胞的摄取效率。此外, 脂质体表面可通过聚合物或其他生物分子的修饰, 进一步增强其靶向性和特异性, 这在基因编辑药物的递送中至关重要^[79,80]。Liang等人^[81]筛选了针对骨肉瘤细胞的特异性适体, 获得了LC09, 并将其与脂质体结合, 以递送CRISPR-Cas9质粒, 成功促

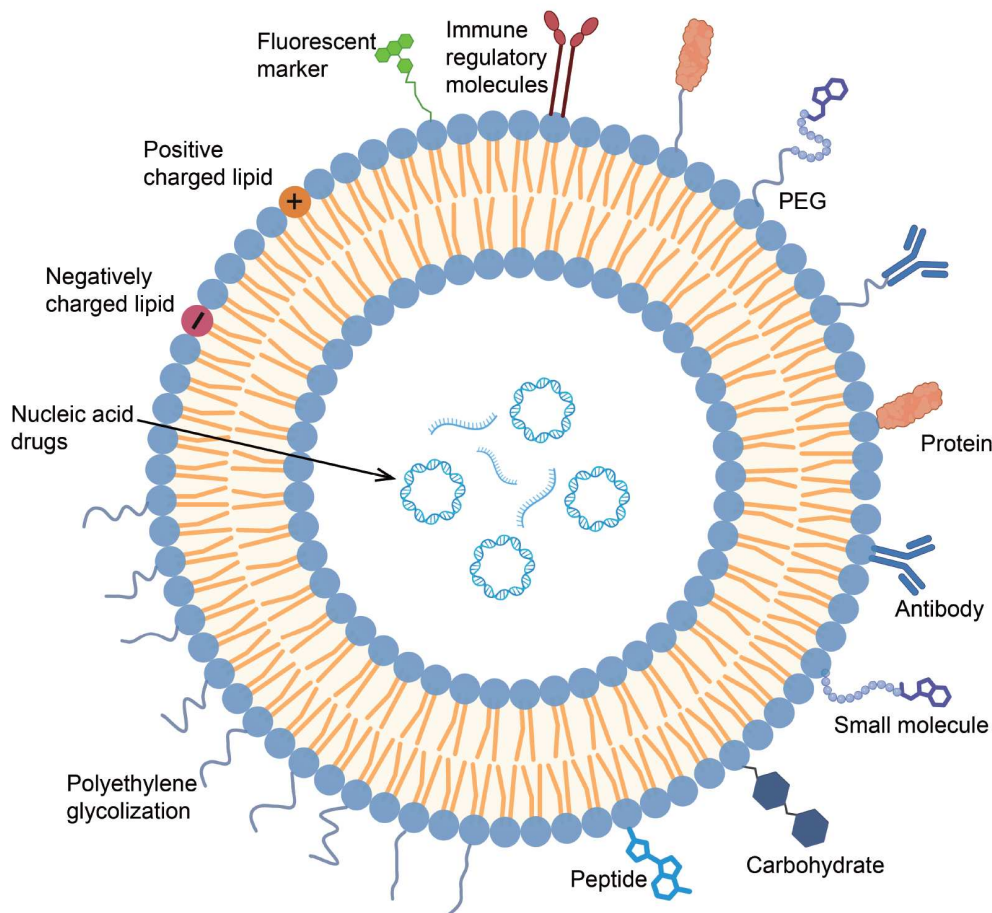


图 4 (网络版彩色) 不同类型脂质体给药系统的示意图^[76]

Figure 4 (Color online) Schematic representation of different types of liposomal drug delivery systems^[76]

进了CRISPR-Cas9在原位骨肉瘤中的靶向递送,从而抑制了肿瘤的恶性生长及肺转移,并减少了血管生成和骨转移。Zhao等人^[82]在脂质体外膜上引入了活性氧(reactive oxygen species, ROS)响应型“锁”结构,开发出一种聚合物锁定融合脂质体。该融合脂质体利用膜融合特性有效穿越血脑屏障(blood-brain barrier, BBB),并在高ROS水平的脑胶质瘤组织中打开“锁”结构,释放药物,成功抑制脑胶质瘤的生长,提高了基因编辑疗法的安全性。除了对脂质体进行修饰,将其与其他递送载体(如外泌体或水凝胶)融合也是提升递送效率和靶向性的一种有效方式。Lin等人^[83]制备了一种基于脂质体与外泌体的复合纳米粒,可有效封装大尺寸质粒,并实现了CRISPR-Cas9系统在间充质干细胞中递送。Chen等人^[84]制备了一种基于脂质体与水凝胶的水凝胶纳米颗粒,内部的水凝胶结构用于封装Cas9-RNP,而外部脂质体结构则用于体内递送。该纳米颗粒成功实现了蛋白形式的Cas9向脑肿瘤的靶向递送,并表现出较好的肿瘤抑制效果。

综上所述,脂质体作为基因编辑药物的递送系统表现出很大的应用潜力。目前的问题主要在于其存在的生产成本高和稳定性不足问题,未来的研究应该更侧重于优化脂质体的设计和制备工艺,以提升其在临床中的应用前景。此外,通过研究脂质体与细胞之间相互作用的机制,可以制定更有效的递送策略,进一步增强其靶向性能和递送效率,这也是脂质体研究的重要方向之一。随着对脂质体的持续开发,其在基因治疗及其他生物药物递送领域中所发挥的作用也会日益增强。

2.3 聚合物纳米颗粒

聚合物纳米颗粒(polymeric nanoparticles)通常由高分子聚合物构成,这些聚合物可以是天然来源或合成的,常见的有聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)、聚(β-氨基酯)(poly(beta-amino ester), PBAE)、聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA)以及聚乳酸(poly(lactic acid, PLA)等。在递送核酸药物的应用中,所选用的聚合物多为阳离子类型,这类聚合物通过其正电荷与带负电荷的核酸发生静电相互作用,从而将核酸药物包裹形成纳米颗粒^[85]。此外,聚合物纳米粒子的结构特征主要体现在其链段结构及其排列方式,通过调整链长和交联密度,可以满足药物递送的特定需求^[86]。进一步地,对聚合物纳米粒子表面进行功能化修饰,能够显著增强其对特定细胞或组织的亲和力^[87,88]。目前,PEI聚合

物和PBAE聚合物是用于核酸递送研究中最广泛的聚合物材料。

PEI因其优良的生物相容性及出色的基因转染能力而备受关注。PEI一般通过内吞作用进入细胞,通过增大PEI的分子量可以提高其转染效率,但细胞毒性也会随之升高^[89]。通过对PEI的分子量与结构进行优化,可以在一定程度上实现转染效率与细胞毒性之间的平衡^[90]。通过引入不同的功能基因或与其他载体结合,可以有效提高其基因递送效率,并降低对细胞的毒性影响^[91]。例如,对PEI表面进行聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)修饰能够显著改善其递送效率^[92]。Li等人^[93]将PEI与生物可降解的PEG-b-聚碳酸酯嵌段共聚物结合形成阳离子胶束纳米粒子,成功降低了其毒性,并通过PEI的质子海绵效应提高了转染效率,成功递送Cas9并在HeLa肿瘤异种移植小鼠模型中实现了肿瘤抑制。然而,PEI的细胞毒性始终是其临床应用面临的重大挑战,这促使研究者探索更安全有效的递送材料与PEI复合,或采用更具创新性的递送策略,如响应型递送策略,以减少正常细胞对PEI的摄取,从而降低毒性并提高靶向性。

PBAE通常通过胺单体和丙烯酸酯的共聚反应合成,其可控的分子量和结构赋予了其在基因编辑器递送中巨大的应用潜力。通过调节胺单体和丙烯酸酯的组合,可以构建丰富的PBAE分子库,可以从中筛选出具备高递送效率的PBAE载体。Elana等人^[94]通过对亲脂PBAE分子库进行筛选,发现亲油亚基对DC细胞的高效转染至关重要。Rotolo等人^[95]构建了一个包含166种PBAE的分子库,并从中筛选出一种聚-β-氨基-硫代酯聚合物P76,该载体在多种生物体中展现出优异的递送效率,并通过雾化给药有效传递Cas13a,从而有效防止了仓鼠SARS-CoV-2感染模型的体重下降。此外,通过将PBAE与其他载体结合,可进一步实现精准的靶向递送。Yan等人^[96]在PBAE/质粒纳米复合物表面包覆一层锚定刺激反应性前体分子的仿生细胞膜,在活性氧环境的刺激下,仿生细胞膜释放所包裹的CRISPR-Cas9药物,成功实现了对炎症性肠病的精准治疗。基于对PBAE材料递送效率的筛选,合理的表面修饰可进一步提高其靶向能力。Chen等人^[97]筛选出了一种具有高效转染能力的PBAE29,该材料具备四臂分支拓扑结构,并能在体内降解生成具有抑炎效果的双酚A二缩水甘油醚从而抑制转染过程中巨噬细胞的炎症反应。其表面还修饰了羧化甘露聚糖涂层,使其能够精确靶向

巨噬细胞表面的甘露糖受体,成功将CasRx (CRISPR-associated ribonuclease Cas13d)质粒递送至小鼠巨噬细胞,实现免疫抑制微环境的逆转。

PBAE目前仍然拥有巨大的开发空间。通过改变单体的结构和聚合条件,可以直接优化其药物递送性能。同时,PBAE的可结合特性也为更多递送策略提供了可能性。然而,PBAE在临床应用中面临一些挑战。尤其是其降解速度过快,快速降解会导致药物过快释放,从而降低递送效能和靶向能力。这不仅会影响其治疗效果,还会增加其储存成本。因此,如何精确控制PBAE的降解速率,以提升其稳定性和控制药物的精确释放,会是未来PBAE的重要研究方向。

2.4 无机纳米颗粒

用于递送核酸药物的无机纳米颗粒(inorganic nanoparticles)主要包括金纳米颗粒、二氧化硅纳米颗粒。金纳米颗粒以其独有的光学特性、优异的生物相容性和易于功能化的特征,在核酸传递领域展示了广阔的应用前景。Lee等人^[98]使用金纳米颗粒封装CRISPR-Cas9 RNP,形成CRISPR-Gold,通过颅内注射CRISPR-Gold,可在多种小鼠模型中实现脑部基因的高效编辑。Chen等人^[99]采用了高长宽比的阳离子聚合物涂覆金纳米棒传递CRISPR-Cas9质粒,成功地在体内靶向Fas基因并保护小鼠免于肝纤维化。金纳米颗粒的光学特性可进一步拓展至联合治疗领域。Tang等人^[100]以超分子阳离子金纳米棒作为载体递送CRISPR-Cas9,该载体在靶向程序性死亡配体1 (programmed cell death ligand 1, PD-L1)的同时接收近红外光并转化为温和的热疗以诱导ICD和Cas9的基因表达,实现双重免疫疗法的效果。此外,通过对金纳米颗粒表面进行修饰,能进一步提升其传递效率及靶向能力。例如,Zhang等人^[101]将阳离子HIV-1反式激活转录子肽与金纳米簇络合,并进一步封装在半乳糖修饰的脂质层中,成功将CRISPR-Cas9系统靶向递送到肝脏,并对Pcsk9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9)进行编辑,使小鼠血液中的低密度脂蛋白含量降低。

二氧化硅纳米颗粒同样因其优异的生物相容性和可调性而备受关注。此外,其具备独特的多孔结构,能够更有效地负载核酸药物。通过调节孔径大小,可以满足不同的递送需求。一般而言,较大的孔径能够承载更多的核酸药物。例如, Lee等人^[102]合成了超大孔径的二氧化硅纳米仓库,成功封装了大量CRISPR-Cas9核糖核

蛋白复合物,递送后显著抑制了肝癌细胞的增殖。此外,二氧化硅颗粒对核酸药物的高负载能力使其可以与其他递送载体有效结合,从而实现对疾病部位的精准调控。Noureddine等人^[103]将脂质包裹在二氧化硅纳米颗粒的表面,成功地将CRISPR质粒和RNP递送至癌细胞内进行基因编辑。通过设计响应型的递送机制来实现载体的靶向递送也是目前研究的重点。Wang等人^[104]开发出一种谷胱甘肽响应性二氧化硅纳米胶囊,能够通过全身给药突破血脑屏障,实现脑部靶向递送,并成功向Ai14报告小鼠递送CRISPR编辑器以实现基因编辑。

金纳米颗粒与二氧化硅颗粒所面临的挑战基本一致,作为无机纳米颗粒,它们的代谢极为困难,容易在体内积累,从而可能导致长期的潜在影响。此外,这些颗粒也容易被免疫系统识别并吞噬,因此在实际应用中常常需要采用保护性涂层进行包裹。未来的研究应综合考虑它们的物理化学特性、生物降解性等多方面因素,特别是要评估这些纳米颗粒在体内的长期影响,深入探讨其潜在的毒性机制,以确保其在临床应用中的安全性^[105]。

2.5 其他纳米递送系统

除了上述广泛研究的纳米递送系统外,还有许多其他新兴的纳米递送系统被成功运用到递送基因编辑器中。Han等人^[106]将DNA甲基转移酶和dCas9 RNP通过光切割蛋白共轭的外泌体膜标志物进行融合,将其加载到外泌体中,通过蓝光照射释放基因编辑器,实现了小鼠大脑的靶向表观基因组编辑。Zhang等人^[107]通过金属配位将Cas9 RNP整合到包含叶绿素的纳米胶束上,在激光的照射下,叶绿素产生ROS,并和切割氧化防御系统的Cas9 RNP一起作用,成功抑制了小鼠肿瘤生长。Alyami等人^[108]开发了一种仿生癌细胞包被的沸石咪唑酯框架用于递送Cas9 RNP,并在小鼠体内证实了对肿瘤细胞的靶向递送编辑。这些新兴的纳米递送系统同样展现了在基因编辑领域的巨大潜力。未来的研究可以进一步探讨这些纳米递送系统与其他治疗手段的联用效果,通过结合不同纳米递送系统的特点,有望进一步提高基因编辑效率以及药物递送的准确性,同时,还能优化纳米载体的生物相容性和生物降解性以提高安全性,从而增强基因编辑疗法的临床应用前景。

3 总结与展望

随着纳米技术的持续发展,各类纳米材料,包括脂

质纳米颗粒、脂质体、聚合物纳米颗粒及无机纳米颗粒等,已被广泛用于基因编辑药物递送系统的研究。尽管这些材料的特性各有差异,但它们在基因编辑工具的递送方面展现出一些共同的优势,如高生物相容性、可调节的物理化学性质以及易于功能化的特性。这些特性凸显了纳米递送系统在教育领域的巨大潜力与前景。虽然目前相关的研究已取得了诸多进展,但在实际应用中,这些系统仍面临若干挑战,从而影响其向临床应用的转化。

首先,纳米递送系统的临床转化成本不可忽视。临床应用要求纳米递送系统具备规模化生产的能力,而目前大多数“多功能”纳米递送系统结构复杂,这不仅导致制作成本上升,同时也使其在体内的行为更加复杂,从而增加了临床转化的难度。因此,研究者必须在纳米递送系统的简化与高性能之间寻求平衡^[109]。其次,肝外递送的挑战依然存在。目前基于纳米递送载体的核酸疗法在临床上的成功主要集中于肝脏靶向或局部给药,急需提升纳米递送系统在肝外组织靶向方面的策略。当然,科研领域已开展了多项相关研究,许多针对非肝脏组织的纳米递送策略也取得了显著进展。随

着研究的深入,纳米递送系统在靶向递送及个性化医疗方面有望实现重大突破。最后,纳米递送系统缺乏标准化的评估方法。目前,现有的评价体系过度依赖递送效率和靶向性能指标。然而,作为基因药物的递送载体,其生产与安全性方面需遵循更为严格的标准。纳米粒子因其独特的理化化学性质,需要对其均一性进行评估,但目前的粒径表征和包封率测量尚难以满足这一要求。此外,纳米递送系统在体内的安全性及持久性同样需建立评价标准,包括载体在体内的代谢过程、可能引发的局部或全身毒性,以及作为基因编辑药物最为关键的遗传毒性。这些都是纳米递送系统作为基因药物递送载体进行临床转化面临的挑战。

纳米递送载体对基因编辑疗法的发展有着不可忽视的巨大贡献,它们极大地推动了人类科学的发展。如果能够有效应对当前临床转化所面临的挑战,可以预见,纳米递送系统将在基因治疗和个性化医疗等领域扮演愈加重要的角色。这将使未来的基因编辑药物朝着更加智能化和个性化的方向发展,从而实现对每位患者特定病症的精准治疗,为人类健康带来无限的希望。

参考文献

- Petes T D, Detloff P, Jinks-Robertson S, et al. Recombination in yeast and the recombinant DNA technology. *Genome*, 1989, 31: 536–540
- Jacquier A, Dujon B. An intron-encoded protein is active in a gene conversion process that spreads an intron into a mitochondrial gene. *Cell*, 1985, 41: 383–394
- Gimble F S, Thorner J. Homing of a DNA endonuclease gene by meiotic gene conversion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 1992, 357: 301–306
- Bibikova M, Beumer K, Trautman J K, et al. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science*, 2003, 300: 764
- Hockemeyer D, Wang H, Kiani S, et al. Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nat Biotechnol*, 2011, 29: 731–734
- Jinek M, East A, Cheng A, et al. RNA-programmed genome editing in human cells. *eLife*, 2013, 2: e00471
- Fineran P C, Charpentier E. Memory of viral infections by CRISPR-Cas adaptive immune systems: acquisition of new information. *Virology*, 2012, 434: 202–209
- Yin H, Kauffman K J, Anderson D G. Delivery technologies for genome editing. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16: 387–399
- Klermund J, Rhiel M, Kocher T, et al. On- and off-target effects of paired CRISPR-Cas nickase in primary human cells. *Mol Ther*, 2024, 32: 1298–1310
- Komor A C, Kim Y B, Packer M S, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 2016, 533: 420–424
- Anzalone A V, Randolph P B, Davis J R, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, 2019, 576: 149–157
- Lu H, Zhang Q, He S, et al. Reduction-sensitive fluorinated-Pt(IV) universal transfection nanoplateform facilitating CT45-targeted CRISPR/dCas9 activation for synergistic and individualized treatment of ovarian cancer. *Small*, 2021, 17: e2102494
- Miao Y, Fu C, Yu Z, et al. Current status and trends in small nucleic acid drug development: leading the future. *Acta Pharm Sin B*, 2024, 14: 3802–3817
- Mendes B B, Connot J, Avital A, et al. Nanodelivery of nucleic acids. *Nat Rev Methods Primers*, 2022, 2: 24
- Patra J K, Das G, Fraceto L F, et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *J Nanobiotechnol*, 2018, 16: 71

- 16 Katayama S, Watanabe M, Kato Y, et al. Engineering of zinc finger nucleases through structural modeling improves genome editing efficiency in cells. *Adv Sci*, 2024, 11: e2310255
- 17 Abraham A A, Tisdale J F. Gene therapy for sickle cell disease: moving from the bench to the bedside. *Blood*, 2021, 138: 932–941
- 18 Makarova K S, Haft D H, Barrangou R, et al. Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9: 467–477
- 19 Hsu P D, Scott D A, Weinstein J A, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 827–832
- 20 Kotit S. Lessons from the first-in-human *in vivo* CRISPR/Cas9 editing of the TTR gene by NTLA-2001 trial in patients with transthyretin amyloidosis with cardiomyopathy. *Glob Cardiol Sci Pract*, 2023, 2023: e202304
- 21 *In vivo* CRISPR agent cuts HAE attacks 95. *Nat Biotechnol*, 2024, 42: 352
- 22 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: 184–191
- 23 Nuñez J K, Chen J, Pommier G C, et al. Genome-wide programmable transcriptional memory by CRISPR-based epigenome editing. *Cell*, 2021, 184: 2503–2519.e17
- 24 Ran F A, Cong L, Yan W X, et al. *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*, 2015, 520: 186–191
- 25 Li X, Liao F, Gao J, et al. Inhibitory mechanism of CRISPR–Cas9 by AcrIIC4. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51: 9442–9451
- 26 Yan W X, Hunnewell P, Alfonse L E, et al. Functionally diverse type V CRISPR–Cas systems. *Science*, 2019, 363: 88–91
- 27 Abudayyeh O O, Gootenberg J S, Essletzbichler P, et al. RNA targeting with CRISPR–Cas13. *Nature*, 2017, 550: 280–284
- 28 Anzalone A V, Koblan L W, Liu D R. Genome editing with CRISPR–Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nat Biotechnol*, 2020, 38: 824–844
- 29 Wang S W, Gao C, Zheng Y M, et al. Current applications and future perspective of CRISPR/Cas9 gene editing in cancer. *Mol Cancer*, 2022, 21: 57
- 30 Thuronyi B W, Koblan L W, Levy J M, et al. Continuous evolution of base editors with expanded target compatibility and improved activity. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 1070–1079
- 31 Huang J, Lin Q, Fei H, et al. Discovery of deaminase functions by structure-based protein clustering. *Cell*, 2023, 186: 3182–3195.e14
- 32 Yan N, Feng H, Sun Y, et al. Cytosine base editors induce off-target mutations and adverse phenotypic effects in transgenic mice. *Nat Commun*, 2023, 14: 1784
- 33 Fiumara M, Ferrari S, Omer-Javed A, et al. Genotoxic effects of base and prime editing in human hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol*, 2024, 42: 877–891
- 34 Nelson J W, Randolph P B, Shen S P, et al. Engineered pegRNAs improve prime editing efficiency. *Nat Biotechnol*, 2022, 40: 402–410
- 35 Tao J, Bauer D E, Chiarle R. Assessing and advancing the safety of CRISPR–Cas tools: from DNA to RNA editing. *Nat Commun*, 2023, 14: 212
- 36 Kim H K, Yu G, Park J, et al. Predicting the efficiency of prime editing guide RNAs in human cells. *Nat Biotechnol*, 2021, 39: 198–206
- 37 Schubert M G, Goodman D B, Wannier T M, et al. High-throughput functional variant screens via *in vivo* production of single-stranded DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118: e2018181118
- 38 Xiang G, Li Y, Sun J, et al. Evolutionary mining and functional characterization of TnpB nucleases identify efficient miniature genome editors. *Nat Biotechnol*, 2024, 42: 745–757
- 39 Hu J, Sun Y, Li B, et al. Strand-preferred base editing of organellar and nuclear genomes using CyDENT. *Nat Biotechnol*, 2024, 42: 936–945
- 40 Yi Z, Zhang X, Tang W, et al. Strand-selective base editing of human mitochondrial DNA using mitoBEs. *Nat Biotechnol*, 2024, 42: 498–509
- 41 Fu Y, Land M, Kavlashvili T, et al. Engineering mtDNA deletions by reconstituting end joining in human mitochondria. *Cell*, 2025, 188: 2778–2793.e21
- 42 Shoop W K, Lape J, Trum M, et al. Efficient elimination of MELAS-associated m.3243G mutant mitochondrial DNA by an engineered mitoARCUS nuclease. *Nat Metab*, 2023, 5: 2169–2183
- 43 Madigan V, Zhang F, Dahlman J E. Drug delivery systems for CRISPR-based genome editors. *Nat Rev Drug Discov*, 2023, 22: 875–894
- 44 Raguram A, Banskota S, Liu D R. Therapeutic *in vivo* delivery of gene editing agents. *Cell*, 2022, 185: 2806–2827
- 45 Herrera-Barrera M, Ryals R C, Gautam M, et al. Peptide-guided lipid nanoparticles deliver mRNA to the neural retina of rodents and nonhuman primates. *Sci Adv*, 2023, 9: eadd4623
- 46 Xu Y, Ren X, Yu M, et al. Nanotechnology-based drug delivery strategies for cancer therapy (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 2023, 68: 4346–4372 [徐寅生, 任翔宇, 余梦真, 等. 基于纳米技术的药物递送策略及其在癌症治疗中的应用. 科学通报, 2023, 68: 4346–4372]
- 47 Zhang S, Yang H, Zhao Y, et al. Research progress on the nanodrug mediated regulation of tumor fibroblast-like cells for tumor therapy (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 2023, 68: 4373–4382 [张淑慧, 阳卉茹, 赵颖, 等. 基于纳米药物调控肿瘤成纤维样细胞用于肿瘤治疗的研究进展. 科学通报, 2023, 68: 4373–4382]
- 48 Masarwy R, Stotsky-Oterin L, Elisha A, et al. Delivery of nucleic acid based genome editing platforms via lipid nanoparticles: clinical applications. *Adv Drug Deliver Rev*, 2024, 211: 115359

- 49 Sabnis S, Kumarasinghe E S, Salerno T, et al. A novel amino lipid series for mRNA delivery: improved endosomal escape and sustained pharmacology and safety in non-human primates. *Mol Ther*, 2018, 26: 1509–1519
- 50 Miller J B, Zhang S, 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. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56: 1059–1063
- 51 Finn J D, Smith A R, Patel M C, et al. A single administration of CRISPR/Cas9 lipid nanoparticles achieves robust and persistent *in vivo* genome editing. *Cell Rep*, 2018, 22: 2227–2235
- 52 Liu J, Chang J, Jiang Y, et al. Fast and efficient CRISPR/Cas9 genome editing *in vivo* enabled by bio-reducible lipid and messenger RNA nanoparticles. *Adv Mater*, 2019, 31: e1902575
- 53 Naidu G S, Yong S, Ramishetti S, et al. A combinatorial library of lipid nanoparticles for cell type-specific mRNA delivery. *Adv Sci*, 2023, 10: e2301929
- 54 Paunovska K, Gil C J, Lokugamage M P, et al. Analyzing 2000 *in vivo* drug delivery data points reveals cholesterol structure impacts nanoparticle delivery. *ACS Nano*, 2018, 12: 8341–8349
- 55 Tang H, Zhang Y, Yang T, et al. Cholesterol modulates the physiological response to nanoparticles by changing the composition of protein corona. *Nat Nanotechnol*, 2023, 18: 1067–1077
- 56 Qiu M, Tang Y, Chen J, et al. Lung-selective mRNA delivery of synthetic lipid nanoparticles for the treatment of pulmonary lymphangioleiomyomatosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, 119: e2116271119
- 57 Su K, Shi L, Sheng T, et al. Reformulating lipid nanoparticles for organ-targeted mRNA accumulation and translation. *Nat Commun*, 2024, 15: 5659
- 58 Xue L, Zhao G, Gong N, et al. Combinatorial design of siloxane-incorporated lipid nanoparticles augments intracellular processing for tissue-specific mRNA therapeutic delivery. *Nat Nanotechnol*, 2025, 20: 132–143
- 59 Cheng Q, Wei T, Farbiak L, et al. Selective organ targeting (SORT) nanoparticles for tissue-specific mRNA delivery and CRISPR–Cas gene editing. *Nat Nanotechnol*, 2020, 15: 313–320
- 60 Ryals R C, Patel S, Acosta C, et al. The effects of PEGylation on LNP based mRNA delivery to the eye. *PLoS One*, 2020, 15: e0241006
- 61 Baden L R, El Sahly H M, Essink B, et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *N Engl J Med*, 2021, 384: 403–416
- 62 Li T, Yang Y, Qi H, et al. CRISPR/Cas9 therapeutics: progress and prospects. *Sig Transduct Target Ther*, 2023, 8: 36
- 63 Lam K, Leung A, Martin A, et al. Unsaturated, trialkyl ionizable lipids are versatile lipid-nanoparticle components for therapeutic and vaccine applications. *Adv Mater*, 2023, 35: 2209624
- 64 Kim B, Seo H W, Lee K, et al. Lipid nanoparticle-mediated CRISPR-Cas13a delivery for the control of bacterial infection. *Adv Healthcare Mater*, 2025, 14: e2403281
- 65 Zhu Y, Ma J, Shen R, et al. Screening for lipid nanoparticles that modulate the immune activity of helper T cells towards enhanced antitumour activity. *Nat Biomed Eng*, 2024, 8: 544–560
- 66 Sago C D, Lokugamage M P, Paunovska K, et al. High-throughput *in vivo* screen of functional mRNA delivery identifies nanoparticles for endothelial cell gene editing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: E9944
- 67 Rhym L H, Manan R S, Koller A, et al. Peptide-encoding mRNA barcodes for the high-throughput *in vivo* screening of libraries of lipid nanoparticles for mRNA delivery. *Nat Biomed Eng*, 2023, 7: 901–910
- 68 Xue L, Hamilton A G, Zhao G, et al. High-throughput barcoding of nanoparticles identifies cationic, degradable lipid-like materials for mRNA delivery to the lungs in female preclinical models. *Nat Commun*, 2024, 15: 1884
- 69 Banskota S, Raguram A, Suh S, et al. Engineered virus-like particles for efficient *in vivo* delivery of therapeutic proteins. *Cell*, 2022, 185: 250–265.e16
- 70 Tao Y, Lamas V, Du W, et al. Treatment of monogenic and digenic dominant genetic hearing loss by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein delivery *in vivo*. *Nat Commun*, 2023, 14: 4928
- 71 Holubowicz R, Du S W, Felgner J, et al. Safer and efficient base editing and prime editing via ribonucleoproteins delivered through optimized lipid-nanoparticle formulations. *Nat Biomed Eng*, 2025, 9: 57–78
- 72 Wei T, Cheng Q, Min Y L, et al. Systemic nanoparticle delivery of CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins for effective tissue specific genome editing. *Nat Commun*, 2020, 11: 3232
- 73 Elia U, Kon E, Peer D. CRISPR editing in the lung with novel lipids. *Nat Biotechnol*, 2023, 41: 1387–1388
- 74 Sago C D, Lokugamage M P, Loughrey D, et al. Augmented lipid-nanoparticle-mediated *in vivo* genome editing in the lungs and spleen by disrupting Cas9 activity in the liver. *Nat Biomed Eng*, 2022, 6: 157–167
- 75 Rahman M M, Wang J, Wang G, et al. Chimeric nanobody-decorated liposomes by self-assembly. *Nat Nanotechnol*, 2024, 19: 818–824
- 76 Robson A L, Dastoor P C, Flynn J, et al. Advantages and limitations of current imaging techniques for characterizing liposome morphology. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 80

- 77 Bulbake U, Doppalapudi S, Kommineni N, et al. Liposomal formulations in clinical use: an updated review. *Pharmaceutics*, 2017, 9: 12
- 78 Zhang P, Zhang L, Qin Z, et al. Genetically engineered liposome-like nanovesicles as active targeted transport platform. *Adv Mater*, 2018, 30: 1705350
- 79 Schuh R S, Poletto É, Fachel F N S, et al. Physicochemical properties of cationic nanoemulsions and liposomes obtained by microfluidization complexed with a single plasmid or along with an oligonucleotide: implications for CRISPR/Cas technology. *J Colloid Interface Sci*, 2018, 530: 243–255
- 80 Filipczak N, Pan J, Yalamarty S S K, et al. Recent advancements in liposome technology. *Adv Drug Deliver Rev*, 2020, 156: 4–22
- 81 Liang C, Li F, Wang L, et al. Tumor cell-targeted delivery of CRISPR/Cas9 by aptamer-functionalized lipopolymer for therapeutic genome editing of VEGFA in osteosarcoma. *Biomaterials*, 2017, 147: 68–85
- 82 Zhao Y, Qin J, Yu D, et al. Polymer-locking fusogenic liposomes for glioblastoma-targeted siRNA delivery and CRISPR–Cas gene editing. *Nat Nanotechnol*, 2024, 19: 1869–1879
- 83 Lin Y, Wu J, Gu W, et al. Exosome–liposome hybrid nanoparticles deliver CRISPR/Cas9 system in MSCs. *Adv Sci*, 2018, 5: 1700611
- 84 Chen Z, Liu F, Chen Y, et al. Targeted delivery of CRISPR/Cas9-mediated cancer gene therapy via liposome-templated hydrogel nanoparticles. *Adv Funct Mater*, 2017, 27: 1703036
- 85 Van Bruggen C, Hexum J K, Tan Z, et al. Nonviral gene delivery with cationic glycopolymers. *Acc Chem Res*, 2019, 52: 1347–1358
- 86 Sun X, Zhang N. Cationic polymer optimization for efficient gene delivery. *MRMC*, 2010, 10: 108–125
- 87 Zou Y, Sun X, Yang Q, et al. Blood-brain barrier–penetrating single CRISPR–Cas9 nanocapsules for effective and safe glioblastoma gene therapy. *Sci Adv*, 2022, 8: eabm8011
- 88 Mitchell M J, Billingsley M M, Haley R M, et al. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20: 101–124
- 89 Breunig M, Lungwitz U, Liebl R, et al. Breaking up the correlation between efficacy and toxicity for nonviral gene delivery. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 14454–14459
- 90 Ryu N, Kim M A, Park D, et al. Effective PEI-mediated delivery of CRISPR–Cas9 complex for targeted gene therapy. *Nanomed-Nanotechnol Biol Med*, 2018, 14: 2095–2102
- 91 Lee B, Gries K, Valimukhametova A R, et al. *In vitro* prostate cancer treatment via CRISPR–Cas9 gene editing facilitated by polyethyleneimine-derived graphene quantum dots. *Adv Funct Mater*, 2023, 33: 2305506
- 92 Ke X, Shelton L, Hu Y, et al. Surface-functionalized PEGylated nanoparticles deliver messenger RNA to pulmonary immune cells. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12: 35835–35844
- 93 Li Y, Li C, Yan J, et al. Polymeric micellar nanoparticles for effective CRISPR/Cas9 genome editing in cancer. *Biomaterials*, 2024, 309: 122573
- 94 Ben-Akiva E, Karlsson J, Hemmati S, et al. Biodegradable lipophilic polymeric mRNA nanoparticles for ligand-free targeting of splenic dendritic cells for cancer vaccination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2023, 120: e2301606120
- 95 Rotolo L, Vanover D, Bruno N C, et al. Species-agnostic polymeric formulations for inhalable messenger RNA delivery to the lung. *Nat Mater*, 2023, 22: 369–379
- 96 Yan X, Pan Q, Xin H, et al. Genome-editing prodrug: targeted delivery and conditional stabilization of CRISPR–Cas9 for precision therapy of inflammatory disease. *Sci Adv*, 2021, 7: eabj0624
- 97 Chen Y, Chen X, Zhang Y, et al. Macrophage-specific *in vivo* RNA editing promotes phagocytosis and antitumor immunity in mice. *Sci Transl Med*, 2025, 17: eadl5800
- 98 Lee B, Lee K, Panda S, et al. Nanoparticle delivery of CRISPR into the brain rescues a mouse model of fragile X syndrome from exaggerated repetitive behaviours. *Nat Biomed Eng*, 2018, 2: 497–507
- 99 Chen Y, Chen X, Wu D, et al. Delivery of CRISPR/Cas9 plasmids by cationic gold nanorods: impact of the aspect ratio on genome editing and treatment of hepatic fibrosis. *Chem Mater*, 2021, 33: 81–91
- 100 Tang H, Xu X, Chen Y, et al. Reprogramming the tumor microenvironment through second-near-infrared-window photothermal genome editing of *PD-L1* mediated by supramolecular gold nanorods for enhanced cancer immunotherapy. *Adv Mater*, 2021, 33: e2006003
- 101 Zhang L, Wang L, Xie Y, et al. Triple-targeting delivery of CRISPR/Cas9 to reduce the risk of cardiovascular diseases. *Angew Chem Int Ed*, 2019, 58: 12404–12408
- 102 Lee S, Lee S, Lee H, et al. Therapeutic glypican-3 CRISPR genome-editing using ultralarge porous silica nano-depot for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Small Sci*, 2025, 5: 2400447
- 103 Noureddine A, Maestas-Olguin A, Saada E A, et al. Engineering of monosized lipid-coated mesoporous silica nanoparticles for CRISPR delivery. *Acta BioMater*, 2020, 114: 358–368
- 104 Wang Y, Wang X, Xie R, et al. Overcoming the blood–brain barrier for gene therapy via systemic administration of GSH-responsive silica nanocapsules. *Adv Mater*, 2023, 35: e2208018
- 105 Yang Z, Wang L, Zhang J, et al. Application of bismuth sulfide based nanomaterials in cancer diagnosis and treatment (in Chinese). *Chin Sci Bull*,

- 2023, 68: 2101–2115 [杨钟炜, 王龙伟, 张健, 等. 硫化铋基纳米材料在癌症诊断和治疗中的应用. 科学通报, 2023, 68: 2101–2115]
- 106 Han J, Sul J H, Lee J, et al. Engineered exosomes with a photoinducible protein delivery system enable CRISPR-Cas-based epigenome editing in Alzheimer's disease. *Sci Transl Med*, 2024, 16: eadi4830
- 107 Zhang C, Wang X, Liu G, et al. CRISPR/Cas9 and chlorophyll coordination micelles for cancer treatment by genome editing and photodynamic therapy. *Small*, 2023, 19: e2206981
- 108 Alyami M Z, Alsaiani S K, Li Y, et al. Cell-type-specific CRISPR/Cas9 delivery by biomimetic metal organic frameworks. *J Am Chem Soc*, 2020, 142: 1715–1720
- 109 Cheng Z, Al Zaki A, Hui J Z, et al. Multifunctional nanoparticles: cost versus benefit of adding targeting and imaging capabilities. *Science*, 2012, 338: 903–910

Summary for “基因编辑药物的纳米递送系统”

Nanodelivery systems for gene editing drugs

Yao Zhang¹ & Yuan Ping^{1,2*}¹ College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China² Liangzhu Laboratory, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 311121, China* Corresponding author, E-mail: pingy@zju.edu.cn

With the rapid development of genomics and biotechnology, gene editing tools such as CRISPR-Cas9 have become a core technology for biomedical research and disease treatment. However, traditional gene editor delivery systems still face serious challenges in terms of delivery efficiency and targeting specificity. Although the current mainstream viral vectors have a high transfection efficiency, their applications are significantly limited due to the potential for triggering immune responses, insertion mutations and other safety hazards. Against this background, nanodelivery systems, with their unique physical and chemical advantages, are breaking through the key technological bottlenecks in gene editing therapy. Compared with traditional delivery methods, nanodelivery systems show revolutionary technical features: first, their chemical structure can be precisely regulated by surface modification, which can not only improve the stability of carriers, but also enhance targeting through ligand modification; second, the use of biodegradable materials significantly improves the biocompatibility of the system and effectively reduces the toxicity of side effects; what's more, through the regulation of particle size and functionalized design, the precise delivery to specific tissues and organs can be realized. For example, lipid nanoparticles can efficiently deliver gene editors to different organs and tissues by adjusting the composition and ratio of the formulation, which opens up a new way for gene therapy. The current research on nanodelivery carriers mainly focuses on lipid nanoparticles, liposomes, polymer nanoparticles and inorganic nanoparticles. In addition, many emerging nanodelivery systems are being developed, such as metal-organic frameworks to enhance delivery efficiency by virtue of their high drug loading capacity, and exosome carriers to achieve low-immunogenic delivery by taking advantage of their natural delivery properties. The research on these nanodelivery systems has greatly contributed to the development of the gene therapy field. This review systematically introduces the widely researched gene editing systems and nanodelivery systems, and focuses on the application cases of different nanodelivery systems, especially lipid nanoparticles, in gene editing. Data show that more and more nanodelivery vectors have been able to achieve efficient targeted delivery to different organs and tissues for gene therapy of various diseases. For example, precise vector design can break through the blood-brain barrier, achieve tumor microenvironment-responsive release, and other special delivery needs. These studies are driving the development of gene editing towards visualization and controllability. Although significant progress has been made in nanodelivery systems, their clinical applications still face challenges such as standardized production and long-term safety assessment. Future development will focus on the development of multimodal delivery systems, *in vivo* dynamic tracking technology innovation and breakthroughs in large-scale preparation processes. With the deep integration of materials science and molecular biology, nanodelivery technology is expected to play a more important role in the eradication of genetic diseases and precision cancer therapy, providing solid technical support for the transformation of gene therapy from laboratory to clinic. It is hoped that by reading this review, readers will gain more inspiration in related research areas and contribute their part in making greater breakthroughs in the fields of nanodelivery vectors and gene editing.

gene editing, nucleic acid drugs, nanomaterials, drug delivery, nanomedicinedoi: [10.1360/TB-2025-0178](https://doi.org/10.1360/TB-2025-0178)