



CRISPR/Cas9系统纳米递送及其在肿瘤治疗中应用*

乔欢欢 张晴皓 明 东**

(天津大学医学工程与转化医学研究院, 天津 300072)

摘要 新兴的CRISPR/Cas9基因编辑技术可实现在分子水平上对基因进行操作, 具有设计简单、易于操作、特异性好、效率高等优点, 广泛应用于肿瘤发生、发展和转移的潜在机制以及临床治疗的研究. 利用纳米技术研发的非病毒纳米载体可以将CRISPR/Cas9系统高效递送到体内, 为CRISPR/Cas9技术在临床领域的应用提供新途径. 本文介绍CRISPR/Cas9的作用原理, 简要概括目前CRISPR/Cas9系统的递送形式和常用的纳米递送载体, 总结在部分肿瘤治疗中应用该技术的研究进展, 并进一步对此进行展望.

关键词 CRISPR/Cas9, 基因编辑, 纳米载体, 肿瘤治疗

中图分类号 Q789, Q819

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0239

恶性肿瘤严重威胁着人类的健康, 其发病率迅速增长. 在2007~2017年期间, 有123个国家的癌症平均年龄标化发病率有所增加, 中国是发病率增幅最大的国家之一, 年均增长超过2%^[1]. 恶性肿瘤中存在多种基因变异, 参与致癌基因激活和抑癌基因失活的过程^[2]. CRISPR/Cas9是一种功能强大的基因组编辑工具, 具有特异性强、效率高等特点, 被广泛用于研究不同类型肿瘤的发生、发展和转移的潜在机制以及临床治疗, 为特定疾病的基因治疗提供了方便. CRISPR/Cas9系统已经越来越多地应用于肿瘤治疗研究, 在基因水平的肿瘤治疗方面具有广阔的前景. 将CRISPR/Cas9系统递送至靶器官或细胞需要安全有效的递送系统. 尽管病毒载体广泛用于高效递送CRISPR/Cas9系统, 但是高浓度时具有潜在毒性等缺点限制了其应用^[3]. 随着非病毒载体的快速发展, 基于脂质、聚合物、无机纳米材料的非病毒纳米载体已经显现出巨大的应用潜力, 为CRISPR/Cas9系统的递送提供了更多的可能.

1 CRISPR/Cas9系统的原理

CRISPR 是成簇的规律间隔短回文重复序列

(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 的简称. 根据Cas蛋白的不同, CRISPR/Cas系统分为I、II、III型, Cas9属于II型CRISPR系统. Cas9核酸酶包括HNH和RuvC两个保守的核酸酶结构域, 在crRNA和tracrRNA的共同引导下, 可对DNA双链进行特异性切割, 切割位点常位于原型间隔区相邻的基序(proto-spacer-adjacent motif, PAM)上游3 nt处^[4]. 研究者们将crRNA和tracrRNA融合在一起创建了嵌合的单向导RNA(single guide RNA, sgRNA)^[5]. 在sgRNA的引导下, Cas9可以定向到PAM序列附近的目标靶标, 在特定位点形成DNA双链断裂(double-strand break, DSB). 宿主细胞通过两种不同的机制, 非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)和同源定向修复(homology-directed repair, HDR), 响应双链断裂, 导致靶DNA中的插入/缺失和移码突变(图1). 在提供供体DNA作为同源重组模板时, 细胞采取HDR方式

* 中国博士后科学基金面上项目(2019M661027)资助.

** 通讯联系人.

Tel: 022-83612122, E-mail: richardming@tju.edu.cn

收稿日期: 2020-10-14, 接受日期: 2020-11-02

修复, 可实现特定位点碱基的精确插入、缺失或置换^[6]。

目前, CRISPR/Cas9 基因组编辑技术不仅广泛

用于研究肿瘤发生、发展的潜在机制, 同时在生物和医疗领域, 尤其是肿瘤和遗传疾病的临床治疗中, 显示出巨大潜力。

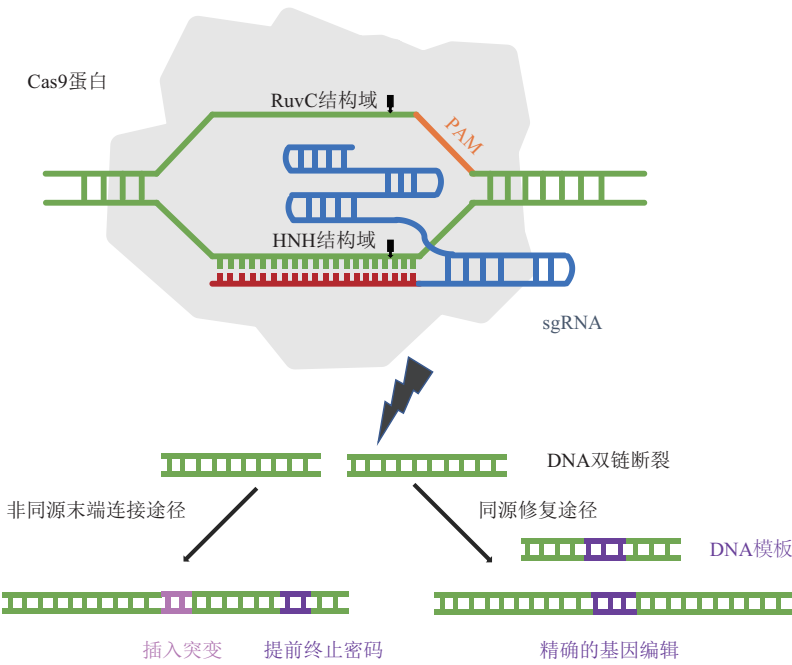


Fig. 1 Structure and principle of the CRISPR/Cas9 system

图1 CRISPR/Cas9的结构与原理

2 CRISPR/Cas9 系统的递送形式与递送载体

2.1 CRISPR/Cas9系统的递送形式

CRISPR/Cas9 系统的递送形式共有 3 种 (表 1)。

第一种是递送 Cas9 蛋白和 sgRNA 的复合物核糖核蛋白 (ribonucleoprotein, RNP)^[7]。这种方法最直接, 不需要经过转录和翻译过程, 可以快速启动基因组编辑, 能显著减少脱靶效应、毒性和免疫

反应^[8]。缺点是较难制备大量高活性的 Cas9 蛋白, 同时 Cas9 蛋白的尺寸较大, 有效递送 RNP 比较困难^[9-10]。

第二种是递送 Cas9 mRNA 和 sgRNA 的混合物^[11]。这种方法首先通过体外转录得到 Cas9 蛋白的 mRNA, 然后与 sgRNA 一起转入细胞内。mRNA 可以直接在细胞质中进行翻译, 能较快启动基因组编辑。缺点是 mRNA 的稳定性差, 另外 mRNA 在细胞内瞬时表达, 限制了基因编辑的持续时间, 降低了基因编辑的效果。因此, 目前这两种递送形式很难应用到疾病的体内治疗中。

Table 1 Three delivery strategies of CRISPR/Cas9 system

表1 CRISPR/Cas9系统的三种递送策略

递送形式	优点	缺点	参考文献
Cas9/sgRNA complex	快速、显著减少脱靶效应、毒性和免疫反应	难以得到大量高活性Cas9蛋白, Cas9蛋白尺寸较大	[7-10]
Cas9 mRNA+sgRNA	较快速、有利于减少脱靶效应	mRNA稳定性差、基因编辑效果较差	[11]
CRISPR/Cas9 plasmid	简便、稳定性好、避免多次转染	效率低、更高的脱靶效应、pDNA向细胞核转运难	[12]

第三种是基于质粒 DNA (plasmid DNA, pDNA) 载体的 CRISPR/Cas9 系统, 也是最简便的方法. 该系统用同一载体编码 Cas9 蛋白和 sgRNA, 从而避免了不同成分的多次转染^[12]. 此外, 基于质粒的 CRISPR/Cas9 系统比结合 Cas9 mRNA 和蛋白质的系统具有更高的稳定性. 然而, 基于质粒的 CRISPR/Cas9 系统在肿瘤治疗中也存在一些挑战, 例如将 pDNA 精准高效地递送到肿瘤发生部位仍存在困难.

2.2 用于CRISPR/Cas9系统递送的纳米制剂载体

病毒载体是 CRISPR/Cas9 系统最常用的递送载体, 但病毒载体可能会导致宿主产生有害的免疫原性和突变, 限制了其应用^[13-17]. 与病毒载体相比, 非病毒载体具有免疫原性低、无内源性病毒重组等优点. 近年来, 纳米粒子 (nanoparticles, NPs) 制剂载体得到了广泛的关注 (图2), 表2总结了用于 CRISPR/Cas9 系统递送的纳米载体.

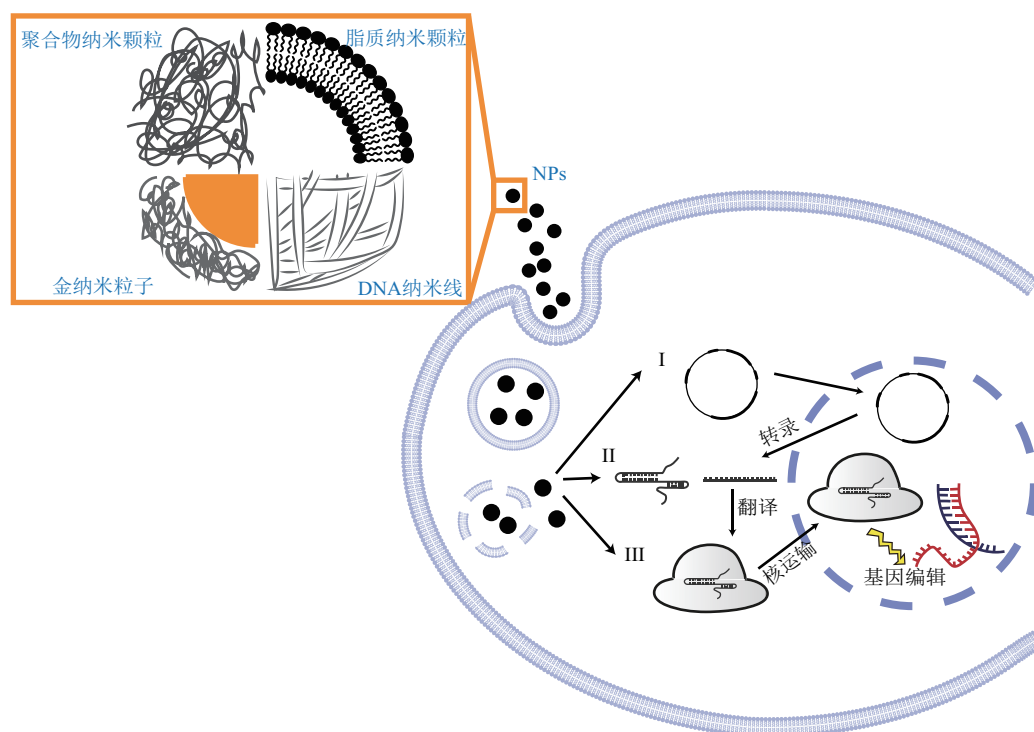


Fig. 2 Nanoparticles vectors and in-vivo gene editing strategy for CRISPR/Cas9 delivery system

图2 用于CRISPR/Cas9系统递送的纳米制剂载体及体内基因编辑策略

I: CRISPR-Cas9质粒, II: sgRNA和Cas9 mRNA, III: sgRNA/Cas9 RNP.

2.2.1 脂质纳米颗粒 (lipid-based nanoparticles, LNPs)

脂质纳米颗粒是最常用的核酸递送系统之一. 通常, 带负电的核酸通过静电相互作用与带正电的脂质复合形成脂质纳米颗粒, 可保护核酸免遭核酸酶的破坏, 并通过内吞作用或巨胞饮作用进入靶细胞^[18]. 脂质层可以帮助有效载荷穿过细胞膜, 保护它们免受RNA水解酶、酶促降解和免疫反应的影响^[19]. 该方法递送效率较低, 但是安全简单、成本低廉^[20]. 脂质纳米颗粒的低毒性已经在 siRNA 递送中进行了检测, 目前看来, 以脂质纳米颗粒为

基础的 CRISPR/Cas9 递送系统最有希望实现体内基因治疗.

基于阳离子脂质的 NPs 常用于递送 CRISPR/Cas9 系统, Zhang 等^[21] 合成了一种新型聚乙二醇磷脂修饰的阳离子脂质纳米粒子 (phospholipid-modified nanoparticle, PLNP) 传递系统, 可以浓缩和封装 pDNA, 形成核壳结构 (PLNP/DNA), 体外 A375 细胞转染效率约为 47.4%, 小鼠体内黑色素瘤生长抑制率为 67%.

对常规脂质进行功能化, 合成脂质样纳米粒子 (lipidlike nanoparticles, LLNs), 可以实现

CRISPR/Cas9组件的有效递送,并有效降低脂质体的生物学毒性.Zhang等^[22]设计并合成了一系列含有酯基的可生物降解的脂质样化合物,用于递送编码Cas9的mRNA,合成的氨基酯衍生的脂质样化合物在体外和体内均表现出有效的Cas9 mRNA递送.这些可生物降解的脂质样纳米材料值得进一步开发,作为用于基因治疗的递送工具.

Miller等^[23]合成了两性离子氨基脂质(zwitterterion amino lipids, ZAL),它们能够共同递送Cas9 mRNA和sgRNA,利用ZAL纳米颗粒递送低剂量sgRNA就能使细胞中的蛋白质表达降低>90%.这是第一个用于体外和体内共同递送Cas9 mRNA和sgRNA的非病毒递送系统,可进行永久性DNA编辑.

2.2.2 聚合物纳米颗粒

聚合物纳米颗粒已被广泛用于递送各种类型的核酸,包括pDNA和mRNA等.阳离子聚合物载体具有化学多样性和功能化潜力,应用最广泛的阳离子聚合物有聚乙烯亚胺(polyethyleneimine, PEI)、壳聚糖(chitosan, CS)等.像脂质载体一样,聚合物纳米颗粒载体可以通过内吞作用跨膜并保护有效载荷免受免疫反应和核酸酶降解的影响.

聚乙烯亚胺是用于CRISPR/Cas9递送的常用聚合物.在最近的一项研究中,阳离子聚合物PEI与Cas9蛋白共价偶联,然后与sgRNA结合形成CRISPR纳米颗粒,成功地将CRISPR系统传递给耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA),并有效编辑了目标基因组.比与常规脂质复合的未修饰Cas9/sgRNA递送系统显示出更高的编辑效率^[24].

壳聚糖也是用于递送CRISPR/Cas9系统的良好聚合物载体.Qiao等^[25]将红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)封装在壳聚糖中形成带正电荷的NPs,可以将Cas9 RNP和单链DNA供体同时递送到细胞质中,然后释放并转移到细胞核,进行HDR介导的基因组编辑.另外,Liu等^[26]设计了一种基于聚合物/无机杂化纳米粒子的双重靶向递送系统,通过共沉淀将*cdk11*敲除的CRISPR/Cas9质粒封装在由鱼精蛋白硫酸盐、碳酸钙和磷酸钙组成的无机核心中,并通过静电相互作用将羧甲基壳聚糖的功能衍生物修饰在纳米载体表面以提高细胞的摄取效率和核转运率.双重靶向递送系统将CRISPR/Cas9质粒递送到人乳腺癌细胞MCF-7(michigan cancer foundation-7)细胞核中,实现高

效的基因组编辑,CDK11蛋白减少超过90%.

除PEI和CS外,还有其他种类的聚合物可用作CRISPR/Cas9的递送载体.Alsaiari等^[27]报告了纳米级沸石咪唑骨架8(zeolitic imidazole frameworks, ZIF-8)共包封Cas9蛋白和sgRNA的第一个例子,其负载效率为17%,并且质子化咪唑部分促进了增强的内体逃逸,导致4天内绿色荧光蛋白的基因表达降低37%.

2.2.3 DNA纳米结构

DNA已被用于构建DNA纳米结构,用于成像和靶向药物递送.DNA的序列可控,DNA之间的相互作用可预测等内在特性允许DNA纳米结构以精确控制的尺寸和形状自组装.DNA纳米结构是一种新兴的递送系统,具有有效载荷能力强、生物相容性和生物降解性好,以及在生理条件下稳定性高等优点.

传统上,DNA纳米结构是通过小DNA片段的Watson-Crick碱基配对组装的.但是,这种组装过程很复杂,需要大量的DNA.最近,滚环复制(rolling circle replication, RCR)简化了DNA纳米结构的组装^[28].Sun等^[29]通过滚环扩增方式研发出一种新型自组装类纱线DNA纳米分子,可用于CRISPR/Cas9 RNP的递送.通过复杂的修饰,DNA纳米结构可以被设计成特异性靶向膜受体,以触发受体依赖性网格蛋白或细胞膜穴样内陷介导的途径,有效地进行细胞摄取.具有化学修饰的DNA纳米结构可以进一步提高其在生理条件下的稳定性.他们对这种递送载体进行了两种修饰:应用由阳离子聚合物PEI制成的涂层以促进载体的内体逃逸;核定位信号肽与Cas9的融合推动了载体从细胞质到细胞核的运输,用于靶向基因编辑.结果显示,这种DNA纳米载体递送处理的细胞突变频率(28%)比没有纳米载体辅助递送处理的细胞(1.5%)高18倍,表明Cas9/sgRNA复合物有效地递送到细胞核中用于基因编辑.总之,这种载体可有效加载Cas9/sgRNA复合物,并将复合物传递至人细胞核,在维持细胞活力的同时实现靶向基因的破坏.

2.2.4 无机纳米材料

无机纳米材料也可用于核酸递送.金纳米粒子是一种新的CRISPR/Cas9 RNP递送载体.与病毒、脂质体或聚合物载体不同,金纳米粒子在大小和分布方面都易于控制.Mout等^[30]设计了一种阳离子精氨酸功能化的金纳米粒子(ArgNPs),用于递送

化学修饰的 Cas9 蛋白和 sgRNA. 该研究使用的 Cas9 在 N 末端用谷氨酸肽标签修饰, 谷氨酸肽标签带负电, 主要用来中和 Cas9 蛋白的正电荷, 从而能够更强地结合 ArgNPs 上带正电荷的精氨酸残基. 在 C 末端添加核定位序列 (nuclear localization sequence, NLS) 以改善核递送. 使用多种细胞系孵育纳米组装体后, 获得的基因组编辑效率在 23% 至 30% 之间. 这些纳米组件尺寸较大, 在许多体外情况下使用.

就体内治疗的潜在应用而言, Lee 等^[31] 开发

了一种基于金纳米粒子的系统, 能够同时递送 Cas9 RNP 和供体 DNA, 并通过局部注射有效纠正导致小鼠杜兴氏肌营养不良症 (duchenne muscular dystrophy, DMD) 的突变基因, 并最小化脱靶效应. 该研究使用了 C57BL/10ScSn-Dmdmdx/J (mdx) 模型小鼠, 其在肌营养不良蛋白基因中具有无义突变. 结果表明, 以 6 mg/kg 的剂量肌肉注射一次 CRISPR-Gold (配制成靶向肌营养不良蛋白基因) 能够使突变的肌营养不良蛋白基因对野生型的校正率达到 5.4%.

Table 2 Summary of the specific nanoparticles vectors for CRISPR/Cas9 delivery system

表2 用于CRISPR/Cas9系统递送的纳米载体总结

种类	纳米粒子材料	特点	应用形式	编辑效率	研究进展	参考文献
脂质纳米颗粒	磷脂修饰阳离子脂质	高效安全	pDNA	47.4% ¹⁾	体外、小鼠体内模型	[21]
	氨基酯类脂质	低毒性, 可生物降解	Cas9 mRNA	41% ²⁾	体外、体内	[22]
	两性离子氨基脂质	永久性DNA编辑	Cas9 mRNA和sgRNA	>90% ³⁾	体外、体内	[23]
聚合物纳米颗粒	PEI复合物	靶向细菌细胞、存在细菌过度生长问题	RNP	32%	体外	[24]
	壳聚糖	高效, 低生物毒性可生物降解	RNP	12.5%	体外	[25]
	壳聚糖衍生物/无机杂化纳米粒子	双重靶向递送, 编辑效率高	pDNA	>90% ³⁾	体外	[26]
	ZIF	高负载能力, 有生物相容性, 体内逃逸增强	RNP	37%	体外	[27]
DNA纳米结构	PEI包被DNA纳米线	尺寸小, 可用于多重编辑, 局部给药效率高	RNP	28%	体内模型	[29]
无机纳米材料	阳离子精氨酸功能化的金纳米粒子	基因编辑效率高, 瞬时基因编辑疗法	RNP	23%~30%	体外	[30]
	金纳米粒子	局部免疫原性低, 可以安全地多次使用		5.4%	杜兴氏肌营养不良症的体内疾病模型	[31]

¹⁾ 体外递送效率, ²⁾ 体内递送效率, ³⁾ 相应系统中蛋白质表达减少90%以上.

3 CRISPR/Cas9 技术在肿瘤治疗中的研究

近年来, CRISPR/Cas9 系统已越来越多地应用于肿瘤治疗研究 (图3). 肿瘤发生的过程涉及多基因和多阶段变化, 包括癌基因激活、抑制基因失活和染色体重排等. CRISPR/Cas9 可以引入功能丧失突变和功能获得突变, 以更好地杀灭肿瘤. 因此 CRISPR/Cas9 在基因水平上的肿瘤治疗中具有广阔的前景, 基于 CRISPR/Cas9 的个性化靶向治疗可能会影响肿瘤治疗的发展, 表3总结了目前研究中用于治疗不同癌症的靶向基因及研究阶段.

3.1 非小细胞肺癌

异常的表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 表达被认为是细胞增殖、分化、迁移和血管生成的关键驱动力, 最终导致肺癌的发生. 大约 15% 的非小细胞型肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 病例与 *egfr* 基因突变有关. 在一项研究中, Koo 等^[32] 使用腺病毒 (adenovirus, AdV) 载体共同递送 Cas9 和 sgRNA, 在 NSCLC 细胞系 (H1975) 中选择性消除了 *egfr* 突变等位基因 (*l858r*), 导致癌细胞死亡并且体内肿瘤体积显著减小, 表明了基于 CRISPR/Cas9 的基因治疗在肿瘤特异性靶向治疗中的潜力. 程序性死

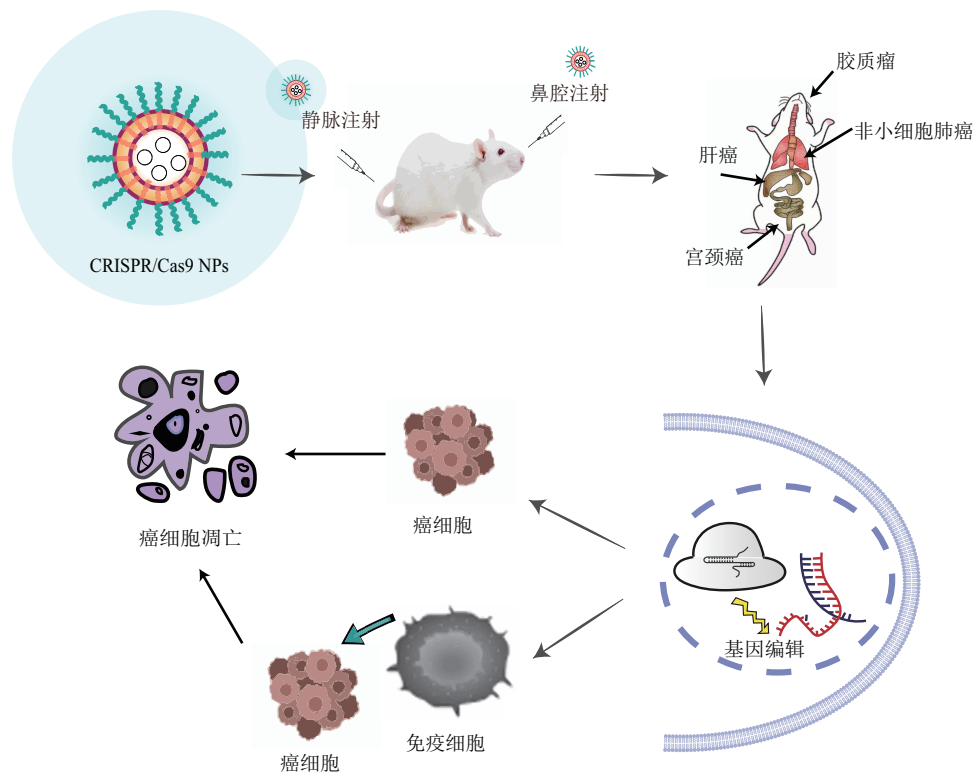


Fig. 3 CRISPR/Cas9 as a tool for cancer treatment
图3 CRISPR/Cas9系统用于癌症治疗

Table 3 Targeted genes for different tumor therapies in CRISPR / Cas9

表3 CRISPR/Cas9技术用于不同肿瘤治疗的靶向基因			
种类	靶向基因	研究进展	参考文献
非小细胞肺癌	EGFR	临床前	[32]
	PD-1	临床I 期	[33]
	NSD1	临床前	[34]
肝癌	NCOA5	临床前	[35]
	Nogo-B	临床前	[36-37]
	MicroRNA-10b	临床前	[38]
胶质瘤	EGFRvIII	临床前	[39]
	STAT3	临床前	[40]
人类乳头瘤病毒相关宫颈癌	E6 / E7	临床I 期	[41-43]

亡受体 1 (programmed cell death protein 1, PD-1) 是一种重要的免疫抑制分子, 预防自身免疫疾病, 但它也可以阻止免疫系统杀死癌细胞. 2016 年, Cyranoski [33] 的文中报道了 Lu 领导的 I 期试验, 该试验探究 *pd-1* 基因敲除编辑的 T 细胞在转移性 NSCLC 患者中的安全性和有效性. 他们从患者外周血中收集淋巴细胞并敲除 *pd-1*, 然后将其重新注入患者进行基因治疗. 输注后, 将对安全性、疗效、

生物标志物和免疫标志物进行测量和评估.

3.2 肝癌

Zhang 等 [34] 研究表明, *nsd1* 在肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 细胞中高表达, 且与 HCC 患者的不良预后有关, CRISPR/Cas9 系统介导的 *nsd1* 敲除可以促进组蛋白 H3K27me3 甲基化并抑制 Wnt10b 转录, 从而抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活, 最终阻碍 HCC 中细胞的增殖和转移. *ncoa5* 基因在多种恶性肿瘤的发展中起重要作用, NCOA5 的缺乏增加了对葡萄糖耐受不良和 HCC 的易感性. 但潜在的致病机制仍然模糊不清. He [35] 在研究中发现, 通过 CRISPR/Cas9 介导的 *ncoa5* 的基因敲除显著抑制 HCC 细胞的增殖和肿瘤微球形成, 并且 HCC 细胞的迁移能力下降. Nogo-B 是细胞凋亡的负调节剂, 在血管重塑、细胞迁移和增殖以及上皮-间质转化中起关键作用 [36]. Zhu 等 [37] 在一项研究中表明, Nogo-B 在 HCC 细胞中与在正常肝细胞中相比高度表达, 并起致癌作用, 利用 CRISPR/Cas9 敲除该基因可以显著抑制体外细胞增殖和体内肿瘤生长.

3.3 胶质瘤

microRNA-10b (*miR-10b*) 是一种嵌入 HOXD 基因组位点的 miRNA, 与包括多形性胶质母细胞瘤 (glioblastoma multiforme, GBM) 在内的各种恶性肿瘤的增殖、侵袭和转移有关. El Fatimy^[38] 在一项研究中表明, GBM 的生长受 *miR-10b* 的密切调控, *miR-10b* 功能丧失突变可导致神经胶质瘤死亡, 用 CRISPR/Cas9 慢病毒介导的靶向 *miR-10b* 基因编辑大幅度抑制了小鼠原位 GBM 的生长, 在 GBM 治疗方面拥有广阔的前景. 表皮生长因子受体 III 型突变体 (epidermal growth factor receptor variant III, EGFRvIII) 是所有 EGFR 改变中最常见的突变, EGFRvIII 发生在约 25% 的 GBM 患者中. Huang 等^[39] 研究表明, 使用 CRISPR/Cas9 敲除 EGFRvIII 可以抑制人神经胶质瘤细胞 U87 和 LN229 和小鼠肿瘤的生长. STAT3 是信号转导和转录激活因子 (signal transducer and activator of transcription, STAT) 蛋白家族的成员, 它在包括 GBM 在内的各种癌症中被组成性激活. STAT3 促进肿瘤生长和血管生成, 抑制免疫反应, 并促进肿瘤侵袭和转移. 在一项研究中, Ganguly 等^[40] 表明 CRISPR/Cas9 介导的 *stat3* 缺失可强烈抑制小鼠脑内 GBM 的发生. 此外, 神经胶质瘤起始细胞 (glioma-initiating cells, GIC) 对 STAT3 高度依赖, 利用基因编辑技术失活或抑制 STAT3, 可能对 GBM 早期患者有益.

3.4 人类乳头瘤病毒相关宫颈癌

人乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 可导致宫颈癌的发生, 主要归因于病毒自身的致癌基因 *E6* 和 *E7*. *E6* 诱导 p53 降解, 从而阻止肿瘤细胞的凋亡, 而 *E7* 破坏视网膜母细胞瘤蛋白 (retinoblastoma protein, pRb) 的稳定性, 从而解除肿瘤的细胞周期抑制. 两种致癌基因均被视为与 HPV 相关宫颈癌研究的理想靶标. Kennedy 等^[41] 使用 CRISPR/Cas9 诱导子宫颈癌细胞系中 HPV 基因组的切割, 结果证实, CRISPR/Cas9 介导的 *E6* 或 *E7* 基因的敲除恢复了宿主细胞 p53 或 pRb 的表达, 导致肿瘤细胞周期停滞和死亡. 同样, Zhen 等^[42] 已证明在异种移植小鼠模型中, 通过 CRISPR/Cas9 在 HPV-16 阳性宫颈癌细胞中敲除 *E6* 或 *E7* 会抑制癌细胞的增殖. 另外, Hu^[43] 正在开展使用 CRISPR/Cas9 直接靶向 HPV 基因组治疗 HPV 相关宫颈癌的安全性和有效性试验.

4 展 望

在过去的几年中, CRISPR/Cas9 基因编辑系统逐步发展成为最强大的基因组编辑工具. 离体基因治疗已被发现具有特殊的优势, 包括可以选择和分析校正后的细胞、可以进行变量的精确控制、相比体内方法有更多的递送选择等, 目前开始用于多种疾病的治疗^[44-45]. 2016 年, 首次进行 CRISPR/Cas9 的临床试验, 展示了 CRISPR/Cas9 治疗遗传性疾病和肿瘤疾病的巨大前景^[33]. 但是, CRISPR/Cas9 系统面临与其他基因疗法相关的相同问题. 特别是, 脱靶效应和缺乏安全有效的递送系统是将 CRISPR/Cas9 技术用于体内靶向治疗疾病的障碍.

脱靶效应破坏基因功能、诱导基因组不稳定, 并诱导表观遗传突变. 在一些 CRISPR/Cas9 介导的基因编辑研究中, 观察到了脱靶效应. 因为 sgRNA 仅靶向 20 bp 的 DNA 序列, 潜在的脱靶位点可能存在于人类基因组中. 因此, 应考虑采取某些策略, 例如使用配对的 Cas9 切口酶, 应用蛋白质工程增加 Cas9 蛋白特异性, 合理设计 sgRNA 以及正确选择靶位点, 以避免 CRISPR/Cas9 系统的脱靶效应. 另外, 选择适当的 CRISPR/Cas9 递送形式和递送载体也可以减少脱靶效应.

缺乏安全有效的递送系统是应用 CRISPR/Cas9 技术进行体内靶向治疗的另一大障碍, 非病毒载体递送的 CRISPR/Cas9 系统在静脉给药后, 需大幅度提高血液循环时间并保持稳定性, 保护其免受胞外核酸酶降解. 成功靶向细胞后, 需协助其跨越细胞膜屏障, 并促进细胞摄取和溶酶体逃逸. 另外, 必须协助 pDNA 转运至细胞核中以完成蛋白质的转录. 所以, 研发出能克服所有障碍、安全高效的非病毒载体是亟待解决的难题.

CRISPR/Cas9 在医学领域的应用是一个划时代的突破. CRISPR/Cas9 的持续优化和改进显示了其在未来医学领域 (包括医学研究、临床治疗和基因药物开发) 的巨大研究和应用潜力. 但是, 目前大多数研究仍处于起步探索阶段. 另外, 应用于肿瘤治疗, CRISPR/Cas9 还有许多分子水平上的问题尚未解决. 此技术也必须经过严格的临床测试, 包括功效、安全性和特异性测试, 才能投入临床应用. 总之, 基于 CRISPR/Cas9 的个性化靶向治疗可能是肿瘤治疗的未来, 其在基因水平的肿瘤治疗中展现出巨大潜力, 为肿瘤治疗带来新的希望.

参 考 文 献

- [1] Fitzmaurice C, Abate D, Abbasi N, *et al.* Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 29 cancer groups, 1990 to 2017: a systematic analysis for the global burden of disease study. *JAMA Oncology*, 2019, **5**(12): 1749-1768
- [2] Alexandrov L B, Nik-Zainal S, Wedge D C, *et al.* Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*, 2013, **502**(7470): 415-421
- [3] Xu X J, Wan T, Xin H H, *et al.* Delivery of CRISPR/Cas9 for therapeutic genome editing. *The Journal of Gene Medicine*, 2019, **21**(7): e3107
- [4] Sapranaukas R, Gasiunas G, Fremaux C, *et al.* The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 2011, **39**(21): 9275-9282
- [5] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, **337**(6096): 816-821
- [6] Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, *et al.* Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109**(39): E2579-E2586
- [7] Zuris J A, Thompson D B, Shu Y, *et al.* Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing *in vitro* and *in vivo*. *Nature Biotechnology*, 2015, **33**(1): 73-80
- [8] Kim S, Kim D, Cho S W, *et al.* Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells *via* delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Research*, 2014, **24**(6): 1012-1019
- [9] Woo J W, Kim J, Kwon S I, *et al.* DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nature Biotechnology*, 2015, **33**(11): 1162-1164
- [10] Schumann K, Lin S, Boyer E, *et al.* Generation of knock-in primary human T cells using Cas9 ribonucleoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, **112**(33): 10437-10442
- [11] Niu Y, Shen B, Cui Y, *et al.* Generation of gene-modified cynomolgus monkey *via* Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*, 2014, **156**(4): 836-843
- [12] Ran F A, Hsu P D, Wright J, *et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 2013, **8**(11): 2281-2308
- [13] DiCarlo J E, Deeconda A, Tsang S H. Viral vectors, engineered cells and the CRISPR revolution. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2017, **1016**: 3-27
- [14] Mali P, Yang L, Esvelt K M, *et al.* RNA-guided human genome engineering *via* Cas9. *Science*, 2013, **339**(6121): 823-826
- [15] Hess G T, Tycko J, Yao D, *et al.* Methods and applications of CRISPR-mediated base editing in eukaryotic genomes. *Molecular Cell*, 2017, **68**(1): 26-43
- [16] Wang M, Glass Z A, Xu Q. Non-viral delivery of genome-editing nucleases for gene therapy. *Gene Therapy*, 2017, **24**(3): 144-150
- [17] Ha J S, Lee J S, Jeong J, *et al.* Poly-sgRNA/siRNA ribonucleoprotein nanoparticles for targeted gene disruption. *Journal of Controlled Release*, 2017, **250**: 27-35
- [18] Liu C, Zhang L, Liu H, *et al.* Delivery strategies of the CRISPR-Cas9 gene-editing system for therapeutic applications. *Journal of Controlled Release*, 2017, **266**: 17-26
- [19] Chen F, Alphonse M, Liu Q. Strategies for nonviral nanoparticle-based delivery of CRISPR/Cas9 therapeutics. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2020, **12**(3): e1609
- [20] Karimian A, Azizian K, Parsian K, *et al.* CRISPR/Cas9 technology as a potent molecular tool for gene therapy. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, **234**(8): 12267-12277
- [21] Zhang L, Wang P, Feng Q, *et al.* Lipid nanoparticle-mediated efficient delivery of CRISPR/Cas9 for tumor therapy. *NPG Asia Materials*, 2017, **9**: e441
- [22] Zhang X, Li B, Luo X, *et al.* Biodegradable amino-ester nanomaterials for Cas9 mRNA delivery *in vitro* and *in vivo*. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2017, **9**(30): 25481-25487
- [23] 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. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2017, **56**(4): 1059-1063
- [24] Kang Y K, Kwon K, Ryu J S, *et al.* Nonviral genome editing based on a polymer-derivatized CRISPR nanocomplex for targeting bacterial pathogens and antibiotic resistance. *Bioconjugate Chemistry*, 2017, **28**(4): 957-967
- [25] Qiao J, Sun W, Lin S, *et al.* Cytosolic delivery of CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins for genome editing using chitosan-coated red fluorescent protein. *Chemical Communications*, 2019, **55**(32): 4707-4710
- [26] Liu B Y, He X Y, Xu C, *et al.* A dual-targeting delivery system for effective genome editing and *in situ* detecting related protein expression in edited cells. *Biomacromolecules*, 2018, **19**(7): 2957-2968
- [27] Alsaieri S K, Patil S, Alyami M, *et al.* Endosomal escape and delivery of CRISPR/Cas9 genome editing machinery enabled by nanoscale zeolitic imidazolate framework. *Journal of the American Chemical Society*, 2018, **140**(1): 143-146
- [28] Hu R, Zhang X, Zhao Z, *et al.* DNA nanoflowers for multiplexed cellular imaging and traceable targeted drug delivery. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2014, **53**(23): 5821-5826
- [29] Sun W, Ji W, Hall J M, *et al.* Self-assembled DNA nanoclews for the efficient delivery of CRISPR-Cas9 for genome editing. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2015, **54**(41): 12029-12033
- [30] Mout R, Ray M, Yesilbag Tonga G, *et al.* Direct cytosolic delivery of CRISPR/Cas9-ribonucleoprotein for efficient gene editing. *ACS Nano*, 2017, **11**(3): 2452-2458
- [31] Lee K, Conboy M, Park H M, *et al.* Nanoparticle delivery of Cas9 ribonucleoprotein and donor DNA *in vivo* induces homology-directed DNA repair. *Nature Biomedical Engineering*, 2017,

- 1(11): 889-901
- [32] Koo T, Yoon A R, Cho H Y, *et al.* Selective disruption of an oncogenic mutant allele by CRISPR/Cas9 induces efficient tumor regression. *Nucleic Acids Research*, 2017, **45**(13): 7897-7908
- [33] Cyranoski D. CRISPR gene editing tested in a person for the first time. *Nature*, 2016, **539**(7630): 479
- [34] Zhang S, Zhang F, Chen Q, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated knockout of NSD1 suppresses the hepatocellular carcinoma development *via* the NSD1/H3/Wnt10b signaling pathway. *Journal of Experimental & Clinical Cancer*, 2019, **38**(1): 467
- [35] He J, Zhang W, Li A, *et al.* Knockout of NCOA5 impairs proliferation and migration of hepatocellular carcinoma cells by suppressing epithelial-to-mesenchymal transition, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, **500**(2): 177-183
- [36] Kawaguchi N, Yashiro K, Taniguchi K, *et al.* Nogo-B (Reticulon-4B) functions as a negative regulator of the apoptotic pathway through the interaction with c-FLIP in colorectal cancer cells. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, 2018, **1864**(8): 2600-2609
- [37] Zhu B, Chen S, Hu X, *et al.* Knockout of the Nogo-B gene attenuates tumor growth and metastasis in hepatocellular carcinoma. *Neoplasia*, 2017, **19**(7): 583-593
- [38] El Fatimy R, Subramanian S, Uhlmann E J, *et al.* Genome editing reveals glioblastoma addiction to MicroRNA-10b. *Molecular Therapy*, 2017, **25**(2): 368-378
- [39] Huang K, Yang C, Wang Q, *et al.* The CRISPR/Cas9 system targeting EGFR exon 17 abrogates NF-kappa B activation *via* epigenetic modulation of UBXLN1 in EGFRwt/vIII glioma cells. *Cancer Letters*, 2017, **388**: 269-280
- [40] Ganguly D, Fan M, Yang C H, *et al.* The critical role that STAT3 plays in glioma-initiating cells: STAT3 addiction in glioma. *Oncotarget*, 2018, **9**(31): 22095-22112
- [41] Kennedy E M, Kornepati A V R, Goldstein M, *et al.* Inactivation of the human papillomavirus E6 or E7 gene in cervical carcinoma cells by using a bacterial CRISPR/Cas RNA-guided endonuclease. *Journal of Virology*, 2014, **88**(20): 11965-11972
- [42] Zhen S, Hua L, Takahashi Y, *et al.* *In vitro* and *in vivo* growth suppression of human papillomavirus 16-positive cervical cancer cells by CRISPR-Cas9. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014, **450**(4): 1422-1426
- [43] Hu Z. A safety and efficacy study of TALEN and CRISPR-Cas9 in the treatment of HPV-related cervical intraepithelial neoplasia [2017-02-20]. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03057912>
- [44] Song M. The CRISPR/Cas9 system: their delivery, *in vivo* and *ex vivo* applications and clinical development by startups. *Biotechnology Progress*, 2017, **33**(4): 1035-1045
- [45] Li Y, Glass Z, Huang M, *et al.* *Ex vivo* cell-based CRISPR/Cas9 genome editing for therapeutic applications. *Biomaterials*, 2020, **234**: 119711

CRISPR / Cas9 System and Its Application in Tumor Therapy*

QIAO Huan-Huan, ZHANG Qing-Hao, MING Dong**

(Academy of Medical Engineering and Translational Medicine, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract The emerging CRISPR/Cas9 gene editing technology can realize the manipulation of genes at the molecular level. It has the advantages of simple design, easy operation, good specificity and high efficiency. It is widely used in the study of potential mechanisms of tumorigenesis, development and metastasis and clinical treatment. Recent researches into the use of CRISPR/Cas9 for tumor therapy *in vivo* have focused on developing vectors. Non-viral nano-carriers developed by nanotechnology can efficiently deliver the CRISPR/Cas9 system into the body, providing a new way for the clinical application of CRISPR/Cas9 technology. In this review, we discuss the principle of CRISPR/Cas9, the current delivery forms of CRISPR/Cas9 and commonly used nano-delivery vectors. We highlight several nano-carriers including inorganic nanoparticles, polymer-based nanoparticles, lipid-based nanoparticles and others. We also summarize the characteristics, editing efficiency, applications and new studies of different nano-carriers. The applications and progresses of CRISPR/Cas9 in treating different tumors are also discussed.

Key words CRISPR/Cas9, gene editing, nano carrier, tumor treatment

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0239

* This work was supported by a grant from China Postdoctoral Science Foundation(2019M661027).

** Corresponding author.

Tel: 86-22-83612122, E-mail: richardming@tju.edu.cn

Received: October 14, 2020 Accepted: November 2, 2020