非病毒CRISPR/Cas9系统载体的研究进展

刘琦[†], 张展展[†], 刘阳^{*}

药物化学生物学国家重点实验室, 功能高分子材料教育部重点实验室, 南开大学化学学院, 天津 300071

[†]同等贡献

^{*}通讯作者, E-mail: yliu@nankai.edu.cn

收稿日期: 2018-10-29; 接受日期: 2018-12-12; 网络版发表日期: 2019-02-27

国家重点研发专项“纳米科技”(编号: 2018YFA0209700)、国家自然科学基金(编号: 51673100)和天津市自然科学基金(编号: 18JCQNJC03600)资助项目

摘要 近年来, 规律成簇的间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats sequences, CRISPR)/CRISPR相关蛋白9(CRISPR associated protein 9, Cas9)基因编辑系统已经成为生物医学基础研究中最强大的技术之一。但是如何将CRISPR/Cas9系统高效地递送至靶器官或细胞仍是一个巨大的挑战。随着非病毒载体的快速发展, 基于脂质体、聚合物、无机纳米粒子等化学方法的纳米载体已经显现出巨大的应用潜力。本文首先对CRISPR/Cas9系统在疾病建模和疾病治疗中的应用潜力以及其局限性进行了阐述, 然后分析了以质粒DNA、mRNA或蛋白质形式递送CRISPR/Cas9系统的优缺点并详细概述了已经出现的非病毒载体, 最后总结了当前非病毒载体在递送CRISPR/Cas9系统过程中面临的关键障碍, 并提出了有望克服这些障碍的策略。

关键词 CRISPR/Cas9, 基因编辑, 非病毒载体, 药物递送, 纳米药物

1 引言

规律成簇的间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats sequences, CRISPR)系统起源于细菌和古细菌的自适应性免疫, 可以有效抵御来自于质粒、噬菌体的侵入性核酸^[1-3]。CRISPR相关研究的起源可以追溯到1987年, Nakata等^[4]报道了一个来自于大肠杆菌的间隔短重复基因序列, 但是, 这项发现在当时并没有得到重视。在接下来的15年里, 更多相似的重复序列在其他细菌中被发现, 这导致人们对其可能的功能产生了浓厚的兴趣和猜测。2002年, Jansen等^[5]第一次使用术语CRISPR描述这

类间隔重复序列, 同时他们发现了CRISPR相关(CRISPR associated, Cas)基因, 这些基因总是位于CRISPR基因座附近, 这种紧密的关联性显示出Cas基因与CRISPR基因座之间可能存在功能关系。2005年, Mojica^[6]、Pourcel^[7]和Bolotin等^[8]发现CRISPR的间隔区序列起源于质粒和噬菌体, 并提出CRISPR可能是一种针对噬菌体感染的适应性防御系统。2006年, Brouns等^[9]证明成熟的CRISPR RNA (crRNA)可以作为干扰病毒增殖的向导RNA。同年, Marraffini等^[10]报道了来自表皮葡萄球菌的III型CRISPR/Cas系统是通过靶向DNA而不是RNA来介导适应性免疫。2007年, Barrangou等^[11]进行了第一个CRISPR/Cas系统介导的适应性

引用格式: Liu Q, Zhang Z, Liu Y. Research progress on non-viral vectors of CRISPR/Cas9 system. *Sci Sin Chim*, 2019, 49: 752–765, doi: [10.1360/N032018-00233](https://doi.org/10.1360/N032018-00233)

免疫实验. 随着后续研究的进行, CRISPR系统的功能和机理得到了进一步的探索和阐述. 2012年, Jinek等^[12]发现了crRNA通过碱基配对反式激活crRNA (trans-activating crRNA, tracrRNA)形成一个双RNA结构并引导Cas9蛋白在靶DNA上形成DNA双链断裂(double-strand break, DSB). 2013年, Jinek等^[12]和Mali等^[13]在哺乳动物细胞中使用CRISPR系统完成了基因组编辑. 随后, 一系列的研究显示这项技术在真核细胞基因组中具有显著的编辑效率, 如斑马鱼、小鼠和猴子^[14~17].

CRISPR/Cas系统可分为两类: 第一类包含I型、III型和IV型, 第二类包含II型、V型和VI型^[18]. 第一类CRISPR/Cas系统使用多种Cas蛋白, 而第二类CRISPR/Cas系统仅使用具有多个功能域的单一Cas蛋白^[19]. 在CRISPR/Cas系统的诸多类型中, II型CRISPR/Cas系统由于其多功能性、高特异性和高效性已经被广泛应用于生物医学领域^[19~23]. CRISPR/Cas9系统包含两个关键组分: Cas9蛋白和单链向导RNA (single guide RNA, sgRNA). 在存在与原型间隔区相邻的基序(protospacer-adjacent motif, PAM)的情况下, 基于碱基配对, Cas9蛋白可被sgRNA导向任何靶向基因位点, 在特定位点形成DSB. DSB可以通过非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)、同源介导末端连接(homology-mediated end joining, HMEJ)、微同源介导末端连接(microhomology-mediated end joining, MMEJ)、同源重组修复(homology directed repair, HDR)进行修复, 基于NHEJ机理的修复会在断裂处产生随机插入或缺失实现基因突变. 通过提供同源序列, 随后通过HDR、HMEJ和MMEJ机理修复可以在靶点处插入特定序列^[12,22~24]. 同时, 近年来还开发了CRISPR干扰(CRISPR interference, CRISPRi)技术, 通过失活的核酸酶(dead Cas9, dCas9)与转录激活域结合, 并借助于sgRNA的引导作用, CRISPR/dCas9系统可以在不切割靶DNA的情况下实现对基因表达的精确和有效控制, 并且具有较低的脱靶效应^[9,25,26].

由于以上这些优点, CRISPR/Cas9系统在疾病建模和治疗方面显示出巨大的潜力^[27~34]. 例如, CRISPR/Cas9系统已经被应用于在体外和体内重现癌症相关基因, 为研究癌症相关的基因突变提供了方便有效的平台. 同时, 通过简单地改变或者增加sgRNA序列, Cas9核酸酶可以重新靶向新的目标序列或者同时靶向多个

序列用于基因组编辑^[13,35,36]. 在过去几十年中, 疾病模型的构建是一个极其缓慢和昂贵的过程, 因为其首先需要胚胎干细胞进行复杂的操作, 然后为了获得所需的表型和基因型而进行的长时间的动物培养. 然而, 在简单灵活的CRISPR/Cas9系统出现之后, 新型疾病模型的建立获得了前所未有的速度和精确度^[37~40]. 由于CRISPR/Cas9系统可以迅速便捷地纠正基因组中的突变, 其在基因治疗领域, 特别是单基因疾病并永久治愈方面也具有巨大的应用潜力^[41~46]. 此外, CRISPR/Cas9系统还可以通过抑制原癌基因表达或激活抑癌基因来治疗多基因疾病(如癌症)^[47~50].

尽管基于CRISPR/Cas9系统的基因组编辑技术已经在生物和医学上显示出了巨大的应用潜力, 但是在其被应用于临床之前, 仍然需要解决几个实用性问题和技术挑战. 在分子水平上, 有三个主要问题需要克服. 首先, 设计高效率 and 准确的切割、修复位点, 以提高基因编辑的特异性并降低脱靶概率. 其次, 了解如何根据不同的实验目的选择不同的修复途径. 第三, CRISPR/Cas9系统在治疗疾病中需要具有更好的治疗效果. 虽然HDR途径介导的基因编辑技术已经取得了巨大的进展, 然而, 由于重组过程的不稳定性, 对HDR途径介导的基因编辑技术的应用提出了巨大的挑战^[51~53]. 用基因沉默法或化学抑制剂抑制NHEJ过程可以一定程度地提高HDR的效率, 但是对于疾病的治疗仍然需要对现有技术不断优化^[51,54]. 总的来说, 这些问题的解决需要开发更高效的CRISPR系统. 例如, 在最近的研究中, 已经开发出同源依赖性靶向整合策略作为CRISPR/Cas9介导的基因修复的替代方法. 该方法允许在体外和体内的分裂和非分裂细胞中进行稳定的基因敲入^[55,56]. 毫无疑问, 随着对CRISPR系统研究不断的发展, CRISPR系统在临床应用上的潜力将会越来越大.

另一方面, 将CRISPR系统有效递送到特定细胞类型、组织或器官中以获得治疗效果是另一个主要的挑战. 开发新的递送方法对于CRISPR/Cas9系统介导的体内治疗是必不可少的, 只有当CRISPR/Cas9系统进入目标细胞时, 它们才能更准确、更有效地发挥作用. 此外, 这种方式还可以显著降低副作用, 提高治疗过程中的安全性. 虽然病毒类载体在CRISPR/Cas9系统的应用中显示出了较高的编辑效率, 但是其也存在固有的缺点, 包括致癌风险, 插入大小的限制以及在体内

产生的免疫反应, 这些缺陷严重限制了病毒类载体的进一步发展. 作为替代方案, 非病毒载体由于免疫原性低、载荷高、易于大规模生产, 从而为CRISPR/Cas9系统的递送提供了更大的发展空间.

2 CRISPR/Cas9系统的递送形式

使用CRISPR/Cas9系统进行基因组编辑通常有三种策略(图1). 第一种也是最简便的方法是将CRISPR/Cas9系统所需的Cas9蛋白和sgRNA编码进同一个质粒DNA (plasmid DNA, pDNA)载体中, 从而避免不同组分的多次转染. 第二种策略是递送Cas9蛋白的信使RNA (messenger RNA, mRNA)和sgRNA. 第三种策略是直接使用Cas9蛋白和sgRNA形成核糖核蛋白(Ribonucleoprotein, RNP)进行基因组编辑. 每种方法都有其优缺点, 并面临着独特的挑战.

2.1 递送编码CRISPR/Cas9系统的pDNA

基于pDNA的CRISPR/Cas9的系统, 由于操作简单且成本低而成为极具吸引人的一种方法(图1(a)). Cas9蛋白和sgRNA, 甚至同源重组修复模板都可以很容易地编码在同一个pDNA中, 而且拥有比蛋白和mRNA更高的稳定性^[57]. 然而, 编码后pDNA的尺寸过大(>7 kb)会显著增加CRISPR/Cas9系统递送和表达的难度. 基于pDNA表达的第二个障碍是进入细胞核后的转录, 这个过程降低了基因编辑的效率并且还会导致治疗过程的延迟. 此外, 基于pDNA的表达通常会导致Cas9蛋白长时间存在于细胞中, 这可能会导致更高的脱靶效应和强烈的免疫应答^[58,59].

2.2 递送Cas9蛋白的mRNA和sgRNA

另一种选择是将Cas9蛋白的mRNA与sgRNA一起使用(图1(b)), 而Cas9蛋白的mRNA可以比较容易地通过体外转录获得. 使用Cas9蛋白的mRNA的优势在于可以较快速地启动基因编辑, 因为mRNA不需要再进入细胞核进行转录. 此外, 由于递送Cas9蛋白的mRNA可以在细胞内瞬时表达Cas9蛋白, 限制了基因编辑的持续时间, 这可能有助于减少脱靶效应的发生^[60]. 然而, mRNA较短的表达时间也同样会降低基因编辑的效果. 另外, mRNA相对较差的稳定性也会阻碍这种递送策略的发展.

2.3 递送Cas9蛋白和sgRNA

在所有的递送形式中, 最直接的方法就是直接递送Cas9蛋白和sgRNA (图1(c)). 原理上, 因为不需要转录和表达, 这种形式能够最快速地进行基因组编辑, 而且还可以显著降低脱靶效应和毒性, 所以这种递送形式在最近几年得到了广泛的应用^[29]. 然而, 由于Cas9蛋白的尺寸较大(160 kDa), 实现对正电荷的Cas9蛋白和负电性sgRNA形成的RNP的有效递送较为困难^[61,62]. 同时, 因为成本和内毒素污染问题, 想要获得大量高活性的Cas9蛋白也存在一定难度.

3 用于CRISPR/Cas9系统递送的物理方法

3.1 显微注射法

将CRISPR/Cas9系统递送到细胞内最直接的方法是显微注射法. 因为它能够绕过细胞外基质、细胞膜及细胞质等多层屏障, 以最直接的方式将pDNA/mRNA/蛋白质精确递送到细胞核或细胞质中^[63]. 这种操作方式从本质上来说是在单细胞水平上的逐个编辑, 因此可以实现对基因编辑的高度控制进而大幅度降低脱靶效应^[64]. 此外, 该方法不受CRISPR/Cas9系统的分子量和大小限制, 因此在对编码Cas9蛋白和sgRNA的大分子量pDNA (>7 kb)或直接对Cas9蛋白(160 kDa)递送时甚至有着高达100%的效率^[65]. 目前, 该技术已成功地在包括斑马鱼^[66]、大鼠^[67]、小鼠^[53]、兔子^[68]、绵羊^[69]、猴子^[16]等在内的细胞及动物中进行了基因编辑. 但由于显微注射对于操作人员的要求极高, 且每次实验最多只能处理几百个细胞, 因此对于大多数需要同时编辑数百万甚至数十亿个细胞的体内应用来说是不切实际的.

3.2 电导转入法

电导转入法是另外一种将核酸或蛋白质递送到细胞中的常用物理方法, 该方法通过对细胞膜上的磷脂双分子层进行瞬间破坏实现对核酸或蛋白的高效递送. 电导转入法适用于流体力学体积为几个到几十个纳米之间的纳米粒子, 因此在Cas9蛋白的递送中有着得天独厚的优势. 目前, 电导转入法在体内和体外的CRISPR/Cas9系统的递送应用中均表现良好^[70,71]. 然而, 在递送CRISPR系统的过程中, 对细胞施加的瞬间

图 1 递送CRISPR/Cas9系统的不同策略. (a) 递送编码Cas9蛋白和sgRNA的pDNA; (b) 递送Cas9的mRNA和sgRNA; (c) 直接递送Cas9蛋白和sgRNA形成的RNP (网络版彩图)

Figure 1 Different strategies for delivering CRISPR/Cas9 system. (a) Delivery of pDNA encoding Cas9 protein and sgRNA. (b) Delivery of Cas9 mRNA and sgRNA. (c) Delivery of RNP of Cas9 protein and sgRNA (color online).

电压对磷脂双分子层造成的破坏可能伴随有细胞的非正常凋亡及细胞活性的丧失. 研究者为了最小化电导转入法所造成的副作用, 对该方法的电压、电流参数和培养基构成进行了最优化的筛选. 因此电导转入法极可能成为未来细胞水平上CRISPR系统递送最常用的技术之一.

3.3 尾静脉高压注射法

尾静脉高压注射法主要用于啮齿动物体内的基因递送^[72]. pDNA在尾静脉进行注射时, 通过施加瞬间高压造成对细胞膜的瞬间穿孔, 从而极大地提高了pDNA的递送效率, 实现了pDNA在肝脏、肾脏及心肺的高效转染. 近年来, 该项技术已成功用于诱导小鼠肝癌细胞基因突变以及对遗传性酪氨酸血症突变进行修正^[73,74]. 然而, 尾静脉高压注射法需要注射大量的体积且对肝脏会造成明显的损伤. 由于这种显而易见的副作用使得该方法在临床上仅有一次人体实验, 且以失败告终, 因此在进一步将尾静脉高压注射法向临床应用转化之前, 需首先在安全性上进行大幅度的改进.

其他物理递送方法, 包括细胞超声法^[75]、激光照射法^[76], 也可用于CRISPR/Cas9系统的递送. 它们的作用机制与上述三种物理方法相仿(表1), 都是通过在细胞膜上产生瞬间穿孔从而实现CRISPR体系的细胞内高效递送. 所以都会造成潜在的细胞凋亡或细胞活

性丧失等问题. 此外, 上述多种物理方法均无法直接对未经任何载体保护的裸露pDNA、mRNA或蛋白进行递送. 故在将上述方法直接应用于组织或体内研究时, 胰蛋白酶所带来的酶促降解和单核系统所引起的体内快速清除均会对CRISPR/Cas9系统的应用效率造成极大的影响. 所以, 采用安全性较高且毒副作用较小的非病毒载体进行递送可能在不久的将来会发挥主导作用(表2).

4 用于CRISPR/Cas9系统递送的非病毒载体

4.1 用于递送编码CRISPR/Cas9系统的pDNA的非病毒载体

编码CRISPR/Cas9系统的pDNA在递送过程中遵循与其他pDNA相同的原则. 具体说来, 阳离子聚合物通过静电作用与pDNA进行络合形成复合物而保护pDNA免于核酸酶降解. 其次, 通过对阳离子聚合物与pDNA的比例进行精细调控, 从而实现了对负载pDNA的纳米粒子的粒径及表面电荷进行精确控制, 从而实现细胞对pDNA摄取的最大化, 并促进Cas9蛋白及sgRNA的表达. 然而Cas9蛋白的大分子量使得编码CRISPR/Cas9系统的pDNA尺寸较大, 所以很难对电荷比(N/P)、纳米粒子的Zeta电位、粒径、溶酶体逃逸同

表 1 用于递送CRISPR/Cas9系统的物理方法

Table 1 Physical methods for delivering the CRISPR/Cas9 system

递送方法	主要递送形式	优点	缺点	参考文献
显微注射法	pDNA, mRNA, RNP	确保靶标到目的细胞上	费时费力, 操作困难, 仅限于体外应用	[63~65]
电导转入法	pDNA, mRNA, RNP	操作简单, 适用于递送Cas9蛋白	瞬间电压会引起细胞的非正常凋亡并丧失细胞活性	[70,71]
尾静脉高压注射法	pDNA, RNP	价格低廉, 操作简单	非特异性; 对肝脏肾脏有明显损伤	[72]

表 2 用于递送CRISPR/Cas9系统的非病毒载体

Table 2 Non-viral vectors for delivering the CRISPR/Cas9 system

递送载体	主要递送形式	优点	缺点	参考文献
聚乙烯亚胺	pDNA, mRNA, RNP	较高的电荷密度和优异的pH缓冲能力	高分子量PEI具有较高的毒性, 且体内应用时容易被清除	[77~81]
壳聚糖	pDNA, mRNA	易修饰, 生物毒性低	在递送大分子量pDNA时会由于太过紧密的缠绕而影响转染效率	[82,83]
聚氨基酸	pDNA	聚合度高度可控, 易于化学修饰, 体内可生物降解	伯胺的电荷密度相对较低会影响溶酶体逃逸及转染效率	[84~86]
DNA纳米链	RNP	可大幅度保留Cas9蛋白的生物活性, 并实现高效的目的基因剪切	需要对DNA球体进行分别设计, 步骤繁琐, 价格昂贵	[87]
金纳米颗粒	RNP, pDNA	这种基于膜融合的递送方法, 递送效率极高	在体内可能会引起非特异性的炎症反应及免疫效应	[88~92]
脂质体	mRNA, pDNA, RNP	商业产品, 可直接购买, 操作简单	溶酶体逃逸效率低, 缺少细胞靶向性	[93~96]
无机纳米粒子	RNP, pDNA	递送效率高	合成过程复杂, 不易被代谢	[97,98]
细胞穿膜肽	pDNA, mRNA, RNP	安全, 粒径较小	需要进一步化学修饰	[99,100]
正电性蛋白	pDNA, RNP	生物相容性较好, 粒径较小	效率较低, 体内递送较为困难	[101,102]
外泌体	pDNA	生物相容性好	制备过程复杂	[103]

时进行优化。高分子聚合物由短链重复单元聚合而形成, 由于重复单元的结构高度可控, 可以根据所载物质的响应性需求进行精确的设计, 这种在结构上无可比拟的多样性和功能上的全面性, 赋予了高分子聚合物在递送pDNA时的无限可能。我们对当前应用最广泛的pDNA阳离子聚合物载体进行简要总结, 用以评估这些载体是否具有递送大分子量的CRISPR体系的能力。聚乙烯亚胺(polyethyleneimine, PEI)、壳聚糖和聚(L-赖氨酸)是被研究最透彻也是应用最广泛的三种阳离子聚合物。支状PEI由于同时具有伯胺、仲胺和叔胺三种官能团, 因此具有较高的电荷密度和优异的pH缓冲能力。Wang和Li等^[77]通过将PEI与编码CRISPR/Cas9系统的pDNA进行复合, 极大地促进了对pDNA的压缩, 并协助pDNA进行溶酶体逃逸, 实现了极高的基因编辑效率(图2(a, b))^[78]。高分子量(25 kDa)的支状PEI虽然能极大地提高pDNA的转染效率, 但过高的毒性

极大地限制了其在临床应用上的转化。为了降低PEI转染过程的细胞毒性, 高分子量线性PEI、功能化的低分子量支状PEI已经得到了广泛的研究^[79,80], 这些研究将有助于基于PEI的CRISPR/Cas9系统载体的构建。

壳聚糖是另外一种在递送CRISPR系统时常用到的聚合物载体。作为一种常见的天然聚合物多糖, 壳聚糖上大量的伯胺使其极易修饰, 同时较低的生物毒性更是极大地拓宽了壳聚糖在生物体内的应用(图2(c))^[82]。Kiang等^[83]分别用18、50和136 kDa的壳聚糖以0.05%、0.1%、0.5%和1%的浓度形成壳聚糖纳米粒子, 用以将外源性pDNA递送到人骨髓间充质干细胞中, 他们发现壳聚糖纳米粒子的分子量为18 kDa, 浓度为0.1%时转染效果最好。上述研究表明, 分子量的大小极大地影响着pDNA的转染效率。高分子量的壳聚糖在与pDNA形成复合体时, 壳聚糖分子间存在的链缠结效应会促进pDNA与壳聚糖形成更稳定的复合

图2 用于递送编码CRISPR/Cas9系统的pDNA的非病毒载体^[77,78,83,84] (网络版彩图)

Figure 2 Non-viral vector for delivery of pDNA encoding the CRISPR/Cas9 system ^[77,78,83,84] (color online).

物。壳聚糖的脱乙酰化程度也同样是影响壳聚糖转染效率的重要因素。据报道,脱乙酰化程度较高(88%)的壳聚糖与脱乙酰化程度较低的壳聚糖相比在各种细胞系中均表现出更高的转染效率^[104]。另有文献报道,中度脱乙酰化(70%和62%)的壳聚糖比高度脱乙酰化的壳聚糖在体内的基因转染效率更高^[83]。这些研究均强调了寻找细胞外壳聚糖对pDNA的压缩以形成更加稳定的复合物与细胞内促进pDNA释放以实现高效转染二者平衡的重要性。然而,壳聚糖在对编码CRISPR/Cas9系统的pDNA进行递送时,会由于太过紧密的缠绕而使得pDNA无法释放从而影响pDNA在细胞内的转染。因此,如何促进壳聚糖/pDNA复合物在细胞内部的解离将会是壳聚糖应用的未来研究方向。

聚(L-赖氨酸)是人工合成的碱性氨基酸-赖氨酸的均聚物,基于聚乙二醇-*b*-聚赖氨酸共聚物载体的纳米药物已在临床上被尝试用于囊性纤维化的治疗^[105]。由于每个赖氨酸分子末端都具有一个伯胺,且聚(L-赖氨酸)

的聚合度高度可控,因此聚(L-赖氨酸)和聚乙二醇-*b*-聚赖氨酸共聚物在用于pDNA的递送时表现出极高的优异性(图2(d))^[84]。Liu等^[85]通过对聚乙二醇-*b*-聚赖氨酸共聚物进行功能化修饰,实现了对pDNA的高效负载,并可在血液长循环过程中保持稳定而在肿瘤部位富集并将pDNA释放以对肿瘤细胞进行杀伤。作为一种人工合成的阳离子聚合物,聚(L-赖氨酸)兼具氨基酸和阳离子聚合物两种性能,因此在使用聚(L-赖氨酸)作为pDNA的载体时,较低的细胞毒性以及体内微环境下的自发降解为基于聚(L-赖氨酸)的聚合物提供了广阔的平台。因此将基于聚(L-赖氨酸)的聚合物用作编码CRISPR/Cas9系统的pDNA的递送是一个良好的选择。

4.2 用于递送Cas9蛋白的mRNA和sgRNA的非病毒载体

mRNA和pDNA相比,在存储和递送过程中易被酶

降解,且mRNA在细胞内不能长时间表达.然而mRNA在递送过程中不需要进入细胞核,可以在细胞质内的核糖体中直接完成对蛋白质的翻译,从而能够对mRNA的剂量进行精确控制,且能显著性降低CRISPR/Cas9系统的脱靶效应.为了实现对mRNA高效且精准的递送,在载体的设计方面必须保护mRNA免受胞外核酸酶的降解.而pDNA的载体在行使递送的功能时需要实现的功能更加复杂,因此常规pDNA载体足以达到mRNA递送的要求.但由于mRNA远比pDNA脆弱,因此在将pDNA的载体移植到mRNA上时需考虑到载体在将mRNA递送到细胞内部后,能否协助mRNA溶酶体逃逸是至关重要的因素.但是用现在的技术来研究聚合物载体或脂质体和mRNA的复合物在细胞内的溶酶体逃逸、释放以及降解情况是极为困难的.

多种市售脂质复合物已经大量用于体外和体内转染.Yin等^[93]利用脂质体作为载体递送Cas9蛋白的mRNA,在细胞水平上和小鼠体内实现对哺乳动物基因组的精确编辑(图3(c)).但由于脂质体一般都具有较高的细胞毒性且转染过程中很难协助mRNA进行溶酶体逃逸,因此在体内应用时具有较高的局限性.为了提高脂质体在mRNA递送过程中的转染效率,研究者深入研究了两大类阳离子脂质体MegaFectin和TransIT且已被证明体内递送mRNA的高效性^[94].同时,Zhang等^[95]和Miller等^[96]对常规脂质体进行了功能化改性,实现了对Cas9蛋白的mRNA在小鼠体内的高效投递的同时,有效降低了脂质体的生物毒性(图3(a, b)).近年来,聚合物类载体,如壳聚糖、PEI及聚(β -氨基酸)均已从pDNA的载体适配到mRNA的递送体系上.Mahiny及合作者^[106]通过采用壳聚糖包裹的聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米微球作为载体,成功地在体内对锌指核糖核酸酶的mRNA进行了高效地递送并在肺部实现了精确的基因编辑,而这种递送方式同样适用于Cas9蛋白的mRNA的递送.

4.3 用于直接递送Cas9蛋白和sgRNA的非病毒载体

对于CRISPR/Cas9系统来说,最高效的方式就是跳过pDNA或mRNA在细胞内对Cas9蛋白及sgRNA的表达,而对Cas9蛋白和sgRNA直接进行递送.在体外完成对Cas9蛋白的提取及纯化可以完全避免DNA翻译

阶段产生的错误,因此可以最大程度地降低脱靶效应^[85].尽管对Cas9蛋白直接进行递送能有效提高CRISPR/Cas9系统的编辑效率,但由于Cas9蛋白属外源性蛋白,在体内有较高的免疫原性,极易被血液中免疫系统清除且Cas9蛋白被细胞摄取后,由于较高的分子量和较大的流体力学体积而表现出极低的溶酶体逃逸效率^[107].综上所述,对Cas9蛋白进行直接递送仍呈现极大的难度.

将Cas9蛋白直接进行递送并实现基因组的高效编辑必不可少的两个条件分别是:载体协助Cas9蛋白成功实现细胞内递送以及高效的溶酶体逃逸^[29].目前大部分基于Cas9蛋白的递送体系都是以RNP的形式进行递送,这种体系大都是将Cas9蛋白和sgRNA或crRNA和tracrRNA的复合体同步递送^[62].负载Cas9蛋白的纳米递送系统可协助Cas9蛋白进入目标细胞,在对靶点进行切割后可立即通过内源性蛋白酶进行快速降解以实现更高的基因编辑效率和更低的脱靶效应.然而,我们尚不清楚是将Cas9蛋白和sgRNA复合之后进行递送还是分别递送拥有更高的基因编辑效率.因此应在未来的研究中进一步深入探讨这两种模式的优缺点,以便合理优化基因编辑的效率.

通常,蛋白质主要有三种递送方式:蛋白质与载体的直接缀合、蛋白质与载体基于电荷或亲疏水作用的物理吸附以及基于乳液分散所形成的蛋白质纳米胶囊.最常见的促进细胞对蛋白质摄取的策略包括用化学的方法在蛋白质表面修饰细胞穿膜肽或用生物的方法将蛋白质与转导结构域进行遗传融合.然而,对蛋白质进行共价结合一般都是非特异性的,大多数情况下都会由于化学修饰而影响蛋白的生物活性.为了避免生物活性的损失,研究者开发出基于蛋白质和载体间的静电作用或范德华相互作用进行非共价组装^[108],水/油/水(w/o/w)双乳化包覆的方式也已大量用于蛋白质递送^[109].作为保护蛋白质免受血液中胰蛋白酶降解、单核系统清除和生物环境诱导变性的屏障,常用于递送蛋白质的纳米载体包括胶体纳米颗粒(如脂质体和固体脂质纳米颗粒)、聚合物纳米材料(如聚合物膜、纳米胶囊以及胶束)、无机纳米载体(如碳纳米管、量子点、介孔二氧化硅、磁性纳米颗粒、金纳米颗粒、金属有机框架、黑磷纳米片)等^[88,92,97,98].我们认为现有的蛋白质递送平台将为Cas9蛋白和RNP递送提供巨大潜力.然而,在设计递送系统时应根据Cas9蛋

图 3 用于递送编码Cas9蛋白的mRNA的非病毒载体^[93,95,96] (网络版彩图)

Figure 3 Non-viral vector for delivery of mRNA encoding the Cas9 protein^[93,95,96] (color online).

白(正电)和RNP(负电)不同的表面电位分别进行设计^[87]. Sun等^[87]用DNA纳米链作为基质,通过滚环扩增的方法形成了DNA纳米颗粒,实现了对Cas9蛋白和sgRNA的协同递送.这种生物学的方法在保证细胞生物活性的同时,实现了对靶标基因的剪切(图4(a)). Ray等^[88]采用精氨酸涂覆的金纳米颗粒作为载体,将CRISPR/Cas9系统高效递送到了巨噬细胞中,成功制备了SIRP-a缺失的巨噬细胞(图4(b)). SIRP-a的缺失解除了肿瘤细胞表面糖基化及基因突变所带来的免疫耐受,实现了对巨噬细胞的二次激活,并完成了对肿瘤细胞的高效杀伤. Wang等^[81]采用交联或非交联的人工合成聚合物作为载体(图4(c)),成功实现了对呈负电的pDNA、mRNA、RNP等物质的负载,并实现了较lipo2000更高的转染效率、基因编辑效率及较高的生物相容性.

由于Cas9蛋白在细胞内部行使基因编辑的功能,因此在递送Cas9蛋白时能够实现细胞膜的穿越和细胞核的靶向是极为重要的. Mout等^[92]通过对Cas9蛋白进行核定位信号肽(nuclear localization signal peptide, NLS)修饰, NLS能够辅助Cas9蛋白和RNP向细胞核转运(图4(d)). 实现体内的安全高效基因组编辑应找到实

现Cas9蛋白在血液中的稳定性及在细胞内高效释放二者的平衡性. 综上所述,针对Cas9蛋白递送的过程,设计出一种精确的“按需”刺激响应性系统是非常有必要的. 我们认为基于非病毒载体的Cas9蛋白和RNP递送的持续改进将促进CRISPR/Cas9系统成为基础研究和临床基因治疗最有效的平台之一.

5 非病毒载体递送CRISPR/Cas9系统面临的障碍

非病毒载体递送的CRISPR/Cas9系统在静脉给药后,需在血液长循环过程中保持稳定性,到达特定微环境后可跨越细胞膜屏障,并促进细胞摄取和溶酶体逃逸. 对于pDNA而言,更需协助pDNA向细胞核转运以完成蛋白质的转录. 在体内应用中,进入细胞的第一层屏障是静脉注射后血液中的各种核酸酶/蛋白酶以及单核吞噬系统. 外源性蛋白的体内半衰期在几分钟和数小时之间,未经修饰的pDNA在数分钟内就会被完全降解,而mRNA在体内甚至在几秒内就会被完全降解^[110]. 聚合物对sgRNA/Cas9蛋白的mRNA进行复合,可在极大程度上保护mRNA免受核酸酶的降解.

图4 用于递送Cas9蛋白/sgRNA的非病毒载体及Cas9蛋白的功能化修饰^[81,87,88,92] (网络版彩图)

Figure 4 Non-viral vector for delivery of Cas9 protein/sgRNA and functional engineering of Cas9 protein ^[81,87,88,92] (color online).

然而pDNA、mRNA一般都呈负电性,用于pDNA及mRNA复合的一般都是阳离子型聚合物或脂质体,所形成的纳米粒子在体内循环的过程中易受到宿主免疫系统的识别及清除。如何免受网状内皮系统(reticuloendothelial system, RES)的识别及清除便成为CRISPR/Cas9系统递送的第二个问题。对负载CRISPR/Cas9系统的纳米粒子进行PEG化或两性材料修饰是解决RES清除的良好办法,这是因为PEG及两性粒子的表面化修饰能在纳米粒子表面形成水合层,从而保护Cas9蛋白、pDNA及mRNA免受胰酶或蛋白酶降解、免受单核吞噬系统及宿主免疫系统的清除并大幅度提高血液长循环时间。那么,如何实现该纳米粒子在特定位置的富集便成为了CRISPR/Cas9体系体内应用所面临的下一步障碍。研究发现,实体瘤组织中血管丰富、血管壁间隙较宽、结构完整性差,会造成大分子物质和脂质颗粒具有选择高通透性和滞留性效应(retention and permeability effects, EPR)。利用实体瘤附近血

管的EPR效应所带来的被动靶向或功能性配体所带来的主动靶向均可协助纳米粒子在特定部位的富集。当从组织水平细化到细胞水平时,我们发现纳米粒子从血管中渗透出来之后,必须跨越来自上皮细胞、内皮细胞以及呈负电性的细胞外基质所带来的清除及阻断作用后,才能实现对CRISPR/Cas9系统的高效递送。负载CRISPR/Cas9系统的纳米粒子的流体力学体积越小在实现高血管通透性和高组织穿透性过程中的优越性就越大。由于核酸都是分子量较大且亲水性较好的阴离子型分子,所以穿越由磷脂双分子层所构成的呈疏水性的细胞膜同样是CRISPR/Cas9系统递送过程中存在的问题。在纳米粒子成功地靶向细胞之后,协助pDNA、mRNA、Cas9蛋白及sgRNA进行溶酶体逃逸在载体的功能设计过程中也是必不可少的。载体在协助pDNA、mRNA、Cas9蛋白及sgRNA进行溶酶体逃逸之后,必须将pDNA转运至细胞核中才能完成对Cas9蛋白的翻译。然而,细胞质在被大量的蛋白、微

管及其他细胞器压缩后成为阻碍载体在细胞内运动的一大困扰. 综上, 非病毒载体用于CRISPR/Cas9系统的递送时仍然存在的多个亟待解决的障碍.

6 总结与展望

CRISPR/Cas9系统只需要使用sgRNA和Cas9蛋白便可实现对目标DNA的识别和精确编辑, 在设计简单性和功能的多样性方面要明显优于其他基因编辑技术. 这种精确有效的基因编辑工具通过不断的发展已经涵盖了包括疾病建模到治疗诊断在内的各项应用. 然而CRISPR/Cas9体系在进行基因编辑时所固有的脱靶效应严重制约了该体系在体内的应用. 所以在将该体系推广至人体应用前应该增加CRISPR/Cas9系统的剪切特异性. 例如, 应用蛋白质工程以改善Cas9蛋白的特异性, 或是利用小分子拮抗剂来实现对Cas9蛋白活性的开关控制. 此外, 也可借助生物信息学的方法对

sgRNA进行编辑, 以改善Cas9蛋白复合体对DNA识别的特异性. 人们尚不清楚Cas9蛋白在细胞内的表达是否引起了潜在的宿主免疫应答反应, 因此限制给药剂量、降低给药次数、提高编辑效率可能是将来最小化其免疫原性的有效策略.

目前, 使用CRISPR/Cas9系统进行基因编辑所面临的主要挑战是将该系统有效地递送至目的细胞中. 非病毒载体在CRISPR/Cas9系统的体内应用中将起到关键作用. 与编码Cas9蛋白的pDNA或mRNA不同, 对Cas9蛋白/sgRNA直接进行递送可以避免细胞核对CRISPR/Cas9系统翻译过程中的非预期整合、最大化降低脱靶效应以实现目标基因的高效编辑. 然而负载Cas9蛋白的纳米粒子在保持蛋白生物活性的同时很难保护其免受血液中胰酶降解和单核系统清除. 与pDNA或mRNA相比, 可供选择的蛋白质载体少之又少, 因此发展能够克服Cas9蛋白所固有问题的非病毒载体将极可能把CRISPR/Cas9技术的应用推向另一高度.

参考文献

- Horvath P, Barrangou R. *Science*, 2010, 327: 167–170
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. *Science*, 2013, 339: 819–823
- Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. *Nature*, 2012, 482: 331–338
- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. *J Bacteriol*, 1987, 169: 5429–5433
- Jansen R, Embden JDA, Gaastra W, Schouls LM. *Mol Microbiol*, 2002, 43: 1565–1575
- Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. *J Mol Evol*, 2005, 60: 174–182
- Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. *Microbiology*, 2005, 96: 653–663
- Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. *Microbiology*, 2005, 22: 2551–2561
- Brouns SJJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuys RJH, Snijders APL, Dickman MJ, Makarova KS, Koonin EV, van der Oost J. *Science*, 2008, 321: 960–964
- Marraffini LA, Sontheimer EJ. *Science*, 2008, 322: 1843–1845
- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. *Science*, 2007, 315: 1709–1712
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. *Science*, 2012, 337: 816–821
- Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. *Science*, 2013, 339: 823–826
- Hwang WY, Fu Y, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, Peterson RT, Yeh JRJ, Joung JK. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 227–229
- Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R. *Cell*, 2013, 153: 910–918
- Niu Y, Shen B, Cui Y, Chen Y, Wang J, Wang L, Kang Y, Zhao X, Si W, Li W, Xiang AP, Zhou J, Guo X, Bi Y, Si C, Hu B, Dong G, Wang H, Zhou Z, Li T, Tan T, Pu X, Wang F, Ji S, Zhou Q, Huang X, Ji W, Sha J. *Cell*, 2014, 156: 836–843
- Chen Y, Zheng Y, Kang Y, Yang W, Niu Y, Guo X, Tu Z, Si C, Wang H, Xing R, Pu X, Yang SH, Li S, Ji W, Li XJ. *Human Mol Genet*, 2015, 24: 3764–3774
- Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, Barrangou R, Brouns SJJ, Charpentier E, Haft DH, Horvath P, Moineau S, Mojica FJM, Terns RM, Terns MP, White MF, Yakunin AF, Garrett RA, van der Oost J, Backofen R, Koonin EV. *Nat Rev Micro*, 2015, 13: 722–736

- 19 van der Oost J, Westra ER, Jackson RN, Wiedenheft B. *Nat Rev Micro*, 2014, 12: 479–492
- 20 Gasiunas G, Sinkunas T, Siksnys V. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71: 449–465
- 21 Doudna JA, Charpentier E. *Science*, 2014, 346: 1258096
- 22 Garneau JE, Dupuis MÈ, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, Fremaux C, Horvath P, Magadán AH, Moineau S. *Nature*, 2010, 468: 67–71
- 23 Sapranaukas R, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. *Nucl Acids Res*, 2011, 39: 9275–9282
- 24 Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: E2579–E2586
- 25 Hsu PD, Lander ES, Zhang F. *Cell*, 2014, 157: 1262–1278
- 26 Yosef I, Goren MG, Qimron U. *Nucl Acids Res*, 2012, 40: 5569–5576
- 27 Shen B, Zhang W, Zhang J, Zhou J, Wang J, Chen L, Wang L, Hodgkins A, Iyer V, Huang X, Skarnes WC. *Nat Methods*, 2014, 11: 399–402
- 28 Natarajan L, Li P, Allen C, Peshwa MV. *Cytotherapy*, 2014, 36: 37
- 29 Kim S, Kim D, Cho SW, Kim J, Kim JS. *Genome Res*, 2014, 24: 1012–1019
- 30 Qin W, Dion SL, Kutny PM, Zhang Y, Cheng AW, Jillette NL, Malhotra A, Geurts AM, Chen YG, Wang H. *Genetics*, 2015, 200: 423–430
- 31 Gori JL, Hsu PD, Maeder ML, Shen S, Welstead GG, Bumcrot D. *Human Gene Ther*, 2015, 26: 443–451
- 32 D'Astolfo DS, Pagliero RJ, Pras A, Karthaus WR, Clevers H, Prasad V, Lebbink RJ, Rehmann H, Geijsen N. *Cell*, 2015, 161: 674–690
- 33 Katz MG, Fargnoli AS, Williams RD, Bridges CR. *Human Gene Ther*, 2013, 24: 914–927
- 34 Tebas P, Stein D, Tang WW, Frank I, Wang SQ, Lee G, Spratt SK, Surosky RT, Giedlin MA, Nichol G, Holmes MC, Gregory PD, Ando DG, Kalos M, Collman RG, Binder-Scholl G, Plesa G, Hwang WT, Levine BL, June CH. *N Engl J Med*, 2014, 370: 901–910
- 35 Thummel R, Bai S, Sarra Jr. MP, Song P, Zhang X, Hyde DR, Godwin R. *Dev Biol*, 2006, 295: 356
- 36 Nakamura H, Katahira T, Sato T, Watanabe Y, Funahashi JI. *Mech Dev*, 2004, 121: 1137–1143
- 37 Matano M, Date S, Shimokawa M, Takano A, Fujii M, Ohta Y, Watanabe T, Kanai T, Sato T. *Nat Med*, 2015, 21: 256–262
- 38 Platt RJ, Chen S, Zhou Y, Yim MJ, Swiech L, Kempton HR, Dahlman JE, Parnas O, Eisenhaure TM, Jovanovic M, Graham DB, Jhunjhunwala S, Heidenreich M, Xavier RJ, Langer R, Anderson DG, Hacohen N, Regev A, Feng G, Sharp PA, Zhang F. *Cell*, 2014, 159: 440–455
- 39 Maresch R, Mueller S, Veltkamp C, Öllinger R, Friedrich M, Heid I, Steiger K, Weber J, Engleitner T, Barenboim M, Klein S, Louzada S, Banerjee R, Strong A, Stauber T, Gross N, Geumann U, Lange S, Ringelhan M, Varela I, Unger K, Yang F, Schmid RM, Vassiliou GS, Braren R, Schneider G, Heikenwalder M, Bradley A, Saur D, Rad R. *Nat Commun*, 2016, 7: 10770
- 40 Johansen AK, Molenaar B, Versteeg D, Leitoguinho AR, Demkes C, Spanjaard B, de Ruiter H, Akbari Moqadam F, Kooijman L, Zentilin L, Giacca M, van Rooij E. *Circ Res*, 2017, 121: 1168–1181
- 41 Ding Q, Regan SN, Xia Y, Oostrom LA, Cowan CA, Musunuru K. *Cell Stem Cell*, 2013, 12: 393–394
- 42 Mali P, Aach J, Stranges PB, Esvelt KM, Moosburner M, Kosuri S, Yang L, Church GM. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 833–838
- 43 Fei JF, Knapp D, Schuez M, Murawala P, Zou Y, Pal Singh S, Drechsel D, Tanaka EM. *npj Regen Med*, 2016, 1: 16002
- 44 Lin SR, Yang HC, Kuo YT, Liu CJ, Yang TY, Sung KC, Lin YY, Wang HY, Wang CC, Shen YC, Wu FY, Kao JH, Chen DS, Chen PJ. *Mol Ther-Nucl Acids*, 2014, 3: e186
- 45 Dever DP, Bak RO, Reinisch A, Camarena J, Washington G, Nicolas CE, Pavel-Dinu M, Saxena N, Wilkens AB, Mantri S, Uchida N, Hendel A, Narla A, Majeti R, Weinberg KI, Porteus MH. *Nature*, 2016, 539: 384–389
- 46 Gaj T, Ojala DS, Ekman FK, Byrne LC, Limsirichai P, Schaffer DV. *Sci Adv*, 2017, 3: eaar3952
- 47 Xiao JL, Hui YX, Zun PK, Jin LC, Li JJ. *J Med Genet*, 2015, 52: 289–296
- 48 Sánchez-Rivera FJ, Jacks T. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15: 387–393
- 49 Castillo A. *Colomb Med*, 2016, 47: 178–180
- 50 Maddalo D, Manchado E, Concepcion CP, Bonetti C, Vidigal JA, Han YC, Ogdowski P, Crippa A, Rekhtman N, de Stanchina E, Lowe SW, Ventura A. *Nature*, 2014, 516: 423–427
- 51 Chu VT, Weber T, Wefers B, Wurst W, Sander S, Rajewsky K, Kühn R. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 543–548
- 52 Yu C, Liu Y, Ma T, Liu K, Xu S, Zhang Y, Liu H, La Russa M, Xie M, Ding S, Qi LS. *Cell Stem Cell*, 2015, 16: 142–147
- 53 Yang H, Wang H, Shivalila CS, Cheng AW, Shi L, Jaenisch R. *Cell*, 2013, 154: 1370–1379
- 54 Maruyama T, Dougan SK, Truttmann MC, Bilate AM, Ingram JR, Ploegh HL. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 538–542
- 55 He X, Tan C, Wang F, Wang Y, Zhou R, Cui D, You W, Zhao H, Ren J, Feng B. *Nucl Acids Res*, 2016, 44: e85

- 56 Suzuki K, Tsunekawa Y, Hernandez-Benitez R, Wu J, Zhu J, Kim EJ, Hatanaka F, Yamamoto M, Araoka T, Li Z, Kurita M, Hishida T, Li M, Aizawa E, Guo S, Chen S, Goebel A, Soligalla RD, Qu J, Jiang T, Fu X, Jafari M, Esteban CR, Berggren WT, Lajara J, Nuñez-Delicado E, Guillen P, Campistol JM, Matsuzaki F, Liu GH, Magistretti P, Zhang K, Callaway EM, Zhang K, Belmonte JCI. *Nature*, 2016, 540: 144–149
- 57 Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. *Nat Protoc*, 2013, 8: 2281–2308
- 58 Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, Sander JD. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 822–826
- 59 Cradick TJ, Fine EJ, Antico CJ, Bao G. *Nucl Acids Res*, 2013, 41: 9584–9592
- 60 Li L, Allen C, Natarajan P, Peshwa MV. *Cytotherapy*, 2014, 16: S37
- 61 Woo JW, Kim J, Kwon SI, Corvalán C, Cho SW, Kim H, Kim SG, Kim ST, Choe S, Kim JS. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 1162–1164
- 62 Schumann K, Lin S, Boyer E, Simeonov DR, Subramaniam M, Gate RE, Haliburton GE, Ye CJ, Bluestone JA, Doudna JA, Marson A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 10437–10442
- 63 Anderson W. *Science*, 1984, 226: 401–409
- 64 Capecchi MR. *Cell*, 1980, 22: 479–488
- 65 Graessmann M, Graessmann A. *Methods Enzymol*, 1983, 101: 482–492
- 66 Kimura Y, Hisano Y, Kawahara A, Higashijima SI. *Sci Rep*, 2014, 4: 6545–6552
- 67 Ma Y, Shen B, Zhang X, Lu Y, Chen W, Ma J, Huang X, Zhang L. *PLoS ONE*, 2014, 9: e89413
- 68 Yang D, Xu J, Zhu T, Fan J, Lai L, Zhang J, Chen YE. *J Mol Cell Biol*, 2014, 6: 97–99
- 69 Crispo M, Mulet AP, Tesson L, Barrera N, Cuadro F, dos Santos-Neto PC, Nguyen TH, Crénéguy A, Brusselle L, Anegón I, Menchaca A. *PLoS ONE*, 2015, 10: e0136690
- 70 Horii T, Tamura D, Morita S, Kimura M, Hatada I. *Inter J Mol Sci*, 2013, 14: 19774–19781
- 71 Ye L, Wang J, Beyer AI, Teque F, Cradick TJ, Qi Z, Chang JC, Bao G, Muench MO, Yu J, Levy JA, Kan YW. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 9591–9596
- 72 Goodwin T, Huang L. *Adv Genet*, 2014, 88: 1–12
- 73 Xue W, Chen S, Yin H, Tammela T, Papagiannakopoulos T, Joshi NS, Cai W, Yang G, Bronson R, Crowley DG, Zhang F, Anderson DG, Sharp PA, Jacks T. *Nature*, 2014, 514: 380–384
- 74 Schwank G, Koo BK, Sasselli V, Dekkers JF, Heo I, Demircan T, Sasaki N, Boymans S, Cuppen E, van der Ent CK, Nieuwenhuis EES, Beekman JM, Clevers H. *Cell Stem Cell*, 2013, 13: 653–658
- 75 Tlaxca JL, Rychak JJ, Ernst PB, Konkalmatt PR, Shevchenko TI, Pizarro TT, Pizzaro TT, Rivera-Nieves J, Klibanov AL, Lawrence MB. *J Control Release*, 2013, 165: 216–225
- 76 Tirlapur UK, König K. *Nature*, 2002, 418: 290–291
- 77 Li L, Song L, Liu X, Yang X, Li X, He T, Wang N, Yang S, Yu C, Yin T, Wen Y, He Z, Wei X, Su W, Wu Q, Yao S, Gong C, Wei Y. *ACS Nano*, 2017, 11: 95–111
- 78 Zhang Z, Wan T, Chen Y, Chen Y, Sun H, Cao T, Songyang Z, Tang G, Wu C, Ping Y, Xu FJ, Huang J. *Macromol Rapid Commun*, 2018, 331: 1800068
- 79 Wightman L, Kircheis R, Rössler V, Carotta S, Ruzicka R, Kursu M, Wagner E. *J Gene Med*, 2001, 3: 362–372
- 80 Francis SM, Taylor CA, Tang T, Liu Z, Zheng Q, Dondero R, Thompson JE. *Mol Ther*, 2014, 22: 1643–1652
- 81 Wang Y, Ma B, Abdeen AA, Chen G, Xie R, Saha K, Gong S. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10: 31915–31927
- 82 Zhang H, Bahamondez-Canas TF, Zhang Y, Leal J, Smyth HDC. *Mol Pharm*, 2018, 15: 4814–4826
- 83 Kiang T, Wen J, Lim HW, Leong KW. *Biomaterials*, 2004, 25: 5293–5301
- 84 Shakiba A, Patil SL, Zenasni O, Schmitt ME, Gunaratne PH, Lee TR. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9: 23370–23378
- 85 Liu Q, Zhao K, Wang C, Zhang Z, Zheng C, Zhao Y, Zheng Y, Liu C, An Y, Shi L, Kang C, Liu Y. *Adv Sci*, 2018, 154: 1801423
- 86 Wang HX, Song Z, Lao YH, Xu X, Gong J, Cheng D, Chakraborty S, Park JS, Li M, Huang D, Yin L, Cheng J, Leong KW. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: 4903–4908
- 87 Sun W, Ji W, Hall JM, Hu Q, Wang C, Beisel CL, Gu Z. *Angew Chem*, 2015, 127: 12197–12201
- 88 Ray M, Lee YW, Hardie J, Mout R, Yeşilbag Tonga G, Farkas ME, Rotello VM. *Bioconj Chem*, 2018, 29: 445–450
- 89 Hansen-Bruhn M, de Ávila BEF, Beltrán-Gastélum M, Zhao J, Ramírez-Herrera DE, Angsantikul P, Vesterager Gothelf K, Zhang L, Wang J. *Angew Chem Int Ed*, 2018, 57: 2657–2661

- 90 Wang P, Zhang L, Zheng W, Cong L, Guo Z, Xie Y, Wang L, Tang R, Feng Q, Hamada Y, Gonda K, Hu Z, Wu X, Jiang X. *Angew Chem Int Ed*, 2018, 57: 1491–1496
- 91 Lee K, Conboy M, Park HM, Jiang F, Kim HJ, Dewitt MA, Mackley VA, Chang K, Rao A, Skinner C, Shobha T, Mehdipour M, Liu H, Huang WC, Lan F, Bray NL, Li S, Corn JE, Kataoka K, Doudna JA, Conboy I, Murthy N. *Nat Biomed Eng*, 2017, 1: 889–901
- 92 Mout R, Ray M, Yesilbag Tonga G, Lee YW, Tay T, Sasaki K, Rotello VM. *ACS Nano*, 2017, 11: 2452–2458
- 93 Yin H, Song CQ, Dorkin JR, Zhu LJ, Li Y, Wu Q, Park A, Yang J, Suresh S, Bizhanova A, Gupta A, Bolukbasi MF, Walsh S, Bogorad RL, Gao G, Weng Z, Dong Y, Kotliansky V, Wolfe SA, Langer R, Xue W, Anderson DG. *Nat Biotechnol*, 2016, 34: 328–333
- 94 Kormann MSD, Hasenpusch G, Aneja MK, Nica G, Flemmer AW, Herber-Jonat S, Huppmann M, Mays LE, Illenyi M, Schams A, Griesse M, Bittmann I, Handgretinger R, Hartl D, Rosenecker J, Rudolph C. *Nat Biotechnol*, 2011, 29: 154–157
- 95 Zhang X, Li B, Luo X, Zhao W, Jiang J, Zhang C, Gao M, Chen X, Dong Y. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9: 25481–25487
- 96 Miller JB, Zhang S, Kos P, Xiong H, Zhou K, Perelman SS, Zhu H, Siegwart DJ. *Angew Chem*, 2017, 129: 1079–1083
- 97 Alsaiani SK, Patil S, Alyami M, Alamoudi KO, Aleisa FA, Merzaban JS, Li M, Khashab NM. *J Am Chem Soc*, 2018, 140: 143–146
- 98 Zhou W, Cui H, Ying L, Yu XF. *Angew Chem Int Ed*, 2018, 57: 10268–10272
- 99 Suresh B, Ramakrishna S, Kim H. *Methods Mol Biol*, 2017, 1507: 81–94
- 100 Worthen C, Rittié L, Fisher G. *Methods Mol Biol*, 2017, 1627: 245–251
- 101 Zhang L, Wang P, Feng Q, Wang N, Chen Z, Huang Y, Zheng W, Jiang X. *NPG Asia Mater*, 2017, 9: e441
- 102 Zuris JA, Thompson DB, Shu Y, Guilinger JP, Bessen JL, Hu JH, Maeder ML, Joung JK, Chen ZY, Liu DR. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 73–80
- 103 Kim SM, Yang Y, Oh SJ, Hong Y, Seo M, Jang M. *J Control Release*, 2017, 266: 8–16
- 104 Huang M, Fong CW, Khor E, Lim LY. *J Control Release*, 2005, 106: 391–406
- 105 Konstan MW, Davis PB, Wagener JS, Hilliard KA, Stern RC, Milgram LJH, Kowalczyk TH, Hyatt SL, Fink TL, Gedeon CR, Oette SM, Payne JM, Muhammad O, Ziady AG, Moen RC, Cooper MJ. *Human Gene Ther*, 2004, 15: 1255–1269
- 106 Mahiny AJ, Dewerth A, Mays LE, Alkhaled M, Mothes B, Malaeksefat E, Loretz B, Rottenberger J, Brosch DM, Reautschnig P, Surapolchai P, Zeyer F, Schams A, Carevic M, Bakele M, Griesse M, Schwab M, Nürnberg B, Beer-Hammer S, Handgretinger R, Hartl D, Lehr CM, Kormann MSD. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 584–586
- 107 Ain QU, Chung JY, Kim YH. *J Control Release*, 2015, 205: 120–127
- 108 Gu Z, Biswas A, Zhao M, Tang Y. *Chem Soc Rev*, 2011, 40: 3638–3655
- 109 Cardenas-Bailon F, Osorio-Revilla G, Gallardo-Velazquez T. *J Microencapsulation*, 2015, 32: 1–9
- 110 Kontermann RE. *Curr Opin Biotech*, 2011, 22: 868–876

Research progress on non-viral vectors of CRISPR/Cas9 system

Qi Liu[†], Zhanzhan Zhang[†], Yang Liu^{*}

State Key Laboratory of Medicinal Chemical Biology; Key Laboratory of Functional Polymer Materials of Ministry of Education, College of Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China

[†]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author (email: yliu@nankai.edu.cn)

Abstract: In recent years, clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR associated protein 9 (Cas9) system has become one of the most powerful technologies in biomedical research and shown great potentials in the establishment of disease models as well as the development of new treatments. However, efficient delivery of CRISPR/Cas9 systems to target organs and cells remains challenging. With the rapid development of non-viral vectors, nanocarriers based on liposomes, polymers, and inorganic nanoparticles have shown great potentials for the delivery of CRISPR/Cas9 systems. In this review, we first summarize the potential of the CRISPR/Cas9 system in disease modeling and disease treatment, as well as the limitations. The advantages and disadvantages of delivering the CRISPR/Cas9 system in the form of plasmid DNA, mRNA or protein are then analyzed and the non-viral vectors that have emerged are reviewed. Finally, we summarize the key barriers currently faced by non-viral vectors in the delivery of CRISPR/Cas9 systems and propose strategies that are expected to overcome them.

Keywords: CRISPR/Cas9, gene editing, non-viral vector, drug delivery, nanomedicine

doi: [10.1360/N032018-00233](https://doi.org/10.1360/N032018-00233)