

## CRISPR/Cas9 基因编辑技术在疾病治疗中的应用与展望

李仪扬<sup>1§</sup>, 周执政<sup>2§</sup>, 王淑菲<sup>2</sup>, 刘博雅<sup>2</sup>, 刘宇飞<sup>2</sup>, 李孝彦<sup>2</sup>, 隋宏书<sup>3\*</sup>, 刘东巍<sup>2\*</sup>

1. 山东第一医科大学实验动物学院, 济南 250000;
2. 山东第一医科大学临床与基础医学院, 济南 250000;
3. 山东第一医科大学临床与基础医学院组织学与胚胎学系, 济南 250000

**摘要:** 成簇规律间隔短回文重复序列相关蛋白 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR-associated proteins, CRISPR) 系统是原核生物的一种获得性免疫系统, 基于细菌免疫系统 CRISPR 改造发展而来的 CRISPR/Cas9 系统正在改变着生物学和基础医学研究, 是现有基因编辑和基因修饰技术中效率最高、最简便、成本最低的技术之一。然而, 目前缺乏在体内将 CRISPR 系统有效递送到患病细胞的策略, 具有靶标识别功能的非病毒载体可能是未来研究的重点, 疾病发病引起的病理和生理变化有望作为靶向递送或基因编辑靶标的识别因素。概述了现有的基因编辑工具以及 CRISPR/Cas9 系统的优势, 总结了 CRISPR/Cas9 在治疗领域的应用进展, 并讨论了在 CRISPR/Cas9 介导的治疗中所遇到的问题和挑战, 以期能够促进 CRISPR/Cas9 治疗技术的进步, 并为治疗其他复杂疾病提供新的视角。

**关键词:** CRISPR/Cas9; 基因编辑; 基因治疗

**DOI:** 10.19586/j.2095-2341.2024.0148

中图分类号: Q78, R319 文献标志码: A

## Application and Prospect of CRISPR/Cas9 Gene Editing Technology in Disease Treatment

LI Yiyang<sup>1§</sup>, ZHOU Zhizheng<sup>2§</sup>, WANG Shufei<sup>2</sup>, LIU Boya<sup>2</sup>, LIU Yufei<sup>2</sup>, LI Xiaoyan<sup>2</sup>, SUI Hongshu<sup>3\*</sup>, LIU Dongwei<sup>2\*</sup>

1. College of Laboratory Animals, Shandong First Medical University, Jinan 250000, China;
2. College of Clinical and Basic Medicine, Shandong First Medical University, Jinan 250000, China;
3. Department of Histology and Embryology, College of Clinical and Basic Medicine, Shandong First Medical University, Jinan 250000, China

**Abstract:** The clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated proteins (CRISPR) system is an acquired immune system of prokaryotes. The CRISPR/Cas9 system, developed based on the bacterial immune system CRISPR, is changing biology and basic medical research, and is one of the most efficient, simplest and cost-effective gene editing and modification technologies available. However, there is currently a lack of strategies for effectively delivering CRISPR systems to diseased cells in vivo, and non-viral vectors with target recognition capabilities may be the focus of future research, with pathological and physiological changes caused by disease onset promising as identifying factors for targeted delivery or gene editing targets. This article provided an overview of existing gene editing tools and the advantages of the CRISPR/Cas9 system, summarized the application of CRISPR/Cas9 in the field of therapy, and discussed the problems and challenges encountered in CRISPR/Cas9-mediated therapy, in order to promote the advancement of CRISPR/Cas9 therapeutical technology and provide new perspectives for treating

收稿日期: 2024-09-10; 接受日期: 2024-11-01

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81670004); 山东第一医科大学教育教学改革项目 (JXGGYJ-22243253); 山东省研究生优质课程建设项目 (SDYKC21148)。

联系方式: §为本文共同第一作者。李仪扬 E-mail: 2916536631@qq.com; 周执政 E-mail: 15615571667@163.com

\* 通信作者 刘东巍 E-mail: 2435432671@qq.com; 隋宏书 E-mail: hssui@sdfmu.edu.cn

other complex diseases.

**Key words:** CRISPR/Cas9; gene editing; gene therapy

成簇规律间隔短回文重复相关蛋白9(CRISPR)的出现预示着一个新时代的到来<sup>[1]</sup>,它使研究中能够比较容易地在各种细胞和生物体中进行修改、调控或标记基因组位点,基因层面的操作不再是实验的瓶颈,为生物和医学的基础研究带来便利,并可应用于生物技术的各个分支以及人类疾病的治疗。然而,目前人类疾病复杂多样,靶向递送 CRISPR/Cas9 技术用于疾病治疗仍存在许多潜在挑战。综述介绍了 CRISPR/Cas9 的优势,讨论了该系统的研究进展,并总结了所面临的问题与挑战,以期能够推动 CRISPR/Cas9 介导治疗的发展,同时也为治疗其他复杂疾病提供指导。

## 1 基因编辑技术的发展

基因编辑是一种精确修改基因组序列以诱导基因组的插入、缺失或碱基替换的技术<sup>[2]</sup>。由于许多疾病在体内都伴随着基因表达的变化,特别是一些由单个基因突变引起的遗传病,基因编辑技术有望在遗传水平上控制疾病的发生。截止目前,基因编辑技术的发展主要经历了三个阶段:第一阶段基因编辑技术是锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFNs)技术;第二阶段是转录激活因子样效应核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)技术;目前使用最广泛的第三代基因编辑技术是 CRISPR 和 CRISPR/Cas9 技术<sup>[3]</sup>。

在基因编辑中,ZFNs 与蛋白质-蛋白质相互作用并与 DNA 转录调控有关,一对 ZFNs,一个在靶位点下游,一个在靶位点上游,产生了 DNA 双链断裂(double-strand break, DSB)。然而,ZFNs 只能识别 DNA 中的核苷酸三联体,因此限制了位点选择的数量<sup>[4]</sup>。TALENs 主要由转录激活样效应核酸酶和核酸酶两个部分构成。TALENs 利用 TALE 蛋白质的特殊 DNA 结合域与目标基因组结合,并通过 FokI 核酸酶的活性来引发目标 DNA 的切割<sup>[5]</sup>,以激活细胞的 DNA 修复机制,达到对基因组进行精确编辑的目的。TALENs 因其精度和可定制性而被广泛应用于基因组编辑及其相关研究中,但由于其较复杂的设计和构建,以及相对于

CRISPR/Cas9 技术的成本较高,目前在实际应用中的使用相对较少。

CRISPR/Cas9 是一种新型的、有效的基于 RNA 引导的内切酶的基因组编辑技术,它能够改编自然存在的细菌免疫系统。与锌指核酸酶和转录激活因子样效应核酸酶利用蛋白质靶向 DNA 链不同,CRISPR 技术通过改变一小段导向 RNA 的碱基序列来实现基因编辑,将 Cas 蛋白定向到基因组的指定位置,从而提高了基因编辑的效率,扩大了基因编辑技术的适用性。截至 2023 年 9 月 5 日,CRISPR 医学新闻网站(<https://crisprmedicine.com/clinical-trials/>)数据库中涉及 130 个基因组编辑临床试验,其中约 50% 是基于 CRISPR/Cas9 治疗方法的临床试验(图 1)<sup>[6]</sup>。

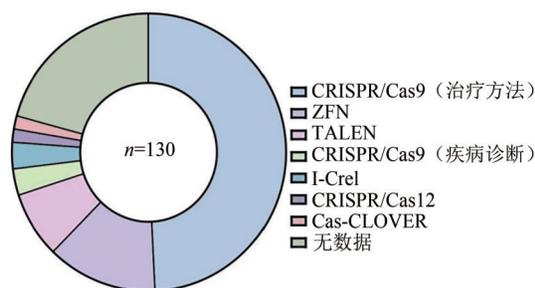


图 1 CRISPR 医学新闻网站上涉及到的基因组编辑临床试验技术分布

Fig. 1 Technology distribution of genome-editing clinical trials covered on the CRISPR medical news website

## 2 CRISPR/Cas9 的临床前研究

通过利用 DSB 细胞中的不同修复机制或将不同功能域融合到 dCas9 核酸酶中,从多个维度调节细胞的生物学行为,包括基因敲入、敲除、干扰、激活、碱基编辑以及靶向传递。这种方法已经在治疗肿瘤、传染病、遗传性疾病以及由伤害引起的疾病等方面显示出巨大潜力。

### 2.1 基因敲入

基因敲入是一种罕见的事件,由于细胞合成期和供体 DNA 不足的限制,导致通过同源重组介导的双链 DNA 修复的 DSB 细胞比例通常不超过 5%。

CRISPR/KI技术的最新进展已经实现了更精确可控的敲入过程,从而成功应用于细胞模型、类器官模型以及动物模型<sup>[7]</sup>。随着敲入过程越来越受控制,CRISPR/KI技术已逐渐应用于具有明确突变的单基因遗传病,如囊性纤维化、家族性高胆固醇血症以及镰状细胞病,并取得了良好的治疗效果。

## 2.2 基因敲除

CRISPR-基因敲除系统为非同源性末端接合修复诱导的移码突变精确敲除特定基因提供了方便,该技术已被广泛应用于研究各种肿瘤疾病、传染病、遗传性疾病的基因功能。

**2.2.1 肿瘤疾病** 肿瘤疾病因其发病隐匿、发展迅速、预后差而成为最致命的疾病。然而,即使是同一肿瘤类型的生物学表现也可能完全不同,这表明肿瘤的发展和行为受到多个基因的共同调控。因此,多种调控策略被用于靶向不同的基因,包括致癌基因、药物抗性基因以及与肿瘤转移相关的基因,为肿瘤治疗的研究提供支持。

肿瘤的发生通常与癌基因的过度表达和抑癌基因功能的减弱有关。因此,靶向致癌基因和肿瘤抑制基因是一种很有前途的癌症治疗方法。例如,Koo等<sup>[8]</sup>通过CRISPR技术在肺癌中成功敲除了包括编码表皮生长因子受体、局灶黏着激酶以及连环蛋白2等在内的多个癌基因,这在非小细胞肺癌细胞系中显著抑制了肿瘤生长并延长了存活时间。此外,考虑到肿瘤的异质性对治疗的挑战,研究人员还利用CRISPR技术在造血干细胞中同时敲除多个与急性髓性白血病相关的肿瘤抑制基因,建立了一个能够模拟患者肿瘤进展和耐药性的模型<sup>[9]</sup>,为开发有效的治疗策略提供了重要工具。

耐药性是癌症治疗中一个重大的挑战,需要采取创新策略来克服。Heyza等<sup>[10]</sup>通过CRISPR/Cas9技术在耐药的肺非小细胞肺癌细胞系中敲除了*RSF1*、*ERCC1*、*NRF2*和*Aurora B*等基因,发现这些耐药细胞对化疗药物(如紫杉醇、顺铂和卡铂)的敏感性得到恢复,表明这些基因可能是恢复化疗效果的潜在靶点。此外,利用CRISPR筛选技术还鉴定出磷酸甘油酸脱氢酶基因可能与肝细胞癌对索拉非尼的耐药性有关。以上这些发现展示了CRISPR/Cas9技术在识别耐药基因和开发新治疗策略方面的潜力,比如联合使用增敏剂和化疗药物,或避免对耐药肿瘤使用特定抗肿瘤药

物。结合CRISPR筛选和转录组测序的方法有助于在基因组中筛选有效靶点,为癌症治疗策略的开发提供了有力工具。

转移相关基因在肿瘤转移潜力的形成中扮演着核心角色。小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)以其早期转移的特性而著称,目前缺乏有效的治疗手段。CRISPR筛选技术的最新发现揭示了*Cullin5* (*Cul5*)基因的缺失可能通过减少细胞因子信号复合物的形成和提高整合素 $\beta 1$ 蛋白的水平来促进SCLC的转移<sup>[11]</sup>。此外,达沙替尼被发现能够抑制*Cul5*突变SCLC的转移能力,这标志着它可能成为针对*Cul5*突变SCLC患者的首个靶向治疗药物。这一发现为筛选针对特定基因突变肿瘤的靶向药物提供了一种新的方法。同时,脂肪酸结合蛋白4 (fatty acid binding protein 4, FABP4)作为脂肪代谢的关键调节因子,参与了组织间脂质的交流<sup>[12]</sup>,对于SCLC和未分化甲状腺癌等高度恶性肿瘤,早期未被发现的远处转移是导致疾病难以控制的关键因素。抑制这些转移基因的活性有望成为治疗策略的一部分,有助于延缓这些高度恶性肿瘤的转移进程,从而为患者争取更长的生存期或实现治愈。

**2.2.2 传染病** 使用CRISPR/Cas系统的基因敲除被用于开发治疗传染病的抗病毒疗法,其治疗效果可以通过改变对病毒生命周期重要的宿主基因或靶向复制所需的病毒基因来实现。

目前,已开发的几种HIV治疗方法都是基于基因组编辑技术。CRISPR/Cas9已被用于体外和体内HIV感染小鼠模型中诱导人类细胞的位点特异性基因组修饰<sup>[13]</sup>,许多实验室已经使用CRISPR/Cas9成功地进行了CD4<sup>+</sup>T细胞趋化因子C-C-Motif受体5 (chemokine C-C-Motif receptor 5, CCR5)敲除。这些基因敲除细胞在转化后仍保持正常的免疫功能,但对HIV的抵抗力显著增强,提示具有治疗艾滋病的潜力<sup>[14]</sup>。在造血干细胞群体和CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞群体中,编辑CCR5是一种很有前途的产生抗HIV细胞的策略,然而这种方法对嗜C-X-C趋化因子受体4型(CX-C chemokine receptor type 4, CXCR4)的HIV毒株无效。已有研究表明,CRISPR/Cas9可以高精度、高效率地编辑编码CXCR4的基因,敲除HIV共受体CXCR4伴随着轻微的脱靶效应,并提供对嗜CXCR4的HIV毒株引起的HIV感染的抗性<sup>[15]</sup>。同时,敲除HIV共受体5

(CCR5)和CXCR4,使得修饰后的细胞即使使用双热带病毒也能抵抗R5和X4热带病毒的感染。与此同时,在各种细胞系中使用CRISPR/Cas9技术对抗HIV感染,不仅可以抑制受感染T细胞和小胶质细胞中的HIV基因表达,还可以从许多其他细胞系中去除HIV前病毒DNA,包括代表HIV感染潜伏库的神经元祖细胞。因此,在慢性HIV感染人源化模型中,从动物的脾脏、肺、心脏、结肠和大脑中可消除HIV前病毒DNA。

2017年,CRISPR/Cas9系统被用于去除慢性感染细胞中染色体整合和外源性定位为cccDNA的乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)DNA全长片段,这种方法可以在体外稳定的感染细胞系中完全根除HBV。这表明CRISPR/Cas9系统是根除慢性HBV感染和完全治愈HBV的潜在强大工具<sup>[16]</sup>。此外,CRISPR/Cas9系统在体外实验中已成功用于抑制单纯疱疹病毒的感染;并能在11天内使爱泼斯坦-巴尔病毒和巨细胞病毒DNA减少高达95%。研究还证实,CRISPR/Cas9系统具备在体外消除其他病毒,包括约翰·坎宁安病毒以及人乳头瘤病毒HPV-16和HPV-18的能力<sup>[17]</sup>。

**2.2.3 遗传性疾病** 血友病是一种全球性的X连锁遗传性疾病,其中凝血因子Ⅷ(与血友病A相关)和凝血因子Ⅸ(与血友病B相关)被广泛关注。科学家们利用CRISPR/Cas9基因编辑技术对因子Ⅷ基因进行编辑,成功矫正了血友病A患者的诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)。这种矫正是通过修复染色体倒位导致的缺陷,该倒位涉及因子Ⅷ基因的两个内含子<sup>[18]</sup>(内含子1和22)。这一成果不仅恢复了染色体片段至野生型状态,也为潜在的治疗提供了新的机遇。在另一项研究中,研究人员使用CRISPR/Cas9基因编辑系统对因子Ⅸ基因进行编辑,成功纠正了小鼠的凝血障碍。通过构建敲除因子Ⅸ基因的小鼠模型,实现了在新生小鼠及成年小鼠中终身凝血功能的矫正<sup>[19]</sup>。

遗传性酪氨酸血症(hereditary tyrosinemia, HT)是一种由常染色体隐性遗传方式引起的疾病,其特征是*Fah*基因发生突变,导致富马酰乙酸水解酶活性缺失<sup>[20]</sup>。HT I型(type I hereditary tyrosinemia, HT I)患者会由于毒素积累而遭受严重的肝脏损害,包括肝硬化、肝功能衰竭以及肝

癌等并发症。

利用CRISPR技术来治疗HT,是最早展示在成年哺乳动物体内递送CRISPR/Cas9系统组分的研究之一。在这项开创性的研究中,通过流体动力学注射方式,将Cas9核酸酶、特定的sgRNA以及供体寡核苷酸送入体内<sup>[21]</sup>,成功修复了*Fah*基因中的致病性突变,这标志着基因治疗领域迈出了重要的一步。VanLith等<sup>[22]</sup>也在HT I小鼠模型中应用CRISPR/Cas9技术,实现了对代谢性肝病的肝细胞定向*Fah*基因修复<sup>[22]</sup>。

在HTI小鼠模型中,基于CRISPR/Cas9的*Fah*基因校正策略,不仅显示了体质量的稳定<sup>[23]</sup>,还对预防小鼠肝硬化具有显著效果。这些发现为遗传性酪氨酸血症的治疗带来了新的希望,并展示出CRISPR/Cas9技术在遗传性疾病治疗中的潜力。

### 2.3 基因干扰

dCas9核酸酶是一种突变的Cas9蛋白,它丧失了核酸酶活性,但仍然可以与导向RNA结合并定位到特定的基因序列。利用这一特性,研究人员将dCas9与多种转录抑制因子,例如甲基转移酶和组蛋白去乙酰化酶等融合在一起,以调控目标基因的表达,这种方法被称为CRISPR干扰(CRISPR interference, CRISPRi)<sup>[24]</sup>。

**2.3.1 RNA干扰和CRISPRi** RNA干扰是一种常用的抑制基因表达工具,但它存在不完整、短暂性和低特异性等局限性,并且在单个细胞中通常只能调控一个基因。因此,RNAi的应用受到了极大的限制<sup>[25]</sup>。CRISPRi的出现扭转了这一限制。在CRISPRi系统中,多个sgRNA可同时调控一个基因或不同基因,抑制效果增强,目的复杂<sup>[26]</sup>。这些特点为研究人员提供了多种选择,以实现不同的目的。

**2.3.2 甲基化抑制** DNA甲基转移酶3A(DNMT3A)诱导的启动子甲基化是一种完善的人类表观遗传途径<sup>[27]</sup>。Vojta等<sup>[28]</sup>成功地将dCas9-DNMT3A应用于HEK293细胞中,抑制了两个基因的mRNA转录和蛋白表达,证明了dCas9-DNMT3A作为基因调控工具在抑制靶基因的同时可以保持基因组完整性的有效性<sup>[29]</sup>。Desmoplakin(DSP)已被确定为特发性肺纤维化的潜在危险因素,原因在于其高水平表达和甲基化减少。为了解决这个问题,Qu等<sup>[30]</sup>利用dCas9-DNMT3A重建了DSP的甲基化体系,从而逆转了其异常表达,并改善了肺部

形态表现。

还有研究表明,dCas9-DNMT3A可能通过下调人类端粒酶逆转录酶和运动蛋白的SWI1A/snf相关<sup>[31]</sup>、基质相关、动作蛋白依赖的染色质亚家族a成员2在黑色素瘤细胞和肺腺癌中抑制肿瘤相关行为<sup>[32]</sup>。这些发现显示出dCas9-DNMT3A作为多种细胞类型抑制工具的多功能性,并提示其在探索疾病发病机制和识别潜在药物靶点以改善患者预后方面的潜力。

## 2.4 基因激活

CRISPR 激活 (CRISPRa) 由具有不同转录激活功能域的 dCas9 介导,如 VP64、协同激活介质 SunTag 等<sup>[33]</sup>。当 dCas9 与靶基因结合时,募集的 RNA 聚合酶以促进转录的方式增强靶基因的表达。

dCas9-VP64 作为第一代 CRISPRa,使用最广泛,但是它的激活作用不大。Saayman 等<sup>[34]</sup>通过激活长末端重复序列来维持 HIV 的恒定激活状态,证明 CRISPRa 在 HIV 功能性治愈策略中的潜力。为了改善心肌梗死后心功能的不可逆下降,使用 dCas9-VP64 在心球源性细胞 (cardiac bulbous cells, cdc) 中激活一系列心脏相关分化因子,这导致了活化的 cdc 产生,这些 cdc 表现出心肌细胞特征,并显著改善了心肌梗死患者的射血分数和心肌缺血<sup>[35]</sup>。

CRISPR/Cas9 的临床前应用还包括靶向递送、基因活化与基础编辑等,多种实验结果均突出了基于 Cas9 的激活系统在各种疾病治疗应用中的潜力。

## 3 CRISPR/Cas9 的临床应用

### 3.1 临床疗法

经过数年的临床前研究,CRISPR/Cas9 疗法终于进入临床试验阶段。与 ZFN、TALENs、AAV 和 RNAi 等其他基因编辑技术相比,CRISPR/Cas9 系统具有更高的特异性、可及性和可控性,是一种很有前景的基因治疗候选工具。

我国首次在转移性非小细胞肺癌患者中使用 CRISPR/Cas9 技术进行的体外临床试验<sup>[36]</sup>,该研究利用 sgRNA 和 Cas9 质粒的电穿孔技术靶向患者外周血 T 细胞中的 *PD-1* 基因,并将其注入患者体内,结果发现所有接受注射的患者外周血中存

在编辑过的 T 细胞<sup>[37]</sup>。然而尽管这种方法是可行和安全的,仍需要更先进的基因编辑技术来提高治疗效果。

2019 年,一项体内临床试验 (NCT03872479) 基于 CRISPR/Cas9 基因治疗的药物 AGN151587 通过视网膜下注射直接进入眼睛,治疗由 CEP290.185 基因突变引起的罕见失明疾病 Leber's congenital amaurosis 10 (LCA10),该试验是首次将 CRISPR/Cas9 基因编辑疗法直接应用于人体。目前,大约有 19 项关于 CRISPR/Cas9 介导的基因编辑技术的注册介入临床试验。

### 3.2 疾病诊断

CRISPR/Cas9 系统的特异性为疾病诊断提供了新的可能性,因此引起了疾病诊断领域研究人员的极大兴趣。

2016 年 ZIKV 全球传播期间,首次应用 CRISPR/Cas9 系统进行检测。Pardee 等<sup>[38]</sup>结合了等温 RNA 扩增技术和 CRISPR/Cas9 系统,利用等温 RNA 扩增技术来复制病毒的遗传物质,然后通过设计一种基于支点开关的 RNA 传感器,能够区分美国寨卡病毒和非洲寨卡病毒,以及其他相似的病原体,如登革热病毒。为了实现这一目标,研究人员特别设计了一种 sgRNA,它能够与美国寨卡病毒的特定突变区域精确匹配,而与非洲寨卡病毒的相应区域存在一个碱基对的差异。通过使用基于支点开关的 RNA 传感器,证明了即使在病毒浓度较低的情况下,CRISPR/Cas9 系统也能够 3 h 内有效切割美国寨卡病毒的扩增产物,从而实现两种病毒的快速区分<sup>[38]</sup>。这项研究不仅展示了 CRISPR/Cas9 系统在精确序列检测和疾病诊断方面的潜力,而且强调了其在应对全球健康危机中的重要作用。通过这种创新的诊断方法,CRISPR/Cas9 技术为快速识别和控制传染病提供了一种有力的工具。

检测 DNA 甲基化通常是一个技术要求高且费时的流程,它依赖于专业的设备和特定的化学试剂。然而,一种新兴技术通过使用亚硫酸盐处理将未甲基化的胞嘧啶转变为尿嘧啶,结合 CRISPR/Cas9 系统和切口内切酶来识别并切割特定的 DNA 片段,从而作为扩增的引物。这种方法以其便捷性和成本效益,已经成功证明了其在单碱基对水平上准确区分甲基化状态的能力<sup>[39]</sup>。这些研究成果对于深入理解表观遗传学修饰,以及

它们在疾病诊断和治疗中的应用具有深远的意义。通过简化和优化甲基化检测流程,这种创新技术为表观遗传学研究和临床实践开辟了新的可能性。

#### 4 CRISPR/Cas9在临床医学中的挑战

尽管已在全球范围内广泛开展临床前研究和临床试验,但CRISPR/Cas9介导的基因校正临床转化仍与不可预测的结果相关影响紧密相连<sup>[40]</sup>。影响CRISPR/Cas9介导人类基因编辑成功率的因素包括脱靶效应和货物递送方式等。研究发现,脱靶效应主要由sgRNA引导,因此合理设计sgRNA是保证CRISPR/Cas9基因编辑技术效率的必要条件<sup>[41]</sup>。脱靶效应受细胞类型、表达水平、转染方式等多种因素的影响。使用主流递送载体,如慢病毒和AAV,存在一些挑战,包括潜在的免疫原性、低负载能力、靶向性不足、屏障通过能力有限以及实体肿瘤的有限可及性<sup>[42]</sup>。因此,目前体内CRISPR/Cas9治疗仅限于血液系统疾病,临床CRISPR/Cas9治疗依赖于内源性细胞,如T细胞和HSPCs<sup>[43]</sup>。开发一种安全、高效、靶向的载体对于CRISPR/Cas9体内治疗的广泛应用至关重要。近年来,CRISPR相关载体如脂质体、纳米脂质、纳米聚合物等研究进展迅速<sup>[44]</sup>。理论上这些先进的纳米材料可以克服上述挑战,促进CRISPR/Cas9治疗的快速发展。

CRISPR/Cas9系统在理论上具备靶向基因组中任意位置的能力,但实际上其靶向能力受限于PAM序列的存在,这限制了Cas9酶对某些基因位点的访问。特别是在使用碱基编辑工具时,如胞嘧啶碱基编辑器(cytosine base editor, CBEs)或腺嘌呤碱基编辑器(adenosine base editor, ABEs),目标碱基通常需要位于PAM位点的特定相对位置。如果目标位点附近没有合适的PAM序列,CBEs或ABEs可能无法执行碱基编辑。为了克服这一限制,研究人员一直在努力改造Cas9酶,使其不再局限于PAM序列的限制。目前已经成功开发出多种Cas9变体,这些变体能够通过突变Cas9蛋白的特定氨基酸位点或添加修饰的结构域来识别更广泛的序列,例如NNG序列,从而扩展了Cas9的靶向范围。这些创新为基因编辑技术提供了更大的灵活性和精确性,使得研究人员能够更有效

地靶向和编辑基因组中的特定区域。

#### 5 展望

随着基因组编辑技术的进步,利用CRISPR/Cas9治疗与人类疾病相关的基因组编辑研究正在迅速发展<sup>[47]</sup>。在临床前研究中,基于CRISPR的敲入、敲除、激活和干扰等工具已经被开发出来,并被证明在各种疾病中具有广泛的应用和强大的治疗效果。CRISPR/Cas9治疗已经进行了临床试验,体内疗法成功应用于NSCLC、r/r ALL等癌症,以及ATTR、SCD等遗传性疾病,显示出良好的效果。此外,CRISPR/Cas9疾病诊断工具正在多个领域得到应用,这些成果为CRISPR疗法的未来临床应用提供了信心。

尽管CRISPR/Cas9技术仍处于发展的初级阶段,但其在治疗生命垂危的重症患者方面展现出了巨大的潜力。目前,大多数相关的临床试验还处于早期阶段,即I/II期,主要焦点于评估人类基因组编辑的安全性与有效性,以优化和改进基因编辑过程中涉及的分子机制。因此,CRISPR/Cas9技术在治疗致命性人类疾病方面提供了希望,有望为更多患者带来治愈的曙光。

#### 参 考 文 献

- [1] CHAKRABORTY C, TEOH S L, DAS S. The smart programmable CRISPR technology: a next generation genome editing tool for investigators[J]. *Curr. Drug Targets*, 2017, 18(14): 1653-1663.
- [2] MANGHWAR H, LINDSEY K, ZHANG X, *et al.* CRISPR/Cas system: recent advances and future prospects for genome editing[J]. *Trends Plant Sci.*, 2019, 24(12): 1102-1125.
- [3] GAJ T, GERSBACH C A, BARBAS C F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering[J]. *Trends Biotechnol.*, 2013, 31(7): 397-405.
- [4] DOYON Y, VO T D, MENDEL M C, *et al.* Enhancing zinc-finger-nuclease activity with improved obligate heterodimeric architectures[J]. *Nat. Meth.*, 2011, 8: 74-79.
- [5] CHRISTIAN M, CERMAK T, DOYLE E L, *et al.* Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases[J]. *Genetics*, 2010, 186(2): 757-761.
- [6] TYUMENTSEVA M, TYUMENTSEV A, AKIMKIN V. CRISPR/Cas9 landscape: current state and future perspectives[J/OL]. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, 24(22): 16077[2024-12-30]. <https://doi.org/10.3390/ijms242216077>.
- [7] BANAN M. Recent advances in CRISPR/Cas9-mediated knock-ins in mammalian cells[J]. *J. Biotechnol.*, 2020, 308: 1-9.
- [8] KOO T, YOON A R, CHO H Y, *et al.* Selective disruption of an oncogenic mutant allele by CRISPR/Cas9 induces efficient

- tumor regression[J]. *Nucleic Acids Res.*, 2017, 45(13): 7897-7908.
- [9] HECKL D, KOWALCZYK M S, YUDOVICH D, *et al.*. Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing[J]. *Nat. Biotechnol.*, 2014, 32: 941-946.
- [10] HEYZA J R, LEI W, WATZA D, *et al.*. Identification and characterization of synthetic viability with ERCC1 deficiency in response to interstrand crosslinks in lung cancer[J]. *Clin. Cancer Res.*, 2019, 25(8): 2523-2536.
- [11] MUKHERJEE A, CHIANG C Y, DAIFOTIS H A, *et al.*. Adipocyte-induced FABP4 expression in ovarian cancer cells promotes metastasis and mediates carboplatin resistance[J]. *Cancer Res.*, 2020, 80(8): 1748-1761.
- [12] LUIS G, GODFROID A, NISHIUMI S, *et al.*. Tumor resistance to ferroptosis driven by stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1) in cancer cells and fatty acid binding protein-4 (FABP4) in tumor microenvironment promote tumor recurrence[J/OL]. *Redox Biol.*, 2021, 43: 102006[2024-12-30]. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102006>.
- [13] KOUJAH L, SHUKLA D, NAQVI A R. CRISPR-Cas based targeting of host and viral genes as an antiviral strategy[J]. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2019, 96: 53-64.
- [14] YIN L, HU S, MEI S, *et al.*. CRISPR/Cas9 inhibits multiple steps of HIV-1 infection[J]. *Hum. Gene Ther.*, 2018, 29(11): 1264-1276.
- [15] LIU S, WANG Q K, YU X, *et al.*. HIV-1 inhibition in cells with CXCR4 mutant genome created by CRISPR-Cas9 and piggyBac recombinant technologies[J/OL]. *Sci. Rep.*, 2018, 8: 8573[2024-12-30]. <https://doi.org/10.1038/S41598-018-26894-4>.
- [16] SCOTT T, MOYO B, NICHOLSON S, *et al.*. ssAAVs containing cassettes encoding SaCas9 and guides targeting hepatitis B virus inactivate replication of the virus in cultured cells[J/OL]. *Sci. Rep.*, 2017, 7: 7401[2024-12-30]. <https://doi.org/10.1038/S41598-017-07642-6>.
- [17] WOLLEBO H S, BELLIZZI A, KAMINSKI R, *et al.*. CRISPR/Cas9 system as an agent for eliminating polyomavirus JC infection[J/OL]. *PLoS ONE*, 2015, 10(9): e0136046[2024-12-30]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136046>.
- [18] PARK C Y, KIM D H, SON J S, *et al.*. Functional correction of large factor VIII gene chromosomal inversions in hemophilia A patient-derived iPSCs using CRISPR-Cas9[J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 17(2): 213-220.
- [19] WANG L L, YANG Y, BRETON C A, *et al.*. CRISPR/Cas9-mediated *in vivo* gene targeting corrects hemostasis in newborn and adult factor IX-knockout mice[J]. *Blood*, 2019, 133(26): 2745-2752.
- [20] MORROW G, TANGUAY R M. Biochemical and clinical aspects of hereditary tyrosinemia type 1[J]. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2017, 959: 9-21.
- [21] YIN H, XUE W, CHEN S D, *et al.*. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype[J]. *Nat. Biotechnol.*, 2014, 32: 551-553.
- [22] VANLITH C, GUTHMAN R, NICOLAS C T, *et al.*. Curative *ex vivo* hepatocyte-directed gene editing in a mouse model of hereditary tyrosinemia type 1[J]. *Hum. Gene Ther.*, 2018, 29(11): 1315-1326.
- [23] SHAO Y J, WANG L R, GUO N N, *et al.*. Cas9-nickase-mediated genome editing corrects hereditary tyrosinemia in rats[J]. *J. Biol. Chem.*, 2018, 293(18): 6883-6892.
- [24] ALERASOOL N, SEGAL D, LEE H S, *et al.*. An efficient KRAB domain for CRISPRi applications in human cells[J]. *Nat. Meth.*, 2020, 17: 1093-1096.
- [25] DOMINGUEZ A A, LIM W A, QI L S. Beyond editing: repurposing CRISPR-Cas9 for precision genome regulation and interrogation[J]. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2016, 17: 5-15.
- [26] 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[J]. *Cell*, 2013, 152(5): 1173-1183.
- [27] ZHANG Z M, LU R, WANG P C, *et al.*. Structural basis for DNMT3A-mediated *de novo* DNA methylation[J]. *Nature*, 2018, 554: 387-391.
- [28] VOJTA A, DOBRINIĆ P, TADIĆ V, *et al.*. Repurposing the CRISPR-Cas9 system for targeted DNA methylation[J]. *Nucleic Acids Res.*, 2016, 44(12): 615-628.
- [29] VOJTA A, DOBRINIĆ P, TADIĆ V, *et al.*. Repurposing the CRISPR-Cas9 system for targeted DNA methylation[J]. *Nucleic Acids Res.*, 2016, 44(12): 5615-5628.
- [30] QU J, ZHU L, ZHOU Z, *et al.*. Reversing mechanoinductive DSP expression by CRISPR/dCas9-mediated epigenome editing[J]. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2018, 198(5): 599-609.
- [31] RAD F T, GARGARI B N, GHORBANIAN S, *et al.*. Inhibiting the growth of melanoma cells *via* hTERT gene editing using CRISPR-dCas9-dnmt3a system[J/OL]. *Gene*, 2022, 828: 146477[2025-01-10]. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146477>.
- [32] WU J X, HE K S, ZHANG Y J, *et al.*. Inactivation of SMARCA2 by promoter hypermethylation drives lung cancer development[J]. *Gene*, 2019, 687: 193-199.
- [33] DAS S, BANO S, KAPSE P, *et al.*. CRISPR based therapeutics: a new paradigm in cancer precision medicine[J/OL]. *Mol. Cancer*, 2022, 21(1): 85[2024-12-30]. <https://doi.org/10.1186/S12943-022-01552-6>.
- [34] SAAYMAN S M, LAZAR D, SCOTT T, *et al.*. Potent and targeted activation of latent HIV-1 using the CRISPR/dCas9 activator complex[J]. *Mol. Ther.*, 2016, 4(3): 488-498.
- [35] SANO T, ITO T, ISHIGAMI S, *et al.*. Intrinsic activation of cardiomyocyte-derived cells enhances myocardial repair[J]. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 2022, 163(4): 1479-1490.
- [36] CYRANOSKI D. CRISPR gene-editing tested in a person for the first time[J]. *Nature*, 2016, 539(7630): 479.
- [37] LU Y, XUE J X, DENG T, *et al.*. Safety and feasibility of CRISPR-edited T cells in patients with refractory non-small-cell lung cancer[J]. *Nat. Med.*, 2020, 26: 732-740.
- [38] PARDEE K, GREEN A A, TAKAHASHI M K, *et al.*. Rapid, low-cost detection of Zika virus using programmable biomolecular components[J]. *Cell*, 2016, 165(5): 1255-1266.
- [39] HUANG M Q, ZHOU X M, WANG H Y, *et al.*. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9 triggered isothermal amplification for site-specific nucleic acid detection[J]. *Anal. Chem.*, 2018, 90(3): 2193-2200.
- [40] TEBOUL L, HERAULT Y, WELLS S, *et al.*. Variability in ge-

- nome editing outcomes: challenges for research reproducibility and clinical safety[J]. *Mol. Ther.*, 2020, 28(6): 1422-1431.
- [41] WANG X L, WANG Y B, WU X W, *et al.*. Unbiased detection of off-target cleavage by CRISPR-Cas9 and TALENs using integrase-defective lentiviral vectors[J]. *Nat. Biotechnol.*, 2015, 33: 175-178.
- [42] CHEW W L, TABEBORDBAR M, CHENG J K W, *et al.*. A multifunctional AAV-CRISPR-Cas9 and its host response[J]. *Nat. Meth.*, 2016, 13: 868-874.
- [43] LI H Y, YANG Y, HONG W Q, *et al.*. Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects[J/OL]. *Signal Transduct. Target. Ther.*, 2020, 5: 1[2024-12-30]. <https://doi.org/10.1038/S41339-019-0089-y>.
- [44] BERARDO C, SICILIANO V, DI PASQUA LG, *et al.*. Comparison between lipofectamine RNAiMAX and GenMute transfection agents in two cellular models of human hepatoma[J/OL]. *Eur. J. Histochem.*, 2019, 63(3): 3048[2024-12-30]. <https://doi.org/10.4081/ejh.2019.3048>.
- [45] COLLIAS D, BEISEL C L. CRISPR technologies and the search for the PAM-free nuclease[J/OL]. *Nat. Commun.*, 2021, 12: 555[2024-12-30]. <https://doi.org/10.1038/S41467-020-20633-y>.
- [46] ANDERS C, NIEWOEHNER O, DUERST A, *et al.*. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease[J]. *Nature*, 2014, 513: 569-573.
- [47] 权春菊, 郑忠亮. CRISPR/Cas 及其衍生编辑技术在基因治疗中的应用进展[J]. *生物技术进展*, 2021, 11(4): 518-525.
- QUAN C J, ZHENG Z L. Application progress of CRISPR/Cas and its derivative editing technology in gene therapy[J]. *Curr. Biotechnol.*, 2021, 11(4): 518-525.