



表观基因组编辑的研究进展与应用

孙阳阳, 马涵慧*

上海科技大学生命科学与技术学院, 基因编辑中心, 上海 201210

* 联系人, Email: mahh@shanghaiTech.edu.cn

收稿日期: 2025-05-02; 接受日期: 2025-05-28; 网络版发表日期: 2025-06-11

国家自然科学基金(批准号: 32471476)和国家重点研发计划(批准号: 2023YFA0913400)资助

摘要 表观基因组编辑技术作为一种不改变DNA序列的基因表达与功能调控方法, 近年来在遗传疾病研究与治疗领域取得显著进展. 本文从表观基因组编辑工具的演变历程, 系统阐述表观编辑的多样策略, 包括DNA甲基化、组蛋白修饰以及多重表观修饰的协同机制. 深入探讨表观基因组编辑相较于传统基因治疗在安全性、可调节性与适应证范围方面的独特优势. 总结了其在疾病相关研究及临床转化前景, 并重点分析表观编辑工具体内递送的技术挑战和未来发展趋势. 随着高效核酸递送系统的开发, 表观编辑有望发展为一种安全、高效、可调控的精准调控与基因治疗平台, 特别适用于表观遗传异常相关疾病、高度遗传异质性疾病以及需多基因同时干预的复杂疾病, 为精准医学提供全新技术范式.

关键词 表观基因组编辑, DNA甲基化, 组蛋白修饰, 核酸递送系统, 基因治疗, 精准医学

表观遗传学泛指在不改变DNA序列的前提下, 通过调控染色质状态和基因表达, 稳定塑造细胞命运并赋予其功能特性^[1]. Waddington^[2]提出的“表观遗传景观”形象描绘细胞在遗传因素与表观修饰共同作用下, 沿不同路径逐步分化的过程.

表观遗传调控体系高度层级化, 在基础层面, DNA缠绕于组蛋白形成核小体, 组蛋白残基可能会发生多种翻译后修饰, 如H3K27乙酰化、H3K9甲基化等, 影响染色质可及性及其与转录调控因子的结合. DNA本身也可以发生修饰, 如5-mC甲基化, 这种修饰通常更为稳定, 能够在细胞分裂中维持状态. 在更高层面, 染色质在细胞核中呈现三维空间组织, 使远距离调控元件与靶基因实现功能耦合. 从核小体到染色质域, 每一级结构都参与基因调控, 共同塑造细胞的“表观遗传

状态”. 这些层级共同形成所谓的“表观基因组”状态, 它不仅记录细胞对过往信号的响应, 还反映当前信号状态, 并预测未来的命运走向^[3].

调控这一系统的关键是表观遗传效应器(epigenetic effectors), 包括三类蛋白质: “写手”(writers)添加表观遗传标记, “擦除者”(erasers)去除标记, “阅读器”(readers)识别标记. 这些效应器协调作用, 动态调节染色质状态, 为科学家们提供强有力的表观修饰工具^[1]. 近年来, 通过将表观遗传效应器与可编程DNA识别模块(如ZFP, TALE, CRISPR)融合^[4-7], 催生表观基因组编辑技术. 该技术实现在特定位点精准操控表观修饰, 已被广泛用于解析染色质状态与基因功能的因果关系, 并推动形成“合成表观遗传生物学”的新兴研究方向. 表观编辑器不仅能够引入某种

引用格式: 孙阳阳, 马涵慧. 表观基因组编辑的研究进展与应用. 中国科学: 生命科学, 2025, 55: 1193–1209

Sun Y Y, Ma H H. Development and application of epigenome editors (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2025, 55: 1193–1209, doi: 10.1360/SSV-2025-0142

修饰,亦可在多个位点或同一位点复合操控多种表观修饰,进而实现对细胞命运的精细调控.这一策略为研究发育与疾病发生机制提供前所未有的手段,也为在不改变DNA序列的前提下实现精准、安全的治疗提供全新范式.

1 DNA结合模块的演化:从锌指蛋白到CRISPR系统

为实现位点特异性的表观遗传调控,科学家们采用将表观遗传效应蛋白(或其催化结构域)与DNA结合结构域(DNA-binding domain, DBD)融合的方法,从而靶向特定基因座进行表观遗传编辑.DBD可通过程序设计将效应蛋白定位至目标位点,实现对特定表观状态的修改(图1).早期的表观遗传编辑研究主要依赖锌指蛋白(zinc finger proteins, ZFPs)或转录激活因子样效应蛋白(transcription activator-like effectors, TALEs)作为DBD.ZFPs与TALEs是天然存在的DNA结合结构域,可通过特定氨基酸模块的工程化重构,赋予其高度的序列特异性.尽管理性设计和定向进化技术提高ZFPs和TALEs的效率,但其工程化过程仍然繁琐、时间和价格成本高.与ZFPs和TALEs相比,CRISPR系统具有更高的可编程性和操作简便性,为表观遗传调控提供一种灵活、高效且精确的新工具,推动该领域的快速进展.

1.1 锌指蛋白(ZFPs)与TALEs:早期可编程DNA结合平台

Cys2-His2 (C2H2)锌指蛋白是最早被开发的可编程DNA结合蛋白.每个“锌指”结构单元通过主沟识别3~4个碱基,整体呈 β - β - α 折叠结构,并由一个锌离子稳定^[8].C2H2锌指的序列识别能力可通过调节接触碱基的关键氨基酸进行编程.然而,这种编程并非完全独立,它受到相邻锌指的构象干扰和DNA表观修饰状态的影响^[9].为增强特异性,研究人员尝试将多个锌指串联构建“锌指阵列”,用于识别更长的DNA序列.通过将阵列与核酸酶或转录调控因子融合,诞生最早的基因编辑工具^[10]以及早期的表观遗传编辑系统^[11].然而,每一个新的锌指阵列都需重新设计和验证,这极大限制了其在大规模或通用场景中的应用.随后,研究人员在植物病原细菌黄单胞菌中发现转录激活因子

样效应物(TALEs)^[12,13],它们成为另一种高度可编程的DNA结合平台.TALE蛋白由多个长度为34个氨基酸的重复单元组成,每个单元可特异性地识别一个DNA碱基(图2).其中,仅有两个残基——“重复变异二联体”(repeat-variable di-residues, RVD)——负责特异性识别,这种一对一的密码规则极大丰富TALE的设计^[14].如同锌指蛋白一样,TALEs也被广泛用于基因组^[15]和表观基因组^[16]编辑研究.尽管ZFPs与TALEs均在机制研究和工具开发中发挥重要作用,并各具特色,但在可扩展性、方便程度与灵活性方面,它们最终被后续出现的CRISPR-Cas9系统所超越.

1.2 CRISPR-Cas系统:表观遗传编辑的革命性工具

CRISPR-Cas系统,即“聚集性规律间隔短回文重复序列”(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)相关的Cas蛋白,是一种可通过向导RNA(guide RNA, gRNA)编程定位的核酸酶工具^[17,18].关键在于,通过引入特定突变,可获得核酸酶失活型Cas蛋白(dead Cas, dCas),该蛋白虽然失去切割能力,但仍能在gRNA引导下精准结合靶DNA,作为可编程的DNA结合结构域(DBD)使用^[19,20].与ZFPs和TALEs等传统DNA结合蛋白相比,CRISPR系统具有更高的可编程性和简化的设计流程.基于这一优势,科学家们保留“DBD+表观遗传效应因子”的经典融合架构,但将传统DBD替换为dCas-gRNA模块,从而构建出一套通用、高效的表观遗传编辑工具箱.CRISPR干扰(CRISPRi)和CRISPR激活(CRISPRa)是最早应用dCas系统实现基因表达下调或上调的策略,为后续的表观遗传调控技术奠定基础^[21,22].在此基础上,研究人员持续开发新型效应结构域,与dCas融合,以扩展可编程表观遗传标记的类型(如组蛋白甲基化、乙酰化、DNA甲基化等),并增强靶基因表达的调控幅度和精度.2015年,Hilton等人^[23]首次将dCas9与组蛋白乙酰转移酶p300融合,实现表观遗传修饰的定点操控,标志着CRISPR系统向表观遗传调控领域的重大拓展.

2 表观基因组编辑工具的分类与作用机制

表观基因组编辑器可以精确、可逆地调控几乎任何基因的表达,已被广泛认为在基因功能组学研究和

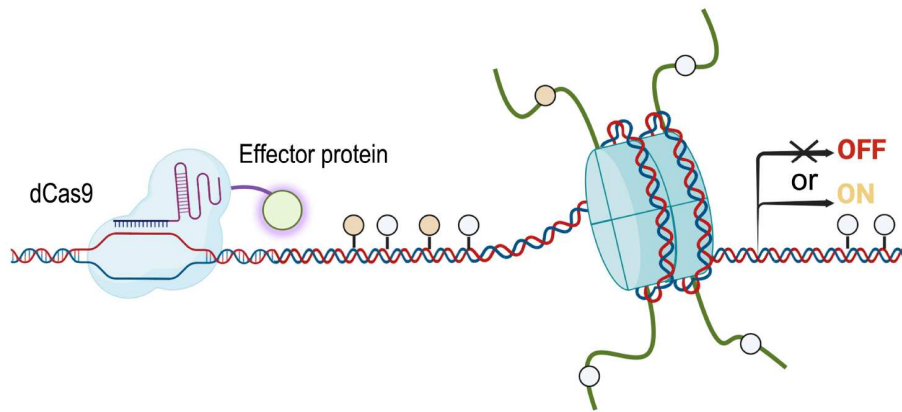


图 1 表观基因组编辑的基本原理

Figure 1 Principle of epigenome editing

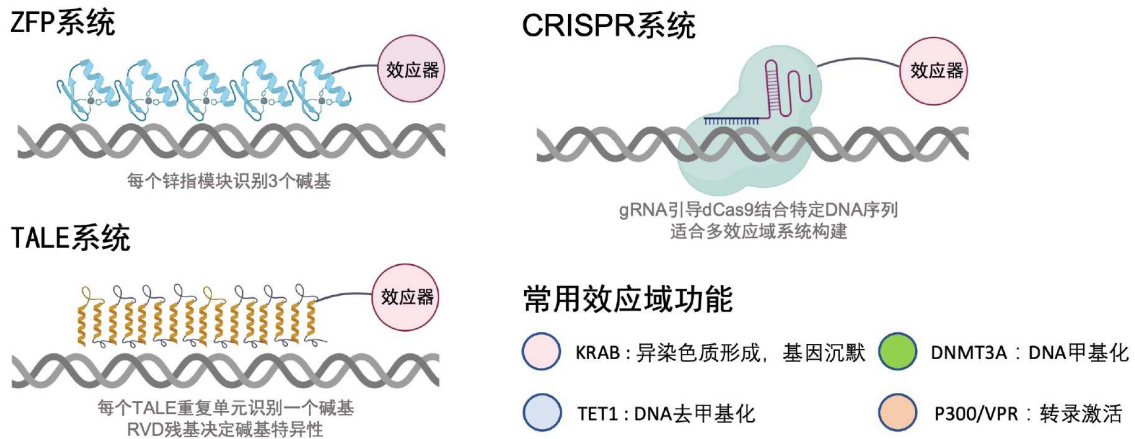


图 2 表观基因组编辑器的DNA结合结构域与效应器概览

Figure 2 Overview of DNA-binding domains and effectors in epigenome editors

细胞命运决定机制解析中具有重要价值。这一能力推动大量生物学研究与高通量筛选, 极大地加速调节蛋白质的探索及DNA调控元件功能的识别^[24-26]。借助ZFPs与TALEs时代的先导经验, 研究者迅速将一系列已知表观遗传效应因子(如甲基转移酶、去甲基酶、组蛋白乙酰化/去乙酰化酶等)与dCas平台进行融合, 发展出多种可靶向、可编程的表观遗传编辑工具^[21,27-32]。值得注意的是, 表观基因组编辑的调控维度已超越传统的DNA甲基化和组蛋白修饰范畴, 逐步扩展至染色质三维结构的精准重塑。基于可编程DNA结合平台的三维基因组工程技术通过调控染色质环路(chromatin loops)、重新分布基因组区域的核内定位, 以及调节拓扑相关域(TAD)边界等策略, 为表观调控

增添空间维度的操控能力^[33,34]。在下文中将基于表观遗传调控的不同功能层级, 对现有的表观编辑策略进行分类(表1)。

2.1 激活性组蛋白修饰: 开放染色质与转录激活

早期的CRISPR介导的基因激活工具主要依赖于将dCas9与单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV) VP16转录激活结构域的串联体(如VP64)融合^[21,28,62-64], 通过CRISPR系统靶向靶启动子区域, 转录激活结构域招募共激活因子和转录机器, 以促进基因表达。

为增强基因激活效果, 可同时靶向启动子或增强子上的多个相邻区域以诱导协同效应^[22,63,65], 或在

表 1 可工程化表观遗传修饰概述^{a)}

Table 1 Advances and applications of epigenome editing^{a)}

应用	效应结构域	关键的表观遗传变化
激活性组蛋白修饰		
组蛋白赖氨酸乙酰化	P300, GCN5 ^[35] , CPB ^[36] , VP64+P300 ^[37]	增加H3K27ac, H3K9ac
组蛋白赖氨酸甲基化	PRDM9 ^[38] , DOT1L ^[38] , MLL3SET ^[39] , SMYD3 ^[40]	增加H3K4me1/2/3, H3K79me2/3
组蛋白磷酸化	dMSK1 ^[41]	增加H3S28ph, H3S10ph
抑制性组蛋白修饰		
组蛋白赖氨酸甲基化	KRAB ^[42] , EZH2 ^[42] , G9a ^[43] , SUV39H1 ^[44] , FOG1 ^[44] , KRAB+MECP2 ^[45] , HMT5C ^[45]	增加H3K9me2/3, H3K27me3, H4K20me3
组蛋白赖氨酸去甲基化	LSD1 ^[42]	去除H3K4me2
组蛋白去乙酰化	HDAC3 ^[46] , HDAC8 ^[46] , SIR2a	去除H3ac, H4ac, H3K27ac
组蛋白泛素化	RING1B ^[45]	增加H2AK119ub
转录激活因子		
招募内源激活因子	VP16 ^[47] , VP64 ^[21] , VPR ^[48] , p65HSF1 ^[49]	增加H3K27ac, H3K4me, H3K9ac, H3K4ac
DNA修饰		
DNA胞嘧啶甲基化	DNMT3A ^[50] , DNMT3A+DNMT3L ^[51] , KRAB/EZH2/FoG1+DNMT3A ^[44] , KRAB+DNMT3A+DNMT3L ^[52] , DNMT3B ^[53] , M.ssi MQ1 ^[54]	DNA 5-mC (CpG和CpH)的添加
DNA胞嘧啶去甲基化	TET1 ^[55] , TET2 ^[56] , TET3 ^[57] , TDG ^[58] , TET1+VP64 ^[59] , TET1+VP64+MCP-P65-Rta ^[60] , TET1+GADD45a ^[61] , TET1+NEIL2 ^[61]	去除DNA 5-mC, 将DNA 5-mC转化为5-hmC
其他		
3D基因组工程	CRISPR-GO ^[33] , CTCF ^[34]	染色质环的形成

a) 5-mC: 5-methylcytosine (5-甲基胞嘧啶); 5-hmC: 5-hydroxymethylcytosine (5-羟甲基胞嘧啶); CpG: cytosine-phosphate-guanine (二核苷酸结构, 胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤); CpH: cytosine-phosphate-A/T/C (非典型CpG位点, 胞嘧啶-磷酸-腺嘌呤/胸腺嘧啶/胞嘧啶); ac: acetylation (乙酰化); me: methylation (甲基化); ph: phosphorylation (磷酸化); ub: ubiquitination (泛素化); m⁶A: N⁶-methyladenosine (N⁶-甲基腺苷)。

dCas9的两端引入VP16串联体^[47], 构建高效激活系统(图3A), 如三效应子融合的VPR (VP64-p65-Rta)^[48], 以及通过肽或RNA介导多效应子募集的SunTag^[66], SAM^[49], Casilio^[36]等平台。这些系统整合多个激活域, 能更好地模拟依赖多种因子协同调控的天然转录过程。

与此同时, 研究人员也开始将激活机制从传统的转录因子扩展至表观遗传层面。染色质的基本结构单位是核小体, 由DNA缠绕在一个八聚体的组蛋白复合物上, 该复合物由四种核心组蛋白(H2A, H2B, H3和H4)各两个拷贝组成, 其中部分组蛋白还具有非经典变异体(如H2A.X, H2A.Z, macroH2A和H3.3)^[67]。

这些组蛋白上含有大量可被翻译后修饰的残基, 常见的修饰包括赖氨酸的乙酰化、甲基化、泛素化、SUMO化和丝氨酸/苏氨酸的磷酸化等^[68](图3B)。这些翻译后修饰通过改变染色质的紧密程度、调控转录因子的可及性, 或募集特定蛋白复合物, 从而在空间和时间上精细地调节基因表达^[69]。此外, 这些修饰具有可逆

性, 可被快速添加或去除, 也可能在细胞分裂过程中被维持或擦除, 从而赋予母细胞和子细胞不同的表观基因组状态^[69]。

CRISPRa系统逐渐融合能直接诱导组蛋白活性标记的酶, 如将dCas9与组蛋白乙酰转移酶(如p300)^[23,32,70]或组蛋白甲基转移酶(如MLL/SET1家族)^[38,71]融合, 用于在目标区域沉积H3K27ac或H3K4me3等激活性组蛋白修饰。这些策略不仅改变染色质结构, 更为转录激活提供更多的选择。因此, CRISPRa技术已从依赖VP64等传统激活因子的线性系统, 演化为通过调控组蛋白翻译后修饰实现可编程染色质活性的复杂平台。

2.2 抑制性组蛋白修饰: 压缩染色质与基因沉默

CRISPR介导的基因抑制(CRISPRi)系统最初依赖于dCas9融合KRAB (Krüppel-associated box)结构域, 以关闭染色质, 从而有效沉默目标基因表达^[21]。然而, 早期研究已表明, 即使在同一家族内, 不同的抑制性染

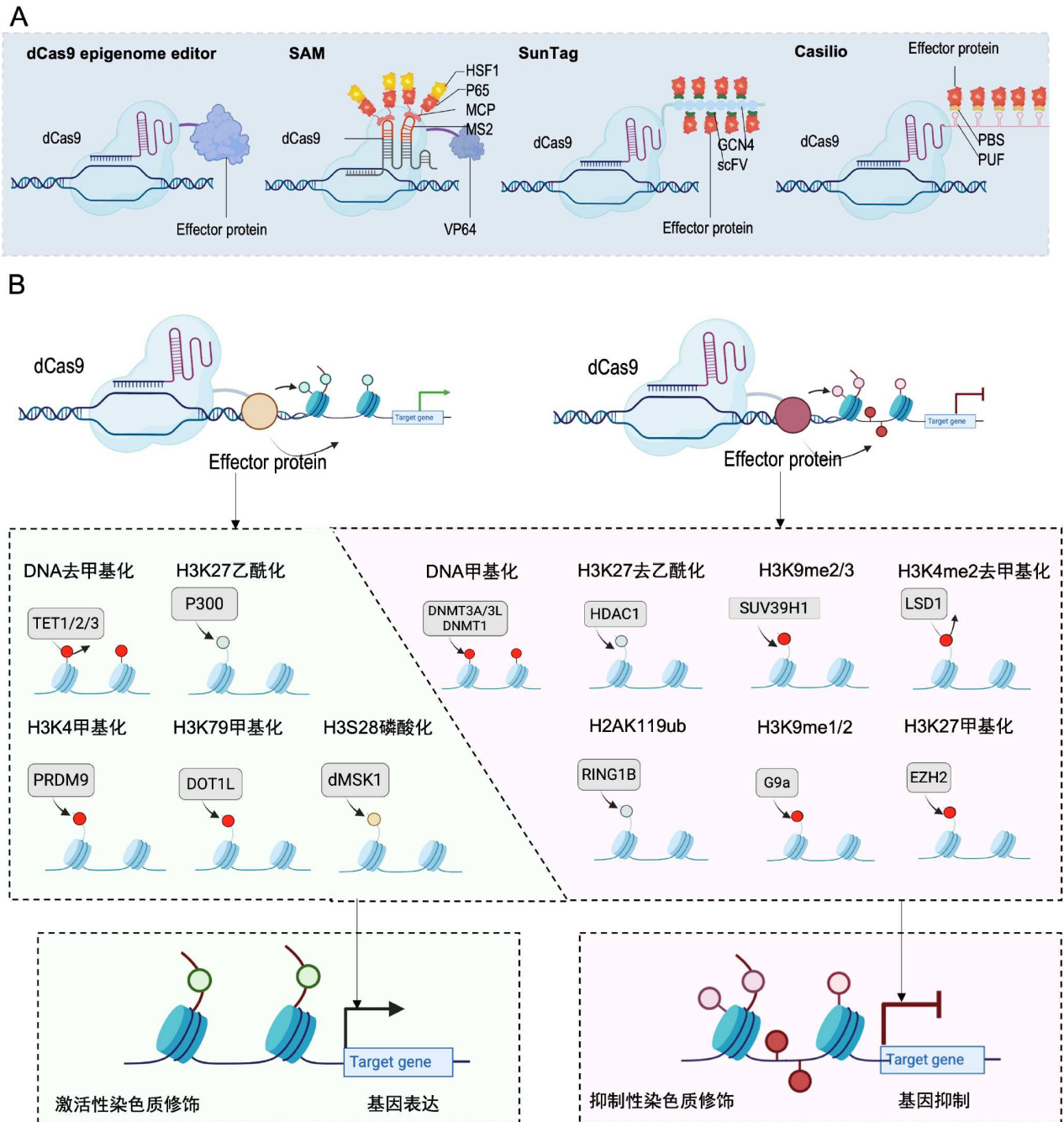


图 3 基于CRISPR/dCas9表观基因组编辑器的种类与各种表观修饰。A: 基于dCas9的多种表观编辑系统示意图; B: 表观编辑系统通过招募不同类型的效应器蛋白实现各种染色质修饰功能

Figure 3 CRISPR/dCas9-based Epigenome Editors and the variety of epigenetic modifications. A: Schematic of dCas9-based epigenome editors; B: the types of epigenetic modifications

色质调节因子在基因沉默的动力学、强度和稳定性方面也存在显著差异^[72,73]。在人类基因组中, 约有350种不同的KRAB结构域, 它们通常通过招募包括KAP1在

内的辅抑制因子, 引导染色质重塑, 从而实现快速且强效的转录抑制^[74]。但根据KRAB结构域间与TRIM28的结合强度不同, 导致其抑制效果并不完全相同。大多数

CRISPRi研究使用源自KOX1 (ZFP10)的KRAB结构域作为工具。

为进一步提高CRISPRi系统的沉默效率与持久性, 越来越多研究开始引入多种组蛋白翻译后修饰调控因子。这些因子通过精细调节染色质状态, 实现从快速应答到长效沉默的多层次调控。例如, 组蛋白赖氨酸甲基化是最广泛用于沉默的修饰, 常见效应子包括G9a^[43], SUV39H1^[44], EZH2^[42]等, 它们分别针对H3K9或H3K27位点催化甲基化修饰, 进而关闭染色质。KRAB^[42]结构域可通过招募SETDB1实现H3K9me3的积累。为增强染色质抑制的程度与维持时间, 研究者还开发如FOG1^[44], MECP2^[45,46], HMT5C^[45]等辅助调控因子的组合系统(如KRAB-MECP2^[45]), 在多种细胞类型中表现出协同增强效果。

除添加修饰, 去乙酰化与去甲基化机制也常被利用以去除激活性表观修饰。例如, HDAC3^[46], HDAC8^[75], SIR2a^[35]等去乙酰化酶能够移除H3K9ac, H3K27ac等转录激活相关修饰, 压缩染色质结构并阻断转录因子结合; 而LSD1^[35]则可去除H3K4me1/2等修饰, 从而抑制活跃启动子的活性。此外, RING1B^[45]等E3泛素连接酶可在H2AK119位点引入泛素化修饰, 模仿Polycomb复合物(PRC1)介导的抑制机制。

尽管组蛋白翻译后修饰是CRISPR表观遗传编辑中一个有效的调控方式, 但其功能常常具有高度的动态性与可逆性。除非表观编辑工具能在细胞内持续表达并保持活性, 否则通过人工编辑组蛋白修饰实现的基因表达调控大多都是暂时性的^[29,42,76]。例如, 已修饰的组蛋白可以被内源性表观酶快速“去修饰”, 或在核小体更新过程中直接被非修饰的组蛋白替换掉^[73,77]。因此, 只有当这些人工修饰能够被稳定维持、在有丝分裂中复制传承, 或通过外源系统周期性重新引入时, 才能建立更为持久的表观修饰状态。

值得注意的是, 尽管大多数染色质修饰的效果是短暂的, 但对某些决定细胞命运的关键调控因子进行短时间的激活或沉默, 却可能诱导细胞分化, 从而引发一系列下游的表观遗传重塑与稳定的转录程序重设^[47,78-80]。这类“触发-重塑”机制表明, 即便是暂时性的表观调控, 在某些治疗场景中也具有变革性潜力。

尽管如此, 目前多数基于组蛋白修饰调控的治疗策略仍依赖于表观编辑器的持续表达^[81], 这在体内应用时仍有很多弊端。

2.3 DNA甲基化介导的长时程抑制表观编辑器的开发

DNA甲基化由DNA甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMT)家族催化形成, 其中DNMT3A和DNMT3B则在辅因子DNMT3L协助下完成新生甲基化, 而DNMT1负责甲基化维持^[82]。早在1997年, 研究人员将锌指蛋白(ZFP)与细菌甲基转移酶M.SssI融合, 靶向p21基因启动子中的p53结合位点, 通过诱导DNA甲基化实现基因沉默, 标志着定点表观干预的开端^[83]。随后, 研究者逐步转向哺乳动物来源的甲基转移酶, 如DNMT3A, 以提升内源兼容性与调控效率。ZFP-DNMT3A和TALE-DNMT3A融合系统在多个基因中成功诱导靶向甲基化, 显著增强编辑的特异性^[84-86]。

CRISPR/dCas9系统的出现彻底革新表观编辑策略。Vojta等人^[50]在2016年首次将dCas9与DNMT3A催化结构域融合, 实现RNA引导的可编程甲基化编辑。后续引入DNMT3L极大增强甲基化效率, 尤其在CpG岛富集区, 实现更高效、持续的基因沉默^[51]。但在特定基因座(如HER2)中, 单一甲基化策略仍难以维持长期基因沉默状态。这促使研究者探索多种表观修饰的协同作用机制。例如, O'Geen等人^[44]在2017年发现, 需同时递送DNMT3A-dCas9与EZH2-dCas9, 能在HER2位点建立稳定、遗传的沉默状态。这表明DNA与组蛋白修饰的协同在转录抑制中发挥关键作用。

多模块融合系统不断地被开发。其中, CRISPRoff系统通过将KRAB, DNMT3A和DNMT3L融合至dCas9, 实现组蛋白H3K9去乙酰化、H3K9甲基化与DNA甲基化的整合调控^[52]。该系统不仅在多个基因上诱导可遗传的基因沉默, 而且无须持续表达表观编辑器, 为构建“瞬时编辑-持久沉默”的长期调控奠定基础。CRISPRoff平台的核心优势在于结构简洁与通用性强。除CRISPR外, 其表观模块亦可应用于ZFP与TALE等非CRISPR骨架, 并已在小鼠肝脏模型中通过mRNA-LNP递送实现体内瞬时表达-长期抑制, 具备良好的临床转化潜力^[87]。

为进一步缩减系统体积并提升递送适配性, CHARM系统(Coupled Histone tail for Autoinhibition-Release of Methyltransferase)应运而生^[88]。CHARM利用H3K4me0肽偶联无催化活性的DNMT3L, 招募并激活内源DNMT3A, 无须引入外源酶。该系统已成功用

于体内沉默朊病毒蛋白基因, 兼具紧凑结构与高效功能, 显著拓展表观编辑的适用范围。

综上所述, 表观基因组编辑工具从以组蛋白甲基化或DNA甲基化为主的单一机制, 逐步演化为集多种抑制因子、模块化协同、结构精简于一体的长期调控平台。特别是在无须持续表达表观编辑器的前提下实现长时间基因沉默, 已显现出强大的技术成熟度与转化潜力。

2.4 DNA去甲基化: 基因重激活的精准调控

近年来, 表观遗传激活与去甲基化技术迅速发展, 构建一系列可实现位点特异性基因激活的表观编辑工具。DNA去甲基化主要依赖于Ten-Eleven Translocation (TET) 蛋白酶家族的催化活性。TET蛋白包括TET1, TET2和TET3, 它们能够将5-甲基胞嘧啶(5-mC)依次氧化为多个中间产物: 5-羟甲基胞嘧啶(5-hmC)、5-甲酰胞嘧啶(5-formylcytidine, 5-fC)和5-羧基胞嘧啶(5-carboxylcytosine, 5-caC)^[88]。但值得注意的是, TET酶并不直接催化这些中间产物向未甲基化胞嘧啶的转变。因此, 这些修饰的清除仍需依赖其他机制: 一方面可以通过细胞分裂中的DNA复制实现稀释, 另一方面则依赖碱基切除修复机制(BASE EXCISION repair, BER), 尤其是对5-fC和5-caC的识别与替换, 从而最终完成真正的DNA去甲基化。

基于这一酶学机制, 早期研究构建以锌指蛋白(ZFP)或转录激活样效应因子(TALE)为DNA识别模块, 分别融合去甲基化酶(如TET1或DNA去甲基化酶胸腺DNA糖基酶(tDG))的去甲基化系统。例如, ZF-tDG系统^[89]可重新激活沉默的NFκB靶基因, 而TALE与TET1的融合, 能去除基因启动子上的甲基化, 导致基因表达显著增强^[4]。随着CRISPR/dCas9系统的兴起, 研究者开发出更多高效、可编程的去甲基化工具。最常见的是将催化域TET1CD与dCas9融合, 构建dCas9-Tet1系统, 实现特定位点的5-mC去除^[55]。进一步的技术改进如SunTag系统, 利用dCas9-GCN4与多个scFv-Tet1CD融合蛋白协同增强信号强度, 提高去甲基化效率^[90]; 而Casilio-ME系统则通过将PUF结合位点嵌入sgRNA, 从而引导多个Tet1定位至目标区域^[61]。此外, 非酶依赖策略也日益受到重视, 例如dCas9本身可通过空间阻断DNA甲基转移酶DNMTs的结合, 实现“被动式去甲基化”^[91]。

尽管dCas9-Tet1系统在多个模型中展现出增强基因表达的能力, 但其激活效果往往依赖于目标基因本身的表观状态与启动子活性, 在大部分情况下并不能实现持久表达。为克服持续表达的限制, 近期有研究者通过筛选病毒蛋白结构域, 鉴定出两个来源于干扰素调节因子2 (IRF2)的微型衍生效应因子^[92]。这些效应子在与DBD融合后, 即便在转染后短暂表达, 也能在细胞和动物模型中维持较长时间的基因激活效果。这一策略代表靶向激活系统从依赖酶活性向紧凑、瞬时递送、持久作用方向的重要跃迁。

综上所述, 表观遗传激活与去甲基化系统正在由传统的大型融合蛋白转向结构紧凑、可瞬时递送, 且具有持久作用的新策略。随着CRISPR平台、效应因子与sgRNA结构的不断优化, 这些工具为精确调控内源基因提供强有力的手段, 并在细胞命运决定、疾病模型修复与基因治疗领域展现出广阔应用前景。

3 表观遗传编辑中的技术考虑

3.1 招募和控制策略

近年来, 增强表观遗传编辑工具活性的策略不断涌现, 其中一类核心方法是通过局部募集多个效应子以产生协同效应。这类策略常通过dCas蛋白串联特定位点, 吸附与scFv融合的表现遗传效应子, 如KRAB, DNMT3A等, 显著放大局部沉默或激活信号^[9,29,31,41,66,93]。此外, 基于gRNA工程的系统亦展现出强大潜力: 将RNA适配体结构(如MS2或PP7)插入gRNA茎环区, 可招募与之结合的RNA结合蛋白, 从而间接招募附着其上的效应子^[36]。这些组合策略不仅提升编辑效率, 也为多重调控提供模块化平台^[36,94]。与此同时, 时间与空间的精确控制也是提高编辑工具特异性和安全性的关键。在时间尺度, 研究者已开发出多种可诱导系统, 包括Tet-On启动子、化学诱导二聚系统(如FKBP与FRB)、蛋白降解标签等, 使在特定时点内诱导表观遗传效应子发挥作用^[95~97]。在空间尺度, 多个正交CRISPR系统(如dCas9与dCas12a)可分别定位于不同靶点, 进行不同修饰, 或配合正交的诱导系统分别在时空维度内实现独立控制。此外, 光遗传学手段也被引入表观遗传编辑领域^[96,98,99], 如将dCas9与光敏蛋白CRY2/CIB1系统融合, 可实现蓝光控制下的基因激活或沉默, 赋予编辑过程亚细胞级的空间分辨率^[96]。

3.2 表观遗传编辑工具的小型化策略

表观遗传编辑工具普遍存在尺寸较大的问题,特别是在介导DNA甲基化调控时,相关效应器常因结构复杂而给体内递送带来显著挑战,尤其对包装容量有限的AAV病毒载体(约4.7 kb)而言。为解决这一限制,研究者已开发多种小型化策略:一方面,开发体积更小的Cas蛋白变体^[77,100-103],如IscB, CasX, Cas12f等;另一方面,采用双AAV策略,将dCas与效应域拆分成多个可重组片段,通过两个AAV载体递送,随后在细胞内完成重构^[81,88,104]。此外,通过结构生物学分析将效应域缩减^[105]或采用更小的效应器^[88,105],在特定场景中,完全替换dCas9为天然小尺寸DNA结合模块如锌指蛋白也极具优势^[105,106]。随着这些策略的不断完善与组合应用,表观遗传编辑工具在体内应用的递送效率有望显著提升,特别是在中枢神经系统等递送挑战较大的组织中。

4 表观遗传编辑作为疾病治疗策略的独特优势

CRISPR-Cas系统为基因治疗提供一个多功能“工具箱”,包括双链DNA切割技术(用于基因敲除/插入)和单链切割技术(碱基编辑、引导编辑等),均已显示出治疗多种疾病的巨大潜力^[107]。表观遗传编辑已广泛用于研究基因调控和疾病机制,但它是否真正适合被应用到治疗仍需深入探讨。支持者认为,相较于传统的CRISPR基因敲除或碱基替换,表观遗传编辑具有更高的安全性、可调节性与可逆性,并可用于治疗一些其他方法难以触及的疾病^[6,107-109]。

首先,从安全性角度看,已有大量研究记录基因敲除、碱基编辑和引导编辑在多位点应用时可能引发的DNA损伤,如染色体易位、大片段缺失或插入,甚至导致细胞死亡^[110,111]。相比之下,目前尚未有研究报道多重表观遗传编辑会引起类似的不良基因组事件^[112-114]。这一点使其在治疗多基因疾病或DNA重复扩增相关疾病(如肌萎缩侧索硬化症、多种肿瘤亚型)中具备显著优势,因为这类疾病通常需要多位点同时干预。其次,传统的DNA编辑方法常带有“二元”性质——即要么激活、要么沉默一个基因。而表观遗传编辑可以在多个层级上实现调控,不仅能够调节表达水平的强弱,而且具备“开关”属性,理论上可以实现可

控、可逆的调节^[114,115]。这对于某些需精细调控的基因表达状态(如调节剂量敏感型基因)尤其关键。

此外,一些疾病本身就具有高度的遗传异质性^[116]。马凡综合征,是由单个基因上超过3000种不同突变引起的遗传性疾病。在这种背景下,逐一纠正突变几乎不现实,而表观遗传编辑提供一种更具普适性的治疗路径。再者,部分疾病本质上属于表观遗传紊乱,例如由印记异常、单倍剂量不足、高/低甲基化、组蛋白修饰酶突变等引起的疾病。这类疾病涵盖从罕见病(如Angelman综合征、Rett综合征)到常见病(如癌症、神经退行性疾病)的广泛谱系^[117-121]。例如,面肩肱型肌营养不良(facioscapulo-humeral muscular dystrophy, FSHD)就是由特定位点低甲基化导致致病基因激活所引起的疾病,通过重建该区域的甲基化状态,有望实现持久的疾病缓解,而其他形式的基因治疗在此场景下则手段有限^[118,122]。从脱靶风险的角度出发,表观遗传编辑工具也具有天然优势。即便在尚未完全解析其靶向特异性的前提下,表观遗传改造的理论风险远低于DNA水平的永久性修改。即使发生“脱靶修饰”,其潜在后果通常不会像基因突变那样具备灾难性影响^[123]。

当然,任何治疗策略都应与现有技术进行比较。反义寡核苷酸(ASO)、siRNA和miRNA等RNA干扰技术已在临床中取得一定成效,但其作用通常短暂且依赖于反复给药,不具备表观遗传编辑可能实现的长期调控效果^[124]。而且,基于CRISPR或ZFP的表观调控工具在某些场景中已展现出等位基因特异性调控能力,具有更高的精确性^[120]。更重要的是,表观遗传工具不仅可以抑制基因表达,也可用于激活,适用范围远广于ASO和小RNA技术。ASO和小RNA技术的临床应用相对成熟,而表观遗传编辑技术虽然仍在积累体内及灵长类模型的概念验证数据,但展现出令人鼓舞的发展前景。在许多未满足的临床需求面前,表观遗传编辑为精准治疗提供新的希望。需要承认的是,其发展仍面临诸多挑战,如脱靶风险的进一步评估、递送工具(尤其是对中枢神经系统)的优化等问题。最终,表观遗传编辑的安全性将受到递送系统质量的直接影响。

总体而言,表观遗传编辑作为一种治疗策略,其逻辑清晰、原理坚实、适应证广泛,并有望与现有治疗形成互补。研究者设想,不同方法将针对不同疾病适应证发挥作用,而表观遗传编辑将在这一谱系中占据不可替代的一席之地^[125]。

5 表观遗传编辑的体内概念验证与临床转化

早在2010年,科学家便在小鼠大脑中通过AAV递送锌指蛋白(ZFP)激活器^[126],首次展示体内表观遗传编辑的可行性——这一时间点甚至早于CRISPR-Cas系统的广泛应用。随后,研究者也开发基于dCas9与TALE的系统,在体内进行类似操作^[28,127]。到2014年,研究人员通过单纯疱疹病毒(HSV)将ZFP效应蛋白送入脑组织,实现对与成瘾和抑郁相关的组蛋白翻译后修饰的靶向调控,进一步证明表观基因组编辑可在体内调控基因。这些开创性的工作虽未直接用于疾病治疗,但奠定临床应用的基础^[128]。虽然递送系统的限制尚未完全克服,但这类研究清晰展示体内长期转录调控的可行性。越来越多的研究团队将表观遗传编辑技术应用于野生型(wild type, WT)和疾病模型(disease model, DM)小鼠中用以干预或逆转多种疾病的表型。在神经系统疾病研究中,ZFP工具仍因其小巧体积占据一席之地。ZFP介导的表观调控已在阿尔茨海默病^[106,129]、亨廷顿病^[120]、高胆固醇血症^[87]、朊病毒病^[88]等多个疾病模型中表现出治疗潜力。与此同时,CRISPR表观调控工具的体内应用也在不断地开发^[54]。随着病毒载体和纳米颗粒等递送技术的突破,大规模蛋白复合体的体内递送成为现实,加速了表观遗传编辑技术的临床转化进程^[81,130,131]。

值得注意的是,DNA甲基化由于其持久性与可遗传性,正成为工业界最具吸引力的策略之一。多家初创公司(Tune Therapeutics, Chroma Medicine, Epicrispr Biotechnologies, Omega Therapeutics, Epigenic Therapeutics和Moonwalk Biosciences)正在将DNA甲基化作为核心技术平台,推动其向临床转化。然而,体内应用的伦理问题仍需慎重对待。尤其是在生殖细胞系中,表观遗传工具尚未完全明确是否会造成代际传递的基因表达变化。相比于永久性基因编辑,表观调控策略因其可调节、可逆转的特性而具有更高的安全性。但随着持久性工具的广泛应用,它们或将面临与传统基因编辑相似的伦理审查标准。如果未来研究能进一步证实其靶向性更强、毒性更低,表观遗传编辑或将缓解当前关于生殖细胞脱靶效应的担忧。考虑到DNA甲基化在胚胎发育中的关键作用,对生殖细胞进行表观遗传编辑时,其安全性和遗传性影响需要得到严格评

估^[132,133]。

综上所述,表观遗传编辑不仅已经在体内展示出强大的潜力,也正逐步走向针对复杂疾病的临床实践。该技术可能在未来改变我们对疾病治疗的策略,尤其是针对无法通过传统基因敲除手段有效缓解的疾病。

6 表观遗传编辑工具的递送挑战与策略

表观遗传编辑技术在基础研究与疾病治疗中展现出巨大潜力,但其临床应用的关键障碍之一是如何将这些大分子工具有效、安全、并具组织特异性地递送至体内靶组织^[134,135]。目前,虽然大量研究集中于中枢神经系统(central nervous system, CNS)相关疾病的表观调控机制,但真正进入临床转化的表观遗传疗法多数集中在肝脏、肌肉等外周器官。这一现象并非偶然,而是递送效率、免疫容忍性及工具表达可控性等因素共同作用的结果。肝脏和肌肉等组织具备较高的递送效率和表达可控性,可通过一次短暂的工具表达实现长期基因调控效应,尤其适合基于DNA甲基化和组蛋白修饰的沉默型表观编辑策略。而中枢神经系统的表观编辑则受限于血脑屏障、靶向性差、递送效率低和长期表达带来的潜在免疫激活等问题,尚未形成适用的解决方案。因此,目前递送平台的性能在很大程度上决定适合表观遗传治疗干预的疾病种类。基于已有研究,一个理想的递送平台应具备下列核心特征:一是足够大的封装容量,能够容纳如dCas9及其融合元件的大分子工具;二是工具表达短暂但调控效果持久,理想状态是依赖一次性表观修饰而非持续表达表观编辑器维持疗效;三是低免疫原性和良好的重复给药能力,特别适合慢性病管理;四是具备精确的组织或细胞特异性靶向能力,以提升疗效并降低脱靶风险^[135,136]。

目前常用的体内递送系统包括病毒载体和非病毒纳米颗粒两大类。腺相关病毒(AAV)因其良好的组织穿透性、低免疫原性及稳定表达能力,在CNS疾病研究中应用广泛^[134]。通常认为其安全性较高,因为其DNA在大多数情况下仅以外源形式存在于细胞中,极少整合入宿主基因组。对于长期表观编辑应用,AAV递送的转基因在未分裂细胞中可作为外源DNA持续表达,但也可能随时间逐渐丢失^[134,137]。其最主要的局限在于极小的封装容量(约4.7 kb)^[134],因此常需借助效率不高的

双病毒进行基于CRISPR表观编辑器的表达^[130,138]。近年来,微型Cas蛋白和紧凑型表观遗传效应元件的开发为将表观编辑器装入单个AAV载体提供可行性,开启更广泛的应用前景^[77,88,100,139]。然而,人类体内普遍存在对AAV衣壳蛋白的先天免疫和适应性免疫,限制其重复给药。虽然可通过Cargo设计实现一定程度上的神经元亚型特异性表达^[140],但AAV衣壳蛋白难以精准改造以赋予理想的细胞类型靶向能力,这限制其在复杂组织中的应用范围^[134]。尽管如此,AAV已在临床上被批准用于视网膜和肌肉疾病,其在这些器官中进行表观遗传干预可能具备良好的转化基础。对希望通过一次性递送实现长期转录调控的表观遗传编辑器而言,AAV的运载能力和持续表达问题是主要障碍。值得注意的是,ZFP-CHARM等新型表观编辑器已在体内被证明具有独特优势:能够实现诱导性自身沉默,同时维持长期的基因调控效果,为解决长期表达带来的副作用提供潜在方案。ZFP-CHARM还通过避免dCas9系统本身的过大体积规避封装限制,尽管这在一定程度上牺牲CRISPR系统广泛可编程性带来的灵活性^[88]。腺病毒(adenovirus, AdV)虽然封装能力更大、在肝脏中递送效率高,但免疫原性显著,限制其在慢性病中的应用^[134]。慢病毒及其整合缺陷版本在体外细胞治疗中有良好表现,但不适用于神经系统的体内应用^[134]。

相比之下,非病毒载体如脂质纳米颗粒(lipid nanoparticle, LNP)近年来取得突破,可递送mRNA形式的表观编辑器^[141]。已在肝脏等器官实现一次短暂表达带来的长期沉默效果。LNP的优点包括不整合、可控表达、低免疫原性及重复给药潜力,适合慢性疾病的长期管理。但其在CNS中的递送效率仍受血脑屏障限制^[136]。此外,也有研究尝试将编辑器以RNP形式与功能化材料共同递送,以期降低表达时间和提高安全性,但其效率远不及病毒系统^[142]。

病毒样颗粒(viral-like particles, VLPs)作为一种新兴的非整合递送平台,正在被广泛关注为表观基因组编辑的潜在理想载体。VLPs通常由病毒包膜构成,常见包膜蛋白如VSV-G,但缺乏病毒复制所必需的基因组,因此不具感染性且无法介导基因组整合,其安全性优于传统病毒载体。与AAV等平台相比,VLPs在理论上没有货物大小限制,并且能够以RNP复合物或mRNA的形式进行瞬时表达的递送,从而显著降低表观编辑器持续表达带来的毒性或免疫负担。此外,

VLPs可以通过更换包膜上的糖蛋白实现“假型化”,以赋予其不同的组织或细胞特异性,特别适合用于体内精准药物递送^[143~145]。目前已有研究报道使用VLPs实现Cas9介导的体内基因敲除^[145]、碱基编辑^[143]与引导编辑^[146],这为其进一步拓展至表观遗传编辑奠定基础。然而,目前尚未有明确报道表明VLPs能够成功用于表观编辑器(如dCas9融合蛋白或ZFP, TALE等)的有效递送,这可能归因于多个技术挑战:首先,RNP形式递送的工具在不进行细胞扩增的背景下,往往存在表达时间短、拷贝数低的问题,难以支持持久的表观修饰;其次,虽然mRNA递送可延长表达窗口,但表达出来的CRISPR-Cas9蛋白与gRNA的包装效率低、稳定性差,影响系统整体功能。值得注意的是,ZFP或TALE可能更适用于VLP载体,因其无须额外RNA引导系统,且蛋白体积较小,有助于实现高效封装和功能表达^[147]。VLPs目前已在多种体内模型中用于肝脏、眼部及免疫细胞的靶向,但在中枢神经系统(CNS)中的转导效率仍受限。VSV-G假型的VLPs主要靶向神经胶质细胞,而非神经元,这在一定程度上限制其在CNS中实现神经元特异性表观调控的能力^[146]。此外,VLPs制备的扩展性和批次一致性尚未达到理想状态,其活性颗粒的制备往往需要繁复操作,产量低且再现性差^[143,146]。目前,该领域仍缺乏标准化的VLP制备与表征体系,包括粒径控制、融合素定量、负载包封效率、稳定性及内体逃逸能力的综合评估指标。因此,推动VLPs向表观编辑疗法的有效转化,仍需大力发展标准化的制造流程与递送机制表征体系。尽管存在诸多挑战,VLPs依然被认为是未来极具潜力的表观编辑工具递送平台,特别是在需要非整合、组织可编程、低免疫原性递送的CNS疾病治疗场景中,VLPs可能通过进一步优化成为实现精准、短时表达调控策略的关键组成部分。

总体来说,尽管表观遗传编辑工具在调控靶基因表达方面已实现持久且特异性的调节效果,但其在不同器官中的递送能力决定适应证的选择范围。目前以肝脏、肌肉等为代表的“递送友好”器官为主要应用场景,而神经系统仍待突破。因此,递送系统的工程化改造是推动表观编辑疗法进入临床的关键技术瓶颈。未来的发展方向包括工具本身的小型化设计、组织靶向纳米颗粒的开发、诱导可控系统的构建、可逆调控机制的引入以及多种递送方式的组合应用。递送问题的

解决不仅能扩展表观编辑疗法在多种疾病中的适用范围, 也将在很大程度上决定其从实验室走向临床的进程.

7 总结与展望

表观基因组编辑技术为研究者揭示核心生物学过程、重塑细胞命运提供全新的研究路径. 随着技术不断迭代和验证手段逐步完善, 表观基因组编辑正从基础研究迈向临床应用, 在当前缺乏有效干预手段的疾病中展现出前所未有的治疗潜力, 其长期沉默致病基因的能力使其成为精准医学中极具价值的策略之一. 该技术的应用前景远不限于哺乳动物系统: 在植物中可为作物改良提供革命性工具, 在不引入外源基因的情况下调控农艺性状、提高产量、增强抗逆性, 对满足全球粮食安全需求具有重要意义; 在真菌等微生物

系统中可用于优化次级代谢产物生产、开发生物制药平台, 相比动物系统具有操作简便、成本较低、伦理争议较小等优势. 技术发展主要聚焦两个方向: 一方面开发瞬时可控的表观编辑系统, 通过小分子、光遗传学或超声等手段在时空维度上精确控制编辑器活性, 降低毒副作用; 另一方面针对中枢神经系统等递送难题, 优化穿越血脑屏障的AAV变体、VLP系统等新型载体平台. 此外, 人工智能技术的融入为该领域带来新机遇, 机器学习辅助的表观效应元件筛选与编辑工具设计正成为推动合成表观遗传生物学进步的重要趋势, AI驱动的靶点预测、编辑效率评估及功能结果建模将加速从基础机制研究到临床转化的进程. 因此, 未来发展不仅需要工具与系统本身的创新, 更需要将表观编辑与高效递送技术紧密结合, 通过跨学科协作、智能化设计与应用导向开发, 共同引领表观基因组编辑迈向更安全、高效和可控的新阶段.

参考文献

- Allis C D, Jenuwein T. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat Rev Genet*, 2016, 17: 487–500
- Waddington C H. The strategy of the genes: a discussion of some aspects of theoretical biology. *Med J Aust*, 1958, 1: 493
- Nakamura M, Gao Y, Dominguez A A, et al. CRISPR technologies for precise epigenome editing. *Nat Cell Biol*, 2021, 23: 11–22
- Maeder M L, Angstman J F, Richardson M E, et al. Targeted DNA demethylation and activation of endogenous genes using programmable TALE-TET1 fusion proteins. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 1137–1142
- Groner A C, Meylan S, Ciuffi A, et al. KRAB-zinc finger proteins and KAP1 can mediate long-range transcriptional repression through heterochromatin spreading. *PLoS Genet*, 2010, 6: e1000869
- Perez-Pinera P, Ousterout D G, Gersbach C A. Advances in targeted genome editing. *Curr Opin Chem Biol*, 2012, 16: 268–277
- Gersbach C A, Gaj T, Barbas Iii C F. Synthetic zinc finger proteins: the advent of targeted gene regulation and genome modification technologies. *Acc Chem Res*, 2014, 47: 2309–2318
- Wolfe S A, Neklodova L, Pabo C O. DNA Recognition by Cys₂ His₂ zinc finger proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2000, 29: 183–212
- Pabo C O, Peisach E, Grant R A. Design and selection of novel Cys₂ His₂ zinc finger proteins. *Annu Rev Biochem*, 2001, 70: 313–340
- Kim Y G, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 1156–1160
- Kim J S, Kim J, Ceppek K L, et al. Design of TATA box-binding protein/zinc finger fusions for targeted regulation of gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 3616–3620
- Moscou M J, Bogdanove A J. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 2009, 326: 1501
- Boch J, Scholze H, Schornack S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 2009, 326: 1509–1512
- Reyon D, Tsai S Q, Khayter C, et al. FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nat Biotechnol*, 2012, 30: 460–465
- Joung J K, Sander J D. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14: 49–55
- Zhang F, Cong L, Lodato S, et al. Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription. *Nat Biotechnol*, 2011, 29: 149–153
- Sternberg S H, Redding S, Jinek M, et al. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, 2014, 507: 62–67
- Hsu P D, Lander E S, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 2014, 157: 1262–1278

- 19 Qi L S, Larson M H, Gilbert L A, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. [Cell](#), 2021, 184: 844
- 20 Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. [Science](#), 2012, 337: 816–821
- 21 Gilbert L A, Larson M H, Morsut L, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. [Cell](#), 2013, 154: 442–451
- 22 Maeder M L, Linder S J, Cascio V M, et al. CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. [Nat Methods](#), 2013, 10: 977–979
- 23 Hilton I B, D'Ippolito A M, Vockley C M, et al. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. [Nat Biotechnol](#), 2015, 33: 510–517
- 24 Black J B, McCutcheon S R, Dube S, et al. Master regulators and cofactors of human neuronal cell fate specification identified by CRISPR gene activation screens. [Cell Rep](#), 2020, 33: 108460
- 25 Liu Y, Yu C, Daley T P, et al. CRISPR activation screens systematically identify factors that drive neuronal fate and reprogramming. [Cell Stem Cell](#), 2018, 23: 758–771.e8
- 26 Schmidt R, Steinhart Z, Layeghi M, et al. CRISPR activation and interference screens decode stimulation responses in primary human T cells. [Science](#), 2022, 375: eabj4008
- 27 Qi L S, Larson M H, Gilbert L A, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. [Cell](#), 2013, 152: 1173–1183
- 28 Cheng A W, Wang H, Yang H, et al. Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. [Cell Res](#), 2013, 23: 1163–1171
- 29 Gilbert L A, Horlbeck M A, Adamson B, et al. Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation. [Cell](#), 2014, 159: 647–661
- 30 Liu X S, Wu H, Ji X, et al. Editing DNA methylation in the mammalian genome. [Cell](#), 2016, 167: 233–247.e17
- 31 Huang Y H, Su J, Lei Y, et al. DNA epigenome editing using CRISPR-Cas SunTag-directed DNMT3A. [Genome Biol](#), 2017, 18: 176
- 32 Zhang X, Wang W, Shan L, et al. Correction to: gene activation in human cells using CRISPR/Cpf1-p300 and CRISPR/Cpf1-SunTag systems. [Protein Cell](#), 2019, 10: 776–777
- 33 Wang H, Xu X, Nguyen C M, et al. CRISPR-mediated programmable 3D genome positioning and nuclear organization. [Cell](#), 2018, 175: 1405–1417.e14
- 34 Kubo N, Ishii H, Xiong X, et al. Promoter-proximal CTCF binding promotes distal enhancer-dependent gene activation. [Nat Struct Mol Biol](#), 2021, 28: 152–161
- 35 Xiao B, Yin S, Hu Y, et al. Epigenetic editing by CRISPR/dCas9 in *Plasmodium falciparum*. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2019, 116: 255–260
- 36 Cheng A W, Jillette N, Lee P, et al. Casilio: a versatile CRISPR-Cas9-Pumilio hybrid for gene regulation and genomic labeling. [Cell Res](#), 2016, 26: 254–257
- 37 Omachi K, Miner J H, Varshney G. Comparative analysis of dCas9-VP64 variants and multiplexed guide RNAs mediating CRISPR activation. [PLoS one](#), 2022, 17: e0270008
- 38 Cano-Rodriguez D, Gjaltema R A F, Jilderda L J, et al. Writing of H3K4Me3 overcomes epigenetic silencing in a sustained but context-dependent manner. [Nat Commun](#), 2016, 7: 12284
- 39 Yan J, Chen S A A, Local A, et al. Erratum: histone H3 lysine 4 monomethylation modulates long-range chromatin interactions at enhancers. [Cell Res](#), 2018, 28: 387
- 40 Kim J M, Kim K, Schmidt T, et al. Cooperation between SMYD3 and PC4 drives a distinct transcriptional program in cancer cells. [Nucleic Acids Res](#), 2015, 43: 8868–8883
- 41 Li J, Mahata B, Escobar M, et al. Programmable human histone phosphorylation and gene activation using a CRISPR/Cas9-based chromatin kinase. [Nat Commun](#), 2021, 12: 896
- 42 O'geen H, Bates S L, Carter S S, et al. Ezh2-dCas9 and KRAB-dCas9 enable engineering of epigenetic memory in a context-dependent manner. [Epigenet Chromatin](#), 2019, 12: 26
- 43 Agne M, Blank I, Emhardt A J, et al. Modularized CRISPR/dCas9 effector toolkit for target-specific gene regulation. [ACS Synth Biol](#), 2014, 3: 986–989

- 44 O'Geen H, Ren C, Nicolet C M, et al. dCas9-based epigenome editing suggests acquisition of histone methylation is not sufficient for target gene repression. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45: 9901–9916
- 45 Policarpi C, Munafò M, Tsagkris S, et al. Systematic epigenome editing captures the context-dependent instructive function of chromatin modifications. *Nat Genet*, 2024, 56: 1168–1180
- 46 Yeo N C, Chavez A, Lance-Byrne A, et al. An enhanced CRISPR repressor for targeted mammalian gene regulation. *Nat Methods*, 2018, 15: 611–616
- 47 Black J B, Adler A F, Wang H G, et al. Targeted epigenetic remodeling of endogenous loci by CRISPR/Cas9-based transcriptional activators directly converts fibroblasts to neuronal cells. *Cell Stem Cell*, 2016, 19: 406–414
- 48 Chavez A, Scheiman J, Vora S, et al. Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nat Methods*, 2015, 12: 326–328
- 49 Konermann S, Brigham M D, Trevino A E, et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*, 2015, 517: 583–588
- 50 Vojta A, Dobrinčić P, Tadić V, et al. Repurposing the CRISPR-Cas9 system for targeted DNA methylation. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44: 5615–5628
- 51 Stepper P, Kungulovski G, Jurkowska R Z, et al. Efficient targeted DNA methylation with chimeric dCas9-Dnmt3a-Dnmt3L methyltransferase. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45: 1703–1713
- 52 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
- 53 Lin J C, Fan C T, Liao C C, et al. Taiwan Biobank: making cross-database convergence possible in the Big Data era. *Gigascience*, 2018, 7: 1–9
- 54 Lei Y, Zhang X, Su J, et al. Targeted DNA methylation *in vivo* using an engineered dCas9-MQ1 fusion protein. *Nat Commun*, 2017, 8: 16026
- 55 Choudhury S R, Cui Y, Lubecka K, et al. CRISPR-dCas9 mediated TET1 targeting for selective DNA demethylation at BRCA1 promoter. *Oncotarget*, 2016, 7: 46545–46556
- 56 Huisman C, van der Wijst M G P, Schokker M, et al. Re-expression of selected epigenetically silenced candidate tumor suppressor genes in cervical cancer by TET2-directed demethylation. *Mol Ther*, 2016, 24: 536–547
- 57 Xu X, Tan X, Tampe B, et al. High-fidelity CRISPR/Cas9- based gene-specific hydroxymethylation rescues gene expression and attenuates renal fibrosis. *Nat Commun*, 2018, 9: 3509
- 58 Gregory D J, Zhang Y, Kobzik L, et al. Specific transcriptional enhancement of inducible nitric oxide synthase by targeted promoter demethylation. *Epigenetics*, 2013, 8: 1205–1212
- 59 Morita S, Horii T, Kimura M, et al. Synergistic upregulation of target genes by TET1 and VP64 in the dCas9-SunTag Platform. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 1574
- 60 McLendon R, Friedman A, Bigner D, et al. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*, 2008, 455: 1061–1068
- 61 Taghbalout A, Du M, Jillette N, et al. Enhanced CRISPR-based DNA demethylation by Casilio-ME-mediated RNA-guided coupling of methylcytosine oxidation and DNA repair pathways. *Nat Commun*, 2019, 10: 4296
- 62 Pickar-Oliver A, Black J B, Lewis M M, et al. Targeted transcriptional modulation with type I CRISPR-Cas systems in human cells. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 1493–1501
- 63 Perez-Pinera P, Kocak D D, Vockley C M, et al. RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. *Nat Methods*, 2013, 10: 973–976
- 64 Farzadfard F, Perli S D, Lu T K. Tunable and multifunctional eukaryotic transcription factors based on CRISPR/Cas. *ACS Synth Biol*, 2013, 2: 604–613
- 65 Perez-Pinera P, Ousterout D G, Brunger J M, et al. Synergistic and tunable human gene activation by combinations of synthetic transcription factors. *Nat Methods*, 2013, 10: 239–242
- 66 Tanenbaum M E, Gilbert L A, Qi L S, et al. A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging. *Cell*, 2014, 159: 635–646
- 67 Torres-Perez J V, Irfan J, Febrianto M R, et al. Histone post-translational modifications as potential therapeutic targets for pain management. *Trends Pharmacol Sci*, 2021, 42: 897–911
- 68 Huang H, Lin S, Garcia B A, et al. Quantitative proteomic analysis of histone modifications. *Chem Rev*, 2015, 115: 2376–2418

- 69 Millán-Zambrano G, Burton A, Bannister A J, et al. Histone post-translational modifications—cause and consequence of genome function. *Nat Rev Genet*, 2022, 23: 563–580
- 70 Dominguez A A, Chavez M G, Urke A, et al. CRISPR-mediated synergistic epigenetic and transcriptional control. *CRISPR J*, 2022, 5: 264–275
- 71 Yan J, Chen S A A, Local A, et al. Histone H3 lysine 4 monomethylation modulates long-range chromatin interactions at enhancers. *Cell Res*, 2018, 28: 204–220
- 72 Amabile A, Migliara A, Capasso P, et al. Inheritable silencing of endogenous genes by Hit-and-Run targeted epigenetic editing. *Cell*, 2016, 167: 219–232.e14
- 73 Bintu L, Yong J, Antebi Y E, et al. Dynamics of epigenetic regulation at the single-cell level. *Science*, 2016, 351: 720–724
- 74 Alerasool N, Segal D, Lee H, et al. An efficient KRAB domain for CRISPRi applications in human cells. *Nat Methods*, 2020, 17: 1093–1096
- 75 Chen L F, Lin Y T, Gallegos D A, et al. Enhancer histone acetylation modulates transcriptional bursting dynamics of neuronal activity-inducible genes. *Cell Rep*, 2019, 26: 1174–1188.e5
- 76 Chen R, Shi X, Yao X, et al. Specific multivalent molecules boost CRISPR-mediated transcriptional activation. *Nat Commun*, 2024, 15: 7222
- 77 Zoghbi H Y, Beaudet A L. Epigenetics and human disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2016, 8: a019497
- 78 Liu P, Chen M, Liu Y, et al. CRISPR-based chromatin remodeling of the endogenous Oct4 or Sox2 locus enables reprogramming to pluripotency. *Cell Stem Cell*, 2018, 22: 252–261.e4
- 79 Wei S, Zou Q, Lai S, et al. Conversion of embryonic stem cells into extraembryonic lineages by CRISPR-mediated activators. *Sci Rep*, 2016, 6: 19648
- 80 Kwon J B, Vankara A, Ettayredy A R, et al. Myogenic progenitor cell lineage specification by CRISPR/Cas9-based transcriptional activators. *Stem Cell Rep*, 2020, 14: 755–769
- 81 Böhm S, Splith V, Riedmayr L M, et al. A gene therapy for inherited blindness using dCas9-VPR-mediated transcriptional activation. *Sci Adv*, 2020, 6: eaba5614
- 82 Jones P A, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*, 2001, 293: 1068–1070
- 83 Xu G L, Bestor T H. Cytosine methylation targetted to pre-determined sequences. *Nat Genet*, 1997, 17: 376–378
- 84 Rivenbark A G, Stolzenburg S, Beltran A S, et al. Epigenetic reprogramming of cancer cells via targeted DNA methylation. *Epigenetics*, 2012, 7: 350–360
- 85 Mendenhall E M, Williamson K E, Reyon D, et al. Locus-specific editing of histone modifications at endogenous enhancers. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 1133–1136
- 86 Lo C L, Choudhury S R, Irudayaraj J, et al. Epigenetic editing of *Ascl1* gene in neural stem cells by optogenetics. *Sci Rep*, 2017, 7: 42047
- 87 Cappelluti M A, Mollica Poeta V, Valsoni S, et al. Durable and efficient gene silencing *in vivo* by hit-and-run epigenome editing. *Nature*, 2024, 627: 416–423
- 88 Neumann E N, Bertozzi T M, Wu E, et al. Brainwide silencing of prion protein by AAV-mediated delivery of an engineered compact epigenetic editor. *Science*, 2024, 384: ado7082
- 89 Gregory D J, Mikhaylova L, Fedulov A V. Selective DNA demethylation by fusion of TDG with a sequence-specific DNA-binding domain. *Epigenetics*, 2012, 7: 344–349
- 90 Morita S, Noguchi H, Horii T, et al. Targeted DNA demethylation *in vivo* using dCas9-peptide repeat and scFv-TET1 catalytic domain fusions. *Nat Biotechnol*, 2016, 34: 1060–1065
- 91 Sapozhnikov D M, Szyf M. Unraveling the functional role of DNA demethylation at specific promoters by targeted steric blockage of DNA methyltransferase with CRISPR/dCas9. *Nat Commun*, 2021, 12: 5711
- 92 Carosso G, Yeo R, Gainous B, et al. Discovery and engineering of hypercompact epigenetic modulators for durable gene activation. *bioRxiv*, 2023, 2023: 543492
- 93 Zhang X, Wang W, Shan L, et al. Gene activation in human cells using CRISPR/Cpf1-p300 and CRISPR/Cpf1-SunTag systems. *Protein Cell*, 2018, 9: 380–383
- 94 Huang X, Wang M, Wu X, et al. Screening DNA aptamers that control the DNA cleavage, homology-directed repair, and transcriptional regulation of the CRISPR-(d)Cas9 system. *Mol Ther*, 2023, 31: 260–268
- 95 Kleinjan D A, Wardrope C, Nga Sou S, et al. Drug-tunable multidimensional synthetic gene control using inducible degron-tagged dCas9 effectors. *Nat Commun*, 2017, 8: 1191

- 96 Polstein L R, Gersbach C A. A light-inducible CRISPR-Cas9 system for control of endogenous gene activation. *Nat Chem Biol*, 2015, 11: 198–200
- 97 Kim J H, Rege M, Valeri J, et al. LADL: light-activated dynamic looping for endogenous gene expression control. *Nat Methods*, 2019, 16: 633–639
- 98 Tang H, Han S, Jie Y, et al. Enhanced or reversible RNA N^6 -methyladenosine editing by red/far-red light induction. *Nucleic Acids Res*, 2025, 53: gkaf181
- 99 Nihongaki Y, Furuhashi Y, Otabe T, et al. CRISPR-Cas9-based photoactivatable transcription systems to induce neuronal differentiation. *Nat Methods*, 2017, 14: 963–966
- 100 Xu X, Chemparathy A, Zeng L, et al. Engineered miniature CRISPR-Cas system for mammalian genome regulation and editing. *Mol Cell*, 2021, 81: 4333–4345.e4
- 101 Ma D, Peng S, Huang W, et al. Rational design of mini-Cas9 for transcriptional activation. *ACS Synth Biol*, 2018, 7: 978–985
- 102 Zhang X, Lv S, Luo Z, et al. MiniCAFE, a CRISPR/Cas9-based compact and potent transcriptional activator, elicits gene expression *in vivo*. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49: 4171–4185
- 103 Kannan S, Altae-Tran H, Zhu S, et al. Evolution-guided protein design of IscB for persistent epigenome editing *in vivo*. *Nat Biotechnol*, 2025, doi: 10.1038/s41587-025-02655-3
- 104 Moreno A M, Fu X, Zhu J, et al. *In situ* gene therapy via AAV-CRISPR-Cas9-mediated targeted gene regulation. *Mol Ther*, 2018, 26: 1818–1827
- 105 Vora S, Cheng J, Xiao R, et al. Rational design of a compact CRISPR-Cas9 activator for AAV-mediated delivery. *bioRxiv*, 2018, 2018: 298620
- 106 Wegmann S, DeVos S L, Zeitler B, et al. Persistent repression of tau in the brain using engineered zinc finger protein transcription factors. *Sci Adv*, 2021, 7: eabe1611
- 107 Villiger L, Joung J, Koblan L, et al. CRISPR technologies for genome, epigenome and transcriptome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2024, 25: 464–487
- 108 Modell A E, Lim D, Nguyen T M, et al. CRISPR-based therapeutics: current challenges and future applications. *Trends Pharmacol Sci*, 2022, 43: 151–161
- 109 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
- 110 Webber B R, Lonetree C, Kluesner M G, et al. Highly efficient multiplex human T cell engineering without double-strand breaks using Cas9 base editors. *Nat Commun*, 2019, 10: 5222
- 111 Tsuchida C A, Brandes N, Bueno R, et al. Mitigation of chromosome loss in clinical CRISPR-Cas9-engineered T cells. *Cell*, 2023, 186: 4567–4582.e20
- 112 Qian J, Guan X, Xie B, et al. Multiplex epigenome editing of *MECP2* to rescue Rett syndrome neurons. *Sci Transl Med*, 2023, 15: eadd4666
- 113 Zheng Y, Shen W, Zhang J, et al. CRISPR interference-based specific and efficient gene inactivation in the brain. *Nat Neurosci*, 2018, 21: 447–454
- 114 Jensen T I, Mikkelsen N S, Gao Z, et al. Targeted regulation of transcription in primary cells using CRISPRa and CRISPRi. *Genome Res*, 2021, 31: 2120–2130
- 115 Mukund A X, Tycko J, Allen S J, et al. High-throughput functional characterization of combinations of transcriptional activators and repressors. *Cell Syst*, 2023, 14: 746–763.e5
- 116 Robinson P N, Arteaga-Solis E, Baldock C, et al. The molecular genetics of Marfan syndrome and related disorders. *J Med Genet*, 2006, 43: 769–787
- 117 Ansari I, Chaturvedi A, Chitkara D, et al. CRISPR/Cas mediated epigenome editing for cancer therapy. *Semin Cancer Biol*, 2022, 32: 570–583
- 118 Mirabella A C, Foster B M, Bartke T. Chromatin deregulation in disease. *Chromosoma*, 2016, 125: 75–93
- 119 Wang Y, Wang Y, Patel H, et al. Epigenetic modification of m^6A regulator proteins in cancer. *Mol Cancer*, 2023, 22: 102
- 120 Zeitler B, Froelich S, Marlen K, et al. Allele-selective transcriptional repression of mutant HTT for the treatment of Huntington's disease. *Nat Med*, 2019, 25: 1131–1142
- 121 Han R. Hit-and-run epigenome editing durably lowers cholesterol in mice. *Mol Ther*, 2024, 32: 1190–1191
- 122 Cohen J, DeSimone A, Lek M, et al. Therapeutic approaches in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Trends Mol Med*, 2021, 27: 123–137

- 123 Tadić V, Josipović G, Zoldoš V, et al. CRISPR/Cas9-based epigenome editing: an overview of dCas9-based tools with special emphasis on off-target activity. [Methods](#), 2019, 164-165: 109–119
- 124 Rook M E, Southwell A L. Antisense oligonucleotide therapy: from design to the huntington disease clinic. [BioDrugs](#), 2022, 36: 105–119
- 125 Tremblay F, Xiong Q, Shah S S, et al. A potent epigenetic editor targeting human PCSK9 for durable reduction of low-density lipoprotein cholesterol levels. [Nat Med](#), 2025, 31: 1329–1338
- 126 Laganieri J, Kells A P, Lai J T, et al. An engineered zinc finger protein activator of the endogenous glial cell line-derived neurotrophic factor gene provides functional neuroprotection in a rat model of parkinson's disease. [J Neurosci](#), 2010, 30: 16469–16474
- 127 Konermann S, Brigham M D, Trevino A E, et al. Optical control of mammalian endogenous transcription and epigenetic states. [Nature](#), 2013, 500: 472–476
- 128 Heller E A, Cates H M, Peña C J, et al. Locus-specific epigenetic remodeling controls addiction- and depression-related behaviors. [Nat Neurosci](#), 2014, 17: 1720–1727
- 129 Bustos F J, Ampuero E, Jury N, et al. Epigenetic editing of the *Dlg4/PSD95* gene improves cognition in aged and Alzheimer's disease mice. [Brain](#), 2017, 140: 3252–3268
- 130 Moreno A M, Fu X, Zhu J, et al. *In situ* gene therapy via AAV-CRISPR-Cas9-mediated targeted gene regulation. [Mol Ther](#), 2020, 28: 1931
- 131 Riedmayr L M, Hinrichsmeyer K S, Thalhammer S B, et al. mRNA trans-splicing dual AAV vectors for (epi)genome editing and gene therapy. [Nat Commun](#), 2023, 14: 6578
- 132 Edwards J R, Yarychivska O, Boulard M, et al. DNA methylation and DNA methyltransferases. [EpiGenet Chromatin](#), 2017, 10: 23
- 133 Lanphier E, Urnov F, Haecker S E, et al. Don't edit the human germ line. [Nature](#), 2015, 519: 410–411
- 134 Yin H, Kauffman K J, Anderson D G. Delivery technologies for genome editing. [Nat Rev Drug Discov](#), 2017, 16: 387–399
- 135 van Haasteren J, Li J, Scheideler O J, et al. The delivery challenge: fulfilling the promise of therapeutic genome editing. [Nat Biotechnol](#), 2020, 38: 845–855
- 136 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
- 137 Kempton H R, Goudy L E, Love K S, et al. Multiple input sensing and signal integration using a split Cas12a system. [Mol Cell](#), 2020, 78: 184–191
- 138 Sun H, Fu S, Cui S, et al. Development of a CRISPR-SaCas9 system for projection- and function-specific gene editing in the rat brain. [Sci Adv](#), 2020, 6: eaay6687
- 139 Carosso G A, Yeo R W, Gainous T B, et al. Discovery of hypercompact epigenetic modulators for persistent CRISPR-mediated gene activation. [bioRxiv](#), 2024, 2024: 543492
- 140 Graybuck L T, Daigle T L, Sedeño-Cortés A E, et al. Enhancer viruses for combinatorial cell-subclass-specific labeling. [Neuron](#), 2021, 109: 1449–1464.e13
- 141 O'Donnell C W, Farelli J D, Belaghzal H, et al. Programmable mRNA therapeutics for controlled epigenomic modulation of single and multiplexed gene expression in diverse diseases. [Nat Commun](#), 2025, 16: 2517
- 142 Zhang S, Shen J, Li D, et al. Strategies in the delivery of Cas9 ribonucleoprotein for CRISPR/Cas9 genome editing. [Theranostics](#), 2021, 11: 614–648
- 143 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
- 144 Streibinger D, Frangieh C J, Friedrich M J, et al. Cell type-specific delivery by modular envelope design. [Nat Commun](#), 2023, 14: 5141
- 145 Hamilton J R, Chen E, Perez B S, et al. *In vivo* human T cell engineering with enveloped delivery vehicles. [Nat Biotechnol](#), 2024, 42: 1684–1692
- 146 An M, Raguram A, Du S W, et al. Engineered virus-like particles for transient delivery of prime editor ribonucleoprotein complexes *in vivo*. [Nat Biotechnol](#), 2024, 42: 1526–1537
- 147 Ling S, Yang S, Hu X, et al. Lentiviral delivery of co-packaged Cas9 mRNA and a Vegfa-targeting guide RNA prevents wet age-related macular degeneration in mice. [Nat Biomed Eng](#), 2021, 5: 144–156

Development and application of epigenome editors

SUN YangYang & MA HanHui*

Gene Editing Center, School of Life Science and Technology, ShanghaiTech University, Shanghai 201210, China

** Corresponding author, E-mail: mahh@shanghaitech.edu.cn*

Epigenome editing, a technology that precisely modulates gene expression and function without altering DNA sequences, has emerged as a transformative approach in genetic disease research and therapeutic innovation. This review chronicles the development of epigenome editing tools, from zinc finger proteins and TAL effectors to the highly versatile CRISPR/dCas-based platforms. The current strategies for epigenome editing include DNA methylation, histone modification, and multiple layers of epigenetic modifications. The review further highlights the distinct advantages of epigenome editing over conventional gene therapy, emphasizing its improved safety profile, spatial and temporal tunability, and unique capacity to address multifactorial diseases rooted in epigenetic dysregulation or polygenic complexity. Recent advances in nucleic acid delivery systems, such as engineered viral vectors and lipid nanoparticles, are accelerating the clinical translation of epigenome editing. These tools now enable reversible, locus-specific correction of pathogenic epigenetic states, positioning this technology as the next generation of gene therapy for precision medicine.

epigenome editing, DNA methylation, histone modification, nucleic acid delivery system, gene therapy, precision medicine

doi: [10.1360/SSV-2025-0142](https://doi.org/10.1360/SSV-2025-0142)