

非病毒纳米载体递送 CRISPR/Cas9 的研究进展

吕丹^{1,2}, 谭志霞^{1,2,3}, 许龙¹, 吴秀山², 叶湘漓^{1,2*}

(1. 湖南师范大学 医学院, 中国湖南 长沙 410003; 2. 湖南师范大学 生命科学学院 心脏发育研究中心, 中国湖南 长沙 410081; 3. 长沙市第九医院, 中国湖南 长沙 410004)

摘要: 成簇规则间隔的短回文重复序列及其相关蛋白 9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR-associated protein 9, CRISPR/Cas9) 技术目前广泛应用于生命医学领域的基础研究及临床应用研究。由于载体在 CRISPR/Cas9 技术中发挥了重要的作用, 如何进一步开发和优化载体系统具有重要的意义。传统的载体大多以病毒载体为主, 其递送的效率高, 但亦存在插入片段的大小有限、免疫反应、致癌、难以大规模生产甚至脱靶等缺陷; 而非病毒纳米载体在一定程度上可解决基因编辑过程中由病毒载体所带来的潜在毒性和容量限制等问题, 可能具有更广阔的应用前景。本文主要综述了目前用于 CRISPR/Cas9 系统递送的非病毒纳米载体, 探讨了非病毒纳米载体在递送 CRISPR/Cas9 系统时可能遇到的主要困难, 提出了相应的解决方案和策略, 以期能为基因治疗和药物研发提供新的参考依据。

关键词: 成簇规则间隔的短回文重复序列及其相关蛋白 9 (CRISPR/Cas9); 非病毒纳米载体; 病毒载体; 基因编辑; 基因治疗

中图分类号: Q78

文献标志码: A

文章编号: 1007-7847(2023)04-0371-06

Research Progress on Non-viral Nanocarrier Delivery of CRISPR/Cas9

LÜ Dan^{1,2}, TAN Zhixia^{1,2,3}, XU Long¹, WU Xiushan², YE Xiangli^{1,2*}

(1. College of Medicine, Hunan Normal University, Changsha 410003, Hunan, China; 2. The Center for Heart Development, College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China; 3. Changsha Ninth Hospital, Changsha 410004, Hunan, China)

Abstract: Clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR-associated protein 9 (CRISPR/Cas9) technology is currently widely used in both basic and clinical application research of medicine. Since vectors play an important role in CRISPR/Cas9 technology, further developing and optimizing vector systems is of great significance. Most of the traditional vectors are viral vectors, which have high delivery efficiency, but with defects such as limited insert size, induction of immune response, carcinogenicity, difficulty in large-scale production and even off-target. Non-viral nanocarriers can solve, to some extent, the potential toxicity and capacity limitations caused by viral vectors during gene editing, and may have broader application prospects. This paper reviews the non-viral nanocarriers currently used for CRISPR/Cas9 system delivery, including main difficulties that non-viral nanocarriers may encounter in delivering CRISPR/Cas9 systems, and corresponding solutions and strategies, in order to provide a new reference for gene therapy and drug development.

Key words: clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR-associated protein 9 (CRISPR/Cas9); non-viral nanocarrier; viral vector; gene editing; gene therapy

(Life Science Research, 2023, 27(4): 371-376)

收稿日期: 2022-07-12; 修回日期: 2022-11-12; 网络首发日期: 2023-03-15

基金项目: 湖南省发育生物学与生物育种优势特色学科交叉研究项目(2022XKQ0205); 湖南省教育厅科学研究重点项目(18A028); 湖南省卫生健康委员会重点项目(202201065690); 湖南省普通高等学校教学改革研究项目(HNJG-2020-1286); 湖南师范大学基层教学组织建设项目(202101003015)

作者简介: 吕丹(1994—), 女, 湖南衡阳人, 硕士研究生, 主要从事分子发育遗传学研究; *通信作者: 叶湘漓(1970—), 男, 湖南长沙人, 教授, 硕士生导师, 主要从事人类心脏发育及其心血管疾病相关基因的筛选及功能研究, E-mail: ye_xiangli@hunnu.edu.cn.

成簇规则间隔的短回文重复序列及其相关蛋白 9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR-associated protein 9, CRISPR/Cas9)系统是近年来生命医学领域最重要的革命性技术之一,它能够精确地改变生物体的 DNA,对于寻找各种疾病(如癌症、艾滋病等)的新疗法以及培育植物新品种等具有划时代的意义^[1]。不过,如何将 CRISPR/Cas9 系统有效地递送至靶细胞仍然是一个难题,目前人们主要采用病毒载体和非病毒纳米载体两种方式进行递送^[2]。病毒载体(如慢病毒、腺病毒等)属于最早被开发的递送技术,兴起于 20 世纪 90 年代,其递送的效率高,但存在潜在的免疫原性、插入突变以及较高的脱靶效应等风险,这限制了其进一步应用^[3-4]。非病毒纳米载体,如脂质纳米颗粒(lipid nanoparticle, LNP)、聚合物纳米颗粒(polymeric nanoparticle, PNP)、金纳米颗粒(gold nanoparticle, Au-NP)、生物膜类纳米粒子的细胞外囊泡(extracellular vesicle, EV)等,则可能有效地解决病毒载体带来的潜在毒性及容量限制等问题,且具有简单易得、成本较低、安全等优点,使基因编辑技术具备了更加广阔的应用前景^[5-6]。

1 非病毒纳米载体的主要类型

1.1 脂质纳米颗粒

脂质纳米颗粒是目前最有效的非病毒纳米载体递送系统之一,目前几种脂质载体已被批准用于基因治疗的临床试验^[7]。脂质纳米颗粒将带有供体物质的 CRISPR/Cas9 系统递送到体内,能有效地保护供体物质不被降解^[8]。CRISPR/Cas9 的基因编辑可以通过质粒 DNA、RNA 和蛋白质来实现,这些形式均可有效地封装到脂质纳米颗粒中。通常,单链向导 RNA (single guide RNA, sgRNA)是带负电荷的,而 Cas9 蛋白带正电荷;带负电的 CRISPR 被阳离子脂质吸引形成脂质纳米颗粒;脂质层不但可以帮助 CRISPR 成分穿过细胞膜,还可以使其免受核糖核酸酶的降解和免疫反应的干扰^[9]。

现阶段,阳离子脂质递送系统已广泛应用于生物大分子,如质粒 DNA、mRNA 和干扰小 RNA (small interfering RNA, siRNA)。商业化出售的脂质纳米颗粒是一种成熟的递送载体,如 Lipofectamine™ RNAiMAX 以及脂质体 Lipofectamine 2000,它们可以与多种细胞系结合,并可用于基因治疗或基因敲除模型的建立^[10]。有研究利用以阳离子

脂质为基础的递送机制,将带有负电荷的 Cas9 核糖核蛋白(Cas9 ribonucleoprotein, Cas9 RNP)与 Lipofectamine 2000 共同孵育,随后递送至人骨肉瘤细胞系 U2-OS,发现即便在血清干扰的情况下,内源性绿色荧光蛋白(*green fluorescent protein, GFP*)基因的敲除率仍可达 80%^[11]。然而,阳离子脂质纳米颗粒主要通过内吞作用进入细胞,很容易在内体-溶酶体中被捕获和降解,进而降低转染效率。有研究显示,加入新型 pH 响应性荧光内体破坏表面活性剂(fluorescent endosomal disruptive surfactant, FEDS)可提高基于脂质纳米颗粒的 Cas9 RNP 递送效率,因为它可以破坏内体并识别已转染的细胞;而且,将 FEDS 掺入 Lipofectamine/Cas9-RNP 复合物中,可使荧光富集和内体的破坏相结合,让标记有 GFP 基因的人胚肾细胞(HEK 293T-GFP)的编辑效率提高至 3 倍以上^[12]。

此外, Wang 等^[13]将具有生物还原性的脂质纳米颗粒(bioreducible lipid nanoparticle, BLN)与负增压 Cre 重组酶或 Cas9 RNP 相结合,以驱动非病毒纳米载体的静电组装,从而介导基因编辑的有效递送。这些 BLN 可有效地将供体蛋白质递送至细胞内,并增强供体物质的内体逃逸功能,从而确保供体物质无误地递送至体内特定的靶位点。而且,这种与 BLN 复合的增压 Cre 蛋白和 Cas9 RNP 被递送到宿主细胞内后,可以实现 70% 以上的基因编辑有效率。

1.2 聚合物纳米颗粒

与脂质纳米颗粒相比,聚合物纳米颗粒可穿过细胞膜有效地保护供体物质免受酶的降解^[14]。此外,聚合物纳米颗粒亦因其高度生物相容性和设计的灵活性,被广泛应用于 CRISPR/Cas9 系统的体内递送^[15-16]。其中,常见的有树枝状大分子聚酰胺-胺(polyamidoamine, PAMAM)和壳聚糖(chitosan, CS)。

PAMAM 是一类具有超支化结构和高密度表面官能团的合成聚合物。为了确保 Cas9 RNP 与 PAMAM 的有效结合,有研究者利用高密度苯硼酸在 PAMAM 的表面进行功能化处理^[17]。所用的高密度苯硼酸是一种缺电子基团,通过氮-硼酸盐结合后,可有效地与蛋白质的胺基和咪唑基团相互作用,由此富含苯硼酸的 PAMAM 可以和不同等电点的蛋白质结合并产生均匀的非病毒纳米载体,其通过与 Cas9 RNP 结合可以有效地将供体物质递送到不同的细胞类型,并在不同的靶细

胞内显示出较高的编辑效率^[17]。

CS 是一种丰富的天然阳离子聚合物, 主要由甲壳素通过脱乙酰衍生的纤维素基生物聚合物组成, 具有可再生性、生物降解性、生物相容性、无毒性, 且对革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌及真菌具有广泛的抗菌活性, 因而成为基因转移和药物递送最有效的天然非病毒纳米载体之一^[18-19]。Liu 等^[20]设计了双靶向聚合物/无机杂化纳米粒子, 并利用共沉淀的方式将周期蛋白依赖性激酶 11 (*cyclin-dependent kinase 11*, *CDK11*) 基因的敲除质粒封装到由硫酸鱼精蛋白、碳酸钙、磷酸钙和羧甲基壳聚糖等组成的纳米递送核心中; 由于核酸适配体的静电作用, 这种双靶向聚合物系统可以将 CRISPR/Cas9 质粒递送至肿瘤细胞内, 并有效地敲除 *CDK11* 基因, 即 CS 通过灵活的结构设计, 并与 CRISPR/Cas9 系统一起制备, 可达到理想的基因编辑效果。此外, 有研究还利用新型苯硼酸官能化壳聚糖-聚乙烯亚胺(chitosan-polyethylenimine, CS-PEI) 载体递送 CRISPR/Cas9 系统, 以通过口服给药来降低胆固醇的含量^[21], 这种苯硼酸功能化的设计旨在增强药物在靶细胞内的稳定性, 人工优化后的 CS-PEI 多聚物配方实现了对靶蛋白的表达量下调, 并首次证明了通过口服给药的方式进行全身性基因编辑的可行性, 这为日后开展无创性药物治疗提供了新的思路。

1.3 金纳米颗粒

金纳米颗粒是一种新型的可用于 Cas9 RNP 体内递送的载体。与脂质纳米颗粒不同的是, 该载体通过 Au-S 键很容易将金纳米颗粒与含巯基物质交联, 在组装和分布上易于控制^[22]。目前, 成人脑中的基因编辑主要是利用传统的病毒载体方式递送关键基因, 但由于病毒载体的潜在毒性, 基因编辑效果往往欠佳。因此, 开发较为安全的非病毒纳米载体用于大脑的基因编辑很有必要。有研究报道, CRISPR-Gold (一种金纳米颗粒载体) 可能能够更有效且安全地编辑成年小鼠大脑中的基因, 人们可通过颅内注射 CRISPR-Gold 的方式递送供体物质以编辑成年小鼠大脑中的基因, 如: 利用 CRISPR-Gold 递送 Cas9 和 Cpf1-RNP 复合物, 可有效编辑大脑中的大部分细胞, 包括神经元、星形胶质细胞以及小胶质细胞, 安全且毒性小^[23]。此外, CRISPR-Gold 还被用于小鼠代谢型谷氨酸受体 5 基因(*mGluR5*) 敲除模型的建立, 即将敲除该基因的供体物质通过 CRISPR-Gold 递送

至颅内可有效地敲除 *mGluR5* 基因; 进一步的研究发现, 颅内 *mGluR5* 基因的敲除减少了小鼠脆性 X 综合征(一种单基因神经发育疾病, *mGluR5* 基因可能调控了该疾病的神经元连接)的神经表型重复行为^[23-24]。上述研究表明, 通过 CRISPR-Gold 的非病毒纳米载体的递送方式, 成年小鼠大脑的基因编辑可以将小鼠从神经行为缺陷中拯救出来, 并使局灶性脑敲除动物模型的快速构建成为可能。

1.4 细胞外囊泡

细胞外囊泡源于大多数细胞类型的纳米级膜囊泡, 是外泌体、微囊泡和凋亡小体的总称, 可携带多种生物大分子并参与细胞间通信。细胞外囊泡是一种天然的内源性非病毒纳米载体, 具有生物相容性高、免疫原性低及稳定性高等优点, 是目前最具发展前景的递送载体之一^[25-26]。Luo 等^[27]利用外泌体作为递送载体, 将带有供体成分的 CRISPR/Cas9 系统应用于小鼠肝脏的抗纤维化治疗: 首先, 将 Cas9 的失活变体(dCas9)融合到 VP64 反激活子结构域, 以位点特异性激活的方式介导基因表达; 其次, 将 *dCas9-VP64* 融合基因和靶向肝细胞核因子 4 α (*hepatocyte nuclear factor 4 alpha*, *HNF4 α* ; 一种导致肝脏纤维化的基因)的 sgRNA 以质粒 DNA 的形式转染到小鼠生殖细胞中; 再次, 从生殖细胞中分离外泌体, 并将其与小鼠肝脏纤维化相关的肝星状细胞孵育, 从而诱导表达 *HNF4 α* 的肝星状细胞转变成肝细胞样细胞, 结果显示小鼠的肝纤维化表型得到一定缓解。

2 非病毒纳米载体递送 CRISPR/Cas9 的关键障碍

对于 CRISPR/Cas9 系统而言, 当前紧要的任务是设计一种高效且安全的递送载体。由于生理条件下屏障难度的增加, 且用于递送 CRISPR/Cas9 系统的非病毒纳米载体会与细胞相互作用, CRISPR/Cas9 的体内有效递送并非易事。现有的非病毒纳米载体相比于病毒载体有明显的优势, 但仍然存在一些困难。

2.1 封装尺寸

通常, Cas9 蛋白、mRNA 和 DNA 的尺寸大小以及不同的电荷性质会严重影响 CRISPR/Cas9 系统在递送载体中的有效封装^[28-29]。常用的 Cas9 蛋白源于化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*), 即 SpCas9, 其分子质量约为 160 kD, 比大多数蛋白质大。此外, Cas9 蛋白带正电荷, 而常规的蛋白质

带负电荷,因此,阳离子脂质纳米颗粒或者聚合物纳米颗粒可用于封装带有负电荷的蛋白质,而不能用于递送 Cas9 蛋白的天然形式。与蛋白质相似, Cas mRNA 和 DNA 具有较大的尺寸,这也增加了封装的难度。尽管来自金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的 Cas9,即 SaCas9,因比 SpCas9 小而得以使用,但整体尺寸还是太大,不利于 CRISPR/Cas9 的体内递送。因此,在未来的非病毒纳米载体的设计中研究者必须考虑到封装尺寸问题。

2.2 宿主的免疫原性

由于外源性质粒 DNA、RNA 和蛋白质分子具有免疫原性,所以它们一旦递送至体内很可能会引发宿主的免疫反应。通常来说,将带有供体物质的 CRISPR/Cas9 系统封装到非病毒纳米载体后,宿主的免疫识别能力在一定程度上有所降低,即 CRISPR/Cas9 系统会受到非病毒纳米载体的保护,这将显著降低机体的免疫识别以及免疫清除作用。但需要注意的是,CRISPR/Cas9 的中性结构域暴露后,简单的静电屏蔽作用可能不足以抵消宿主的免疫识别清除作用。此外,非病毒纳米载体的尺寸大小、表面电荷、疏水性以及空间位阻效应等也会影响其与宿主免疫系统的相容性^[30]。有研究报道,对非病毒纳米颗粒的表面进行聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)化修饰是介导 CRISPR/Cas9 系统体内递送的常用策略之一,这可有效地维持载体的结构稳定性和延长供体物质在血液中的循环作用时间,即将 PEG 或其他亲水性聚合物附着在非病毒纳米载体的表面,可以在一定程度上保护供体物质,使其免受宿主免疫系统的识别和清除。不过,介导非病毒纳米载体表面修饰的 PEG 是一种外源性物质,宿主的免疫反应会产生抗 PEG-IgM,其可能会影响非病毒纳米载体递送供体物质的有效性和安全性^[31]。因此,为了避免 PEG 化所引起的免疫原性问题,可开发内源性大分子替代 PEG 等表面掩蔽剂,以降低机体的免疫排斥反应和延长供体物质在体内的作用时间^[32]。总的来说,非病毒纳米载体的递送相比于病毒载体还是较为安全的。

2.3 酶的降解作用

2.3.1 血液中酶的降解作用

通常,供体物质如质粒、mRNA 和蛋白质易受到血液中核酸酶及蛋白酶的影响,并在全身循环中以裸露的形式被酶迅速降解。此外,用于递送带负电荷的 Cas9 RNP 和质粒的阳离子非病毒纳

米载体,在生理条件易与血浆蛋白质以及生理盐水相互作用,从而导致网状内皮系统(reticuloendothelial system, RES)的识别和清除。基于此,有研究利用 PEG 化来降低 RES 的清除作用,实现了非病毒纳米载体对 CRISPR/Cas9 系统的体内递送^[33]。值得注意的是,PEG 化后细胞的摄取吸收会减少,非病毒纳米载体的递送效率降低。另外,还有研究设计了一种基于蛋白质的基因递送系统^[34],该递送系统选用牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)和 CS,并通过二者自组装形成纳米凝胶,以用于抗癌药物的体内递送,即通过将具有内体逃逸能力的 BSA 和低细胞毒性的递送载体相联接来实现高效率的转染。前述研究所用的血清白蛋白是一种易溶于水,在不同 pH、温度条件下均处于稳定状态,并在化学反应中易于控制的物质。因此,在未来的抗癌药物治疗中,研究人员可以考虑利用 CS 等纳米颗粒去交联 BSA 以实现 CRISPR/Cas9 系统的体内递送。

2.3.2 内体-溶酶体的降解作用

内体-溶酶体的降解作用也是 CRISPR/Cas9 体内递送的障碍之一。因此,研究人员可以利用非病毒纳米颗粒的“质子海绵效应”促进其内体-溶酶体的逃逸,避免酶的降解作用,即:非病毒纳米颗粒链上的 2°和 3°胺可在内体-溶酶体的内部进行质子化缓冲,然后平衡氯离子流入囊泡,此过程会在内体-溶酶体的内部和外部形成渗透梯度,最终导致囊泡的膨胀和破裂,进而使非病毒纳米颗粒释放至细胞质以避免供体物质的降解破坏^[35]。此外,Liu 等^[36]发现可产生气体的纳米颗粒可被用于促进内体-溶酶体的逃逸:封装有 NH_4HCO_3 的 pH 响应型 D, L-乳酸-乙醇酸共聚物[poly(D,L-lactic-co-glycolic acid), PLGA]纳米颗粒会与内溶酶体中的质子相互作用,并以产生气体(CO_2 和 NH_3)的方式破坏内体-溶酶体,使宿主内体-溶酶体中的抗原快速地逃逸到胞质溶胶中;而未封装有 NH_4HCO_3 的 pH 响应型 PLGA 纳米颗粒不能有效地与质子相互作用,因而无法快速地促进抗原释放到细胞质中。另外,有研究将一些膜融合肽类引入到非病毒纳米载体,在较低 pH 的环境下,这些膜融合肽经历了无规则螺旋构象到 α 螺旋构象的结构转换,从而可促进内体-溶酶体的逃逸^[37]。实际上,绕过内体-溶酶体直接跨膜递送供体物质进入细胞质可能是另一种策略^[38-39]。

3 总结与展望

目前,基因编辑技术主要用于疾病的病因研究及疾病的建模和治疗等方面,该技术通过改变致病基因组的 DNA 进行定向改造,尤其对于一些特殊疾病(如肿瘤和艾滋病),其可能会带来较好的临床效果,而传统的治疗方式往往效果欠佳。此外,基因编辑是永久的,且只需要向患者实施一次,可以避免其他蛋白质疗法的免疫原性和潜在毒性问题。因此,利用合适的载体将供体物质递送至体内靶细胞进行基因编辑具有非常重要的意义。

近些年,相比于传统的病毒载体,非病毒纳米载体(如脂质纳米颗粒、聚合物纳米颗粒、金纳米颗粒、生物膜类纳米粒子的细胞外囊泡等)因其低免疫原性、低毒性及低致癌率等发挥了重要的优势。不可忽视的是,尽管研究人员在过去的几十年已开发了多种非病毒纳米载体,但可用于递送 CRISPR/Cas9 系统并行之有效的非病毒纳米载体仍然较少。当前,非病毒纳米载体的应用存在诸如封装尺寸受限、血清酶的降解作用及组织相容性等障碍。此外,现阶段的非病毒纳米载体主要用于敲除相应的基因,而对于纠正某些遗传疾病的碱基置换突变的效率仍然很低,故该技术的特异性需要进一步提高,以降低潜在的脱靶可能性。

针对非病毒纳米载体当前存在的一些问题,可以从如下几方面采取对策。1) 设计条件性表达 Cas9 系统,通过引入只在靶器官表达的特异性启动子或诱导性启动子,解决 CRISPR/Cas9 系统在体内递送中所遇到的脱靶问题。2) 优化特定基因的 sgRNA 设计(打靶位点的设计以标准的基因组作为参考)和改造 Cas9 蛋白,以降低基因编辑的脱靶率。但由于个体的遗传变异和易感性不同,意想不到的脱靶问题也可能出现,所以必要的情况下需将 CRISPR/Cas9 的体内递送与宿主全基因组序列分析、sgRNA 的大规模脱靶预测、个体密集遗传毒性风险评估以及个体智能监测等手段相结合。3) 针对非病毒纳米载体表面的一些特异性化学活泼基团,可通过研发一些能模拟体内细胞性质的仿生涂层材料或者仿生膜包裹供体物质,基于固有的同源结合效应,其可有效地延长 Cas9 RNP 在宿主体内的作用时间。4) 根据细胞、组织或器官对某些特定材料进行嗜好性设计,以实现靶向递送,如基于脂质纳米颗粒的载体采用静脉

注射易于被肝细胞吸收,这成为肝细胞接受供体物质并实现基因编辑的有效方式之一^[40-41]。5) 设计具有“开关”的靶向递送系统,该“开关”可以被特定的微环境(酶活性、pH)或外部刺激条件(光、热或磁场)等调控激活,从而有效介导 CRISPR/Cas9 系统的体内递送功能。总之,具有新型生物相容性、非免疫原性且可生物降解的非病毒纳米材料是降低器官毒性和局部炎症风险的较为理想的载体,可为将来实现 CRISPR/Cas9 系统的靶向递送和临床转化注入新的动力。

参考文献(References):

- [1] GUPTA D, BHATTACHARJEE O, MANDAL D, *et al.* CRISPR/Cas9 system: a new-fangled dawn in gene editing[J]. *Life Sciences*, 2019, 232: 116636.
- [2] 潘秀华, 吴正红, 祈小乐. CRISPR/Cas9 递送系统的研究现状及应用进展[J]. *中国药科大学学报*(PAN Xiuhua, WU Zheng-hong, QI Xiaole. Research status and application progress of CRISPR/Cas9 delivery system[J]. *Journal of China Pharmaceutical University*), 2020, 51(1): 10-18.
- [3] BROEDERS M, HERRERO-HERNANDEZ P, ERNST M P T, *et al.* Sharpening the molecular scissors: advances in gene-editing technology[J]. *iScience*, 2020, 23(1): 100789.
- [4] 马跃, 邓莉, 李善刚. 纳米粒子在 CRISPR/Cas9 基因治疗中的应用[J]. *生物工程学报*(MA Yue, DENG Li, LI Shangang. Application of nanoparticles in CRISPR/Cas9-based gene therapy[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*), 2022, 38(6): 2087-2104.
- [5] KIM D, LE Q V, WU Y N, *et al.* Nanovesicle-mediated delivery systems for CRISPR/Cas genome editing[J]. *Pharmaceutics*, 2020, 12(12): 1233.
- [6] PENA S A, IYENGAR R, ESHRAGHI R S, *et al.* Gene therapy for neurological disorders: challenges and recent advancements[J]. *Journal of Drug Targeting*, 2020, 28(2): 111-128.
- [7] GHAEMI A, BAGHERI E, ABNOUS K, *et al.* CRISPR/Cas9 genome editing delivery systems for targeted cancer therapy[J]. *Life Sciences*, 2021, 267: 118969.
- [8] XU X J, WAN T, XIN H H, *et al.* Delivery of CRISPR/Cas9 for therapeutic genome editing[J]. *The Journal of Gene Medicine*, 2019, 21(7): e3107.
- [9] FILIPCZAK N, PAN J, YALAMARTY S S K, *et al.* Recent advancements in liposome technology[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2020, 156: 4-22.
- [10] ZHEN S, LI X. Liposomal delivery of CRISPR/Cas9[J]. *Cancer Gene Therapy*, 2020, 27(7/8): 515-527.
- [11] ZURIS J A, THOMPSON D B, SHU Y L, *et al.* Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing *in vitro* and *in vivo*[J]. *Nature Biotechnology*, 2015, 33(1): 73-80.
- [12] LI J, RØISE J J, ZHANG J T, *et al.* A novel fluorescent surfactant enhances the delivery of the Cas9 ribonucleoprotein and enables the identification of edited cells[J]. *Chemical Communications*, 2019, 55(31): 4562-4565.
- [13] WANG M, ZURIS J A, MENG F T, *et al.* Efficient delivery of genome-editing proteins using bioreducible lipid nanoparticles[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2016, 113(11): 2868-2873.
- [14] SALMAN A, KANTOR A, MCCLEMENTS M E, *et al.* Non-viral delivery of CRISPR/Cas cargo to the retina using nanoparticles: current possibilities, challenges, and limitations[J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(9): 1842.

- [15] VERMA R, SAHU R, SINGH D D, *et al.* A CRISPR/Cas9 based polymeric nanoparticles to treat/inhibit microbial infections[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2019, 96: 44–52.
- [16] LI L, WEI Y Q, GONG C Y. Polymeric nanocarriers for non-viral gene delivery[J]. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2015, 11(5): 739–770.
- [17] LIU C Y, WAN T, WANG H, *et al.* A boronic acid-rich dendrimer with robust and unprecedented efficiency for cytosolic protein delivery and CRISPR–Cas9 gene editing[J]. *Science Advances*, 2019, 5(6): eaaw8922.
- [18] QIAO J, SUN W L, LIN S Y, *et al.* Cytosolic delivery of CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins for genome editing using chitosan-coated red fluorescent protein[J]. *Chemical Communications*, 2019, 55(32): 4707–4710.
- [19] ABOUREHAB M A S, PRAMANIK S, ABDELGAWAD M A, *et al.* Recent advances of chitosan formulations in biomedical applications[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(18): 10975.
- [20] LIU Q, ZHAO K, WANG C, *et al.* Multistage delivery nanoparticle facilitates efficient CRISPR/dCas9 activation and tumor growth suppression *in vivo*[J]. *Advanced Science*, 2018, 6(1): 1801423.
- [21] YOSHINAGA N, ZHOU J K, XU C, *et al.* Phenylboronic acid-functionalized polyplexes tailored to oral CRISPR delivery[J]. *Nano Letters*, 2023, 23(3): 757–764.
- [22] DUAN L, OUYANG K, XU X, *et al.* Nanoparticle delivery of CRISPR/Cas9 for genome editing[J]. *Frontiers in Genetics*, 2021, 12: 673286.
- [23] LEE B, LEE K, PANDA S, *et al.* Nanoparticle delivery of CRISPR into the brain rescues a mouse model of fragile X syndrome from exaggerated repetitive behaviours[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2018, 2(7): 497–507.
- [24] BERRY–KRAVIS E M, LINDEMANN L, JØNCH A E, *et al.* Drug development for neurodevelopmental disorders: lessons learned from fragile X syndrome[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2018, 17(4): 280–299.
- [25] OSTEIKOETXEA X, SILVA A, LÁZARO–IBÁÑEZ E, *et al.* Engineered Cas9 extracellular vesicles as a novel gene editing tool[J]. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2022, 11(5): e12225.
- [26] HORODECKA K, DÜCHLER M. CRISPR/Cas9: principle, applications, and delivery through extracellular vesicles[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(11): 6072.
- [27] LUO N A, LI J B, CHEN Y F, *et al.* Hepatic stellate cell reprogramming via exosome-mediated CRISPR/dCas9–VP64 delivery[J]. *Drug Delivery*, 2021, 28(1): 10–18.
- [28] ROUATBI N, MCGLYNN T, AL–JAMAL K T. Pre-clinical non-viral vectors exploited for *in vivo* CRISPR/Cas9 gene editing: an overview[J]. *Biomaterials Science*, 2022, 10(13): 3410–3432.
- [29] YIP B H. Recent advances in CRISPR/Cas9 delivery strategies[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(6): 839.
- [30] FINN J D, SMITH A R, PATEL M C, *et al.* A single administration of CRISPR/Cas9 lipid nanoparticles achieves robust and persistent *in vivo* genome editing[J]. *Cell Reports*, 2018, 22(9): 2227–2235.
- [31] WANG X Y, ISHIDA T, KIWADA H. Anti-PEG IgM elicited by injection of liposomes is involved in the enhanced blood clearance of a subsequent dose of PEGylated liposomes[J]. *Journal of Controlled Release*, 2007, 119(2): 236–244.
- [32] VAN HAASTEREN J, LI J, SCHEIDELER O J, *et al.* The delivery challenge: fulfilling the promise of therapeutic genome editing[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(7): 845–855.
- [33] XU Y X, LIU R F, DAI Z F. Key considerations in designing CRISPR/Cas9-carrying nanoparticles for therapeutic genome editing[J]. *Nanoscale*, 2020, 12(41): 21001–21014.
- [34] WANG Y, XU S, XIONG W, *et al.* Nanogels fabricated from bovine serum albumin and chitosan via self-assembly for delivery of anticancer drug[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2016, 146: 107–113.
- [35] LI L, HU S, CHEN X Y. Non-viral delivery systems for CRISPR/Cas9-based genome editing: challenges and opportunities[J]. *Biomaterials*, 2018, 171: 207–218.
- [36] LIU Q, CHEN X M, JIA J L, *et al.* pH-responsive poly(D, L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles with rapid antigen release behavior promote immune response[J]. *ACS Nano*, 2015, 9(5): 4925–4938.
- [37] SHIRLEY J L, DE JONG Y P, TERHORST C, *et al.* Immune responses to viral gene therapy vectors[J]. *Molecular Therapy*, 2020, 28(3): 709–722.
- [38] BEHR M, ZHOU J, XU B, *et al.* *In vivo* delivery of CRISPR/Cas9 therapeutics: progress and challenges[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2021, 11(8): 2150–2171.
- [39] DENG H Z, ZHAO X F, HE D X, *et al.* One-step gene delivery into the cytoplasm in a fusion-dependent manner based on a new membrane fusogenic lipid[J]. *Chemical Communications*, 2016, 52(46): 7406–7408.
- [40] JOHNSON L T, ZHANG D, ZHOU K J, *et al.* Lipid nanoparticle (LNP) chemistry can endow unique *in vivo* RNA delivery fates within the liver that alter therapeutic outcomes in a cancer model[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2022, 19(11): 3973–3986.
- [41] ZHANG R, EL–MAYTA R, MURDOCH T J, *et al.* Helper lipid structure influences protein adsorption and delivery of lipid nanoparticles to spleen and liver[J]. *Biomaterials Science*, 2021, 9(4): 1449–1463.

(上接第 370 页)

- [22] MAH J H, PARK Y K, JIN Y H, *et al.* Bacterial production and control of biogenic amines in Asian fermented soybean foods[J]. *Foods*, 2019, 8(2): 85.
- [23] TOFALO R, PERPETUINI G, SCHIRONE M, *et al.* Biogenic amines: toxicology and health effect[M]//CABALLERO B, FINGLAS P M, TOLDRÁ F. *Encyclopedia of Food and Health*. Oxford: Academic Press, 2016: 424–429.
- [24] 凌宇恒. 饲用海洋动物源益生菌在幼鲍养殖中的初步应用研究[D]. 厦门: 厦门大学(LING Yuheng. Application of Feed Probiotics from Marine Animal for Juvenile Abalone Aquaculture[D]. Xiamen: Xiamen University), 2017.
- [25] 张瑶心, 王亮节, 郑文, 等. 产几丁质酶的无色杆菌 ZWW8 的发酵产酶及酶学性质研究[J]. *生物技术通报*(ZHANG Yaoxin, WANG Liangjie, ZHENG Wen, *et al.* Study on enzyme production of a chitinase-producing strain *Achromobacter* sp. ZWW8 by fermentation and its enzymatic characterization[J]. *Biotechnology Bulletin*), 2021, 37(4): 96–106.
- [26] 李静, 刘建军, 赵祥颖. 一株产几丁质酶菌株的筛选及其产酶条件的研究[J]. *工业微生物*(LI Jing, LIU Jianjun, ZHAO Xiangying. Screening of chitinase from strains and conditions for enzyme production[J]. *Industrial Microbiology*), 2007, 37(3): 44–47.
- [27] MERIEM G, MAHMOUD K. Optimization of chitinase production by a new *Streptomyces griseorubens* C9 isolate using response surface methodology[J]. *Annals of Microbiology*, 2017, 67(2): 175–183.