

CRISPR/Cas9 基因编辑技术在遗传性视网膜疾病中的应用

孙玺皓 综述 唐仕波 陈建苏 审校

中南大学爱尔眼科学院 爱尔眼科研究所,长沙 410015

通信作者:唐仕波,Email:tangshibo@vip.163.com;陈建苏,Email:chenjiansu2000@163.com

【摘要】 目前,一些遗传性视网膜疾病的突变基因已经得到确认,但仍缺乏有效的治疗方法。成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)和 CRISPR 相关蛋白(CAS)系统可以通过非同源末端连接及同源定向修复的方式编辑人类基因组 DNA,其为遗传性视网膜疾病的治疗提供了更多的可能性。CRISPR/Cas9 不仅可以纠正遗传性疾病患者来源特异性诱导多能干细胞(iPSCs)的突变基因,随后分化为视网膜相关的细胞,进而实施细胞治疗;其也可以通过载体传递至体内,直接作用于靶细胞实现体内基因编辑。CRISPR/Cas9 基因编辑技术在遗传性视网膜疾病中的应用主要集中在视网膜色素变性、遗传性 X 连锁青少年视网膜劈裂症、Leber 先天性黑矇 10 型等疾病中,其中体外应用 CRISPR/Cas9 治疗 LCA10 已经进入临床试验阶段。本文对 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的作用机制、研究进展,以及其在遗传性视网膜疾病中的应用进展进行综述。

【关键词】 基因编辑; CRISPR/Cas9; 遗传性视网膜疾病

基金项目: 国家自然科学基金项目(32061160469)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20201120-00787

Application of CRISPR/Cas9 genome editing technology in hereditary retinal diseases

Sun Xihao, Tang shibo, Chen Jiansu

Aier School of Ophthalmology, Central South University, Aier Eye Institute Changsha, Chianghsha 410015, China

Corresponding authors: Chen Jiansu, Email:chenjiansu2000@163.com; Tang shibo, Email:tangshibo@vip.163.com

[Abstract] Several mutant genes for inherited retinal diseases have been identified, but effective treatments are still lacking. The clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein (Cas) system can edit human genomic DNA by nonhomologous end joining or homology-directed repair, offering more possibilities for the treatment of hereditary retinal diseases. CRISPR/Cas9 not only can genetically correct patient-derived induced pluripotent stem cells (iPSCs) to observe their differentiation into retinal cells thereby, thereby exploring the pathogenesis of the disease and implementing cell therapy, but can also be delivered to the body via vectors and directly act on target cells to achieve *in vivo* gene editing. CRISPR/Cas9 gene editing technology in hereditary retinal diseases has been mainly used in retinitis pigmentosa, hereditary X-linked juvenile retinoschisis, and Leber congenital amaurosis 10, of which the *in vitro* application of CRISPR/Cas9 for Leber congenital amaurosis 10 has entered the clinical trial stage. In this paper, we reviewed the mechanism and key advances of CRISPR/Cas9 and provided an overview of gene editing in IRDs.

[Key words] Gene editing; CRISPR/Cas9; Inherited retinal diseases

Fund program: National Natural Science Foundation of China (32061160469)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20201120-00787

遗传性视网膜疾病(inherited retinal diseases, IRDs)是一类因基因组异常而导致光感受器细胞和视网膜色素上皮细胞结构及功能损害的疾病,常造成视力不可逆丧失^[1]。目前一些 IRDs 的致病基因及具体突变位点已经明确,但仍缺乏有效的治疗方法。随着第 3 代基因编辑技术成簇规律间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats,

CRISPR)和 CRISPR 相关蛋白(CRISPR-associated protein system, Cas)的出现,基因治疗和细胞替代治疗的可行性增加,为 IRDs 患者治疗带来了曙光。

1 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的作用机制

2013 年,Charpentier 和 Doudna 在 *Nature* 上介绍了一种使

用单向导 RNA (single guide RNA, sgRNA) 靶向 DNA 进行切割的细菌酶, 可实现对细菌、斑马鱼及人类细胞等多种生物基因组的编辑^[2], 并因此获得了 2020 年的诺贝尔化学奖。目前用于哺乳动物基因组编辑的是来源于化脓性链球菌 (*S. pyogenes*) 的 II 型 CRISPR/Cas9 系统^[3], 该系统主要包括核酸内切酶 Cas9 蛋白和 sgRNA, 通过识别、切割、修复 3 个步骤完成对基因组的编辑^[4-5]。先由 sgRNA 识别目标 DNA 序列 5' 端的原间隔序列临近基序 (protospacer adjacent motifs, PAM) 来定位需要编辑的位点^[6]; 识别靶位点后引导 Cas9 内切酶切割靶点 DNA 双链, 随后对目标区域进行非同源末端连接 (nonhomologous end joining, NHEJ) 修复或者在有同源修复模板的情况下进行更精准的同源定向修复 (homology-directed repair, HDR)。

与既往的基因编辑技术不同, CRISPR/Cas9 是通过 sgRNA 引导 Cas9 内切酶切割目标位点, 故通过改变 sgRNA 的序列便可重新定位含有 PAM 区的目标位点^[4]。与锌指核酸酶和转录激活物样效应核酸酶等基因组编辑工具相比, CRISPR/Cas9 基因编辑系统具有设计简单、构建容易, 操作周期短等优点^[7]; 但同时其也存在同源重组效率低、易发生脱靶、可能引起 p53 激活, PAM 区相对较窄等问题^[8-10]。随着研究的不断深入, 这些问题逐步得到了解决。

2 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的优化

2.1 降低脱靶率

在进行基因组编辑时, CRISPR/Cas9 可能会造成目标位点之外的基因组改变, 这种现象为脱靶效应^[9]。脱靶不仅发生在 DNA 水平, 同时也存在于 RNA 水平^[11], 这不仅降低了基因编辑的精准性, 也增加了其不可控的风险。为此研究者通过改变 sgRNA 的长度, 对其进行化学修饰, 使用双 sgRNA 识别靶位点, 优化 Cas9 蛋白酶的结构等方式降低脱靶率^[12-14]。

2.2 提升精准性

通常 Cas9 蛋白需在 sgRNA 的引导下识别目标位点, 进而造成靶位点附近 DNA 双链断裂, 同时引入同源修复模板, 达到插入或修复某段 DNA 的目的。但该过程易造成目标位点附近碱基的随机插入与缺失, 并且其效率因细胞类型和状态、所需编辑的基因组位置以及修复模板的不同而产生很大差异^[15]。为此, 研究者开发了单碱基编辑系统, 其可以进行单个碱基的编辑, 包括胞嘧啶碱基编辑器和腺嘌呤碱基编辑器, 前者可以实现编辑窗口内单个碱基 C 或 G 到 T 或 A 的转换, 而后者可以实现 T 或 A 到 C 或 G 的转化, 但其应用范围较窄^[16-18]。随后, Anzalone 等^[19]所构建的新型碱基编辑系统 Prime Editing 打破了碱基互换之间的限制, 实现所有类别碱基的自由置换, 而且可以实现多个碱基的插入与删除, 进一步扩大了单碱基编辑系统的应用范围。但 Prime Editing 的组成构件较大, 在一定程度上限制了其在体内的应用。

2.3 扩展编辑范围

PAM 区的存在一定程度上限制了 CRISPR/Cas9 的编辑范围^[20]。Walton 等^[21]通过改变 Cas9 蛋白的结构, 扩大了 PAM 区的范围, 使 II 型 CRISPR/Cas9 能够识别 NYN (Y 即 C+T) 或

者 NRN (R 即 A+G) 的 PAM 区。可将编辑范围扩大至几乎全基因组的任何位点, 进一步增加了其实用性。但 PAM 区的扩大会降低其特异性, 增加脱靶的可能性。

2.4 提高安全性

除了提升 CRISPR/Cas9 的特异性与有效性之外, 提高其安全性也十分重要。Harrington 等^[22]发现 AcrIIC1 可以直接结合 Cas9 蛋白保守的催化结构域, 而 AcrIIC3 可以诱导 Cas9 蛋白二聚化, 从而阻止其与靶 DNA 的结合, 达到控制 Cas9 蛋白活性的目的。而 Dong 等^[23]则发现 AcrIIA4 蛋白可通过在结构上模拟 PAM 区, 阻止 Cas9 对双链 DNA 底物的识别, 避免细胞和组织中不必要的基因组编辑。Nihongaki 等^[24]则通过对 Cas9 蛋白进行改造, 使其活性可以受光的调控, 进而控制 CRISPR/Cas9 在体内表达的时间, 降低其长期表达所引起的副作用。

3 CRISPR/Cas9 在 IRDs 应用途径与方法

CRISPR/Cas9 基因编辑技术在 IRDs 中的应用主要包括 2 个途径, 即体外或者体内基因编辑。体外基因编辑的应用主要在细胞水平矫正人胚胎干细胞 (human embryonic stem cells, hESCs) 或者特异性诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs), 然后诱导其分化为视网膜相关细胞, 移植到患眼, 替代原有的病变细胞; 体内基因编辑主要通过相关的载体将 CRISPR/Cas9 基因编辑系统传递至体内, 直接纠正异常组织与细胞基因组中的突变位点。

3.1 体外基因编辑

iPSCs 是一类具有自体再生功能的细胞, 通过诱导分化便可以衍生出不同的视网膜细胞^[25]。随着体外 3D 视网膜类器官 (retinal organoids, ROs) 分化方案的不断完善, 分化成熟的视网膜类器官具有一定的生理结构并且包含多种视网膜细胞^[26-27], 使其有可能替代传统的动物模型来进行实验研究, 甚至可以将其进行移植替代原有的病变组织^[28]。而由于 CRISPR/Cas9 可以精准地修正基因组突变, 故将其和 iPSCs 联合应用可以更好地发挥二者的优势^[29]。

Zhu 等^[30]将人来源的 iPSCs 分化的视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞植入到视网膜色素变性模型小鼠的视网膜下腔, 发现移植的 hiPSCs-RPE 细胞不仅在小鼠视网膜中发生整合与替换而且能够分泌神经保护因子, 抑制小胶质细胞的活化、减少细胞凋亡, 从而抑制光感受器细胞的丢失。虽然其长期的安全性和有效性有待确认, 但证明了细胞替代治疗的可行性。Mandai 等^[31]将 iPSCs 来源的 RPE 细胞移植到新生血管性年龄相关性黄斑变性患者眼内, 虽然最佳矫正视力没有改善或恶化, 但证明了其可行性。随后 Nishida 等^[32]通过 3D 打印模具对所产生的 RPE 细胞植片的形态进行了改良, 产生了条状的人 iPSCs 来源的 RPE 细胞植片, 该条状细胞植片在体外具有良好的扩增效率, 而移植到裸鼠的视网膜下腔后, 可以与宿主的 RPE 细胞整合, 并表达正常的 RPE 细胞极性。而若在 iPSCs 诱导分化前通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术修复致病位点, 再将分化成熟的细胞输送至病变部位, 可以实现自体细胞的替代治疗, 在一定程度上解决供体匮乏的

问题。并且由于移植来源于患者本身,故在理论上不会引起免疫排斥反应^[33]。目前已有临床试验进行了 iPSCs 来源的 RPE 细胞的移植治疗,但由于光感受器细胞培养时间长,分化效率较低,分化后的视网膜光感受器细胞结构不稳定,难以获得高纯度的细胞^[34],故 iPSCs 来源的光感受器相关细胞的移植治疗距离实际的临床应用还有相当长的距离。

3.2 体内基因编辑

利用基因编辑技术直接在活体视网膜组织内纠正正常的基因组突变位点,从而避免 iPSCs 诱导分化的繁琐步骤以及外源性细胞在移植后与周围细胞整合的问题^[35]。但这需要选择特异性较高的载体或者采用物理转染的方式将 CRISPR/Cas9 基因编辑系统传递至体内。传递载体可以分为病毒载体和非病毒载体,常见的病毒载体有慢病毒、腺病毒(adenovirus, AD)和腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)等。慢病毒及 AD 能够携带较大的基因片段,但其转染效率较低^[36];AAV 虽然只能携带不超过 4.7 kb 的基因片段,但在体内转染效率较高,并且具有较高的安全性和极低的免疫原性,故应用较为广泛^[37]。根据对不同组织的转染偏好可以将 AAV 分为不同的血清型,其中 AAV2、AAV5 和 AAV8 在视网膜组织中的转染效率较高^[38]。由于 AAV 装载量的限制,大多数情况下需要采用双 AAV 包装 CRISPR/Cas9 基因编辑系统,但双 AAV 的传递方案大大降低了体内基因编辑的效率^[39-40]。非病毒载体的主要优势便是能够携带更大的基因片段,生物安全性高,较少引起组织的免疫反应^[41],但转染效率通常较低。鉴于其较高的安全性,可以通过多次注射的方式来提高转染效率。电穿孔作为一种物理转染方法,通过高压电击瞬间提高细胞膜的通透性,可以使外源性分子传递至细胞内,并且穿过核膜进入细胞核内^[42]。故通过显微注射联合电穿孔的方法可将 CRISPR/Cas9 基因编辑系统传递至靶细胞内。

Hung 等^[43]运用双 AAV2 作为载体将 sgRNA 和 Cas9 蛋白通过玻璃体腔注射的方式传递至表达 Thy1-黄色荧光蛋白(yellow fluorescent protein, YFP)的转基因小鼠体内,抑制 YFP 在视网膜内的表达,从而在不影响视网膜正常功能的情况下,对成年小鼠视网膜组织进行了基因编辑。但 CRISPR/Cas9 基因编辑系统在体内的长期表达可能会增加脱靶率以及引起机体的免疫应答反应^[44]。故 Li 等^[45]进一步改进了 CRISPR/Cas9 基因编辑系统,使其在视网膜组织中发挥作用后通过自我干扰的方式降低 Cas9 蛋白活性,减少持续表达所带来的副作用,从而提高 CRISPR/Cas9 在体内应用的安全性。Nishiguchi 等^[46]设计了微同源介导的末端连接,将同源重组片段长度减少至 20 bp,使单个 AAV 便能装载 CRISPR/Cas9 基因编辑系统的全部元件,并将其应用于 *Gnat1* 和 *Pde6c* 基因突变所致的视杆与视锥细胞异常小鼠体内,从而恢复 *Gnat1* 基因表达,挽救视杆细胞的功能,治疗后模型鼠视网膜功能有所恢复,视敏度有所提高。该研究中的基因编辑效率约为 10%,高于双 AAV 传递策略(<5%)^[47],从而进一步提高了基因编辑的实用性。

4 CRISPR/Cas9 在 IRDs 中的应用

由于 IRDs 多为单个基因突变所致,无需进行多个靶位点

的修正,并且视网膜下腔处于免疫豁免的状态^[48],适合应用 CRISPR/Cas9 基因编辑系统进行治疗^[49]。

4.1 CRISPR/Cas9 在视网膜色素变性中的应用

视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP)是一种常见的遗传性视网膜退行性疾病^[50]。Buskin 等^[51]运用 CRISPR/Cas9 的 HDR 方式对 *PRPF31* 基因突变所致 RP 患者的 iPSCs 进行修复,并与患者来源的视网膜类器官进行对比,发现纤毛发生和细胞粘附等异常疾病表征得以改善,从而改善 RPE 发育。Deng 等^[52]采用同样的方法对 *RPGR* 基因突变所致 RP 患者的 iPSCs 进行修复,得出了与 Buskin 等^[51]类似的结论。这些研究证明了 CRISPR/Cas9 在体外纠正 IRDs 异常表型的潜力。

在体内水平,Moreno 等^[53]通过双 AAV2 将靶向抑制 *NRL* 基因的 CRISPR/Cas9 基因编辑系统传递至视网膜色素变性模型小鼠视网膜下腔,抑制继发性视锥细胞丢失,发现治疗后小鼠的视功能有所改善。Bakondi 等^[54]采用显微注射联合电穿孔的方式将 Cas9 和 sgRNA 运输至视紫红质基因 *S334ter* 位点突变所致 RP 大鼠的视网膜下腔,成功敲除突变的视紫红质等位基因后,发现大鼠的光感受器凋亡得到抑制,视网膜变性程度有所缓解。这些研究均证明了 CRISPR/Cas9 在体内治疗 RP 的潜力。

4.2 CRISPR/Cas9 在遗传性 X 连锁青少年视网膜劈裂症中的应用

遗传性 X 连锁青少年视网膜劈裂症(hereditary X-linked juvenile retinoschisis, XLRS)是青年男性黄斑变性的主要原因之一^[55]。Huang 等^[56]建立了 *RS1* 基因突变(c. 625C>T 与 c. 488G>A)所导致 XLRS 患者来源的 iPSCs 细胞系,随后将 iPSCs 分化为 ROs,在体外重现了 XLRS 的主要病理特征,包括视网膜劈裂、视黄醇生成缺陷和外节和纤毛形态异常。然后 Huang 等^[56]应用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术对患者来源 iPSCs 突变位点进行修正,并分化为 ROs,发现异常的疾病表型得以修复,在体外证明了 CRISPR/Cas9 基因编辑的有效性。并结合转录组学进一步分析发现 *IQCB1* 和 *OPA1* 等基因表达的下调也得到恢复,而这些基因的下调导致视网膜感光细胞和其他神经细胞之间的通讯障碍,与视神经的萎缩有关^[57-58]。Huang 等^[56]的研究为之后对 XLRS 的药物筛选,发现潜在治疗靶点奠定了一定的基础。而 Yang 等^[59]将 CRISPR/Cas9 以玻璃体腔注射的方式传递至小鼠眼内,诱导 *RS1* 基因编码区 625 位点处的碱基 C 突变为 T,以体内基因编辑的方式构建 XLRS 的动物疾病模型。Moore 等^[60]以无机纳米粒子-纳米金刚石作为载体,携带整个 CRISPR/Cas9 基因编辑的元件以及示踪荧光标记物,从而构建 *RS1* c. 625C>T 突变所致 XLRS 的点突变的小鼠疾病模型,虽然模型鼠并未出现视网膜囊肿,但表现出与 XLRS 相似的病理特征,如视网膜外层厚度减少,感光细胞形态出现异常等。不过该研究并没有进行基因组测序证实该位点发生突变。以上研究证明了 CRISPR/Cas9 基因编辑系统不仅可以在体内外构建与患者突变位点一致的细胞或动物疾病模型,而且可以在患者来源的 iPSCs 内纠正其突变位点,为后续在动物体内应用以及临床转化提供了研究基础。



4.3 CRISPR/Cas9 在 LCA10 中的应用

LCA10 是由 *CEP290* 基因突变所导致的常染色体隐性遗传疾病,大多数患者在婴儿期便表现出严重的视锥及视杆营养不良^[61]。由于 *CEP290* 编码序列较大(约 7.5 kb),超过了普通 AAV 的包装能力,限制了基因替代疗法在该疾病中的应用^[62]。而 CRISPR/Cas9 基因编辑系统可以有效地纠正或删除特定的 DNA 片段,恢复正常基因的表达,使其成为 LCA10 潜在的治疗方法。Ruan 等^[63]采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在 293T 细胞系中引入 *CEP290* 基因突变并采用双 AAV5 将 CRISPR/Cas9 传递至野生型小鼠视网膜下腔,进而引起 *CEP290* 基因第 25 内含子(该内含子与人 *CEP290* 基因的内含子 26 同源)的缺失,分别成功构建了 LCA10 的细胞模型和动物模型。并且研究了具有自限能力的 CRISPR/Cas9 基因编辑系统,减少其在体内持续表达所带来的副作用。而 Maeder 等^[64]应用 EDIT-101 靶向 *CEP290* 基因异常片段的 CRISPR/Cas9 基因编辑系统消除了 LCA10 转基因小鼠中 *CEP290* 基因突变所产生的异常剪接供体,从而恢复 *CEP290* 基因的正常表达,逆转光感受器异常。随后通过视网膜下注射的方式将 AAV 载体传递至非人灵长类动物恒河猴眼内,探讨了在灵长类动物体内视网膜内进行基因编辑的效率与病毒计量的关系,当病毒的浓度约 1.00×10^{12} 时,其在视网膜内的基因编辑效率能够达到(27.9±20.7)%。该研究不仅证明了 CRISPR/Cas9 具有在非人灵长类动物视网膜内编辑基因组的能力,且能够达到治疗水平(10%的编辑效率)^[64]。但有研究发现以 AAV 为载体的 CRISPR/Cas9 基因编辑系统会引起轻度的炎症反应。这可能是由于 AAV 作为一种病毒载体具有一定的免疫原性^[65]。随后经过不断的完善优化,2018 年 11 月美国食品药品监督管理局批准了 EDIT-101 临床试验新药的申请,允许张锋团队开展使用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术治疗 LCA10 的临床试验(NCT03872479),使 LCA10 成为眼科领域中首个尝试运用 CRISPR/Cas9 基因编辑系统进行治疗的临床试验。

5 小结及展望

在体外,CRISPR/Cas9 基因编辑技术可以修正 IRDs 患者来源的 iPSCs 突变位点,并将其分化为视网膜相关细胞,这对于研究疾病的发生发展机制,进行药物筛选以及后续的细胞替代治疗有着重要的现实意义;在体内,可以通过相关的载体将 CRISPR/Cas9 基因编辑系统传递至眼内以纠正 IRDs 中的基因突变,从而逆转异常的疾病表型,为研究和治疗 IRDs 提供一个新的方向。

CRISPR/Cas9 基因编辑系统在体外可以通过 HDR 的方式修复大部分 IRDs 的突变位点,但由于同源修复模板的存在,HDR 方式在体内编辑的效率显著低于 NHEJ 方式,因此目前在体内水平主要通过 NHEJ 方式抑制某个基因的表达,从而纠正异常疾病表型,而单碱基编辑器的出现和不断迭代为单个碱基突变引起的 IRDs 提供了更加精准的治疗方式。故要使 CRISPR/Cas9 基因编辑系统在临床上具有更加现实的意义,还需要进一步优化其编辑效率,降低脱靶率,提升载体传递的安

全性和有效性。相信随着研究的不断深入,科学技术的不断发展,这些问题也将逐步得到解决,CRISPR/Cas9 基因编辑技术必将给 IRDs 患者带来福音。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Tucker BA, Mullins RF, Stone EM. Stem cells for investigation and treatment of inherited retinal disease [J]. Hum Mol Genet, 2014, 23(R1): R9-R16. DOI: 10. 1093/hmg/ddu124.
- [2] Charpentier E, Doudna JA. Biotechnology: rewriting a genome [J]. Nature, 2013, 495(7439): 50-51. DOI: 10. 1038/495050a.
- [3] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes [J]. Science, 2007, 315(5819): 1709-1712.
- [4] Makarova KS, Aravind L, Grishin NV, et al. A DNA repair system specific for thermophilic archaea and bacteria predicted by genomic context analysis [J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(2): 482-496. DOI: 10. 1093/nar/30. 2. 482.
- [5] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. Science, 2012, 337(6096): 816-821. DOI: 10. 1126/science. 1225829.
- [6] Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria [J/OL]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(39): E2579-E2586 [2022-11-25]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22949671>. DOI: 10. 1073/pnas. 1208507109.
- [7] Doetschman T, Georgieva T. Gene editing with CRISPR/Cas9 RNA-directed nucleases [J]. Circ Res, 2017, 120(5): 876-894. DOI: 10. 1161/CIRCRESAHA. 116. 309727.
- [8] Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9 [J]. Science, 2013, 339(6121): 823-826. DOI: 10. 1126/science. 1232033.
- [9] Fu Y, Foden JA, Khayter C, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells [J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(9): 822-826. DOI: 10. 1038/nbt. 2623.
- [10] Haapaniemi E, Botla S, Persson J, et al. CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response [J]. Nat Med, 2018, 24(7): 927-930. DOI: 10. 1038/s41591-018-0049-z.
- [11] Zhou C, Sun Y, Yan R, et al. Off-target RNA mutation induced by DNA base editing and its elimination by mutagenesis [J]. Nature, 2019, 571(7764): 275-278. DOI: 10. 1038/s41586-019-1314-0.
- [12] Moon SB, Kim DY, Ko JH, et al. Improving CRISPR genome editing by engineering guide RNAs [J]. Trends Biotechnol, 2019, 37(8): 870-881. DOI: 10. 1016/j. tibtech. 2019. 01. 009.
- [13] Ran FA, Hsu PD, Lin CY, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity [J]. Cell, 2013, 154(6): 1380-1389. DOI: 10. 1016/j. cell. 2013. 08. 021.
- [14] Oakes BL, Fellmann C, Rishi H, et al. CRISPR-Cas9 circular permuted as programmable scaffolds for genome modification [J]. Cell, 2019, 176(1-2): 254-267. DOI: 10. 1016/j. cell. 2018. 11. 052.
- [15] Saleh-Gohari N, Helleday T. Conservative homologous recombination preferentially repairs DNA double-strand breaks in the S phase of the cell cycle in human cells [J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32(12): 3683-3688. DOI: 10. 1093/nar/gkh703.
- [16] Kantor A, McClements ME, MacLaren RE. CRISPR-Cas9 DNA base editing and Prime-Editing [J/OL]. Int J Mol Sci, 2020, 21(17): 6240 [2023-08-12]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32872311>. DOI: 10. 3390/ijms21176240.
- [17] Diorio C, Murray R, Naniog M, et al. Cytosine base editing enables quadruple-edited allogeneic CART cells for T-ALL [J]. Blood, 2022, 140(6): 619-629. DOI: 10. 1182/blood. 2022015825.

- [18] Zhao D, Li J, Li S, et al. Glycosylase base editors enable C-to-A and C-to-G base changes [J]. *Nat Biotechnol*, 2021, 39 (1) : 35–40. DOI: 10. 1038/s41587-020-0592-2.
- [19] Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donorDNA [J]. *Nature*, 2019, 576 (7785) : 149–157. DOI: 10. 1038/s41586-019-1711-4.
- [20] Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31 (9) : 827–832. DOI: 10. 1038/nbt. 2647.
- [21] Walton RT, Christie KA, Whittaker MN, et al. Unconstrained genome targeting with near-PAMless engineered CRISPR-Cas9 variants [J]. *Science*, 2020, 368 (6488) : 290–296. DOI: 10. 1126/science. aba8853.
- [22] Harrington LB, Doxzen KW, Ma E, et al. A broad-spectrum inhibitor of CRISPR-Cas9 [J]. *Cell*, 2017, 170 (6) : 1224–1233. DOI: 10. 1016/j. cell. 2017. 07. 037.
- [23] Dong D, Guo M, Wang S, et al. Structural basis of CRISPR-SpyCas9 inhibition by an anti-CRISPR protein [J]. *Nature*, 2017, 546 (7658) : 436–439. DOI: 10. 1038/nature22377.
- [24] Nihongaki Y, Kawano F, Nakajima T, et al. Photoactivatable CRISPR-Cas9 for optogenetic genome editing [J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33 (7) : 755–760. DOI: 10. 1038/nbt. 3245.
- [25] Saint-Geniez M, Rosales M. Eyeing the fountain of youth [J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 20 (5) : 583–584. DOI: 10. 1016/j. stem. 2017. 04. 007.
- [26] Eiraku M, Takata N, Ishibashi H, et al. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture [J]. *Nature*, 2011, 472 (7341) : 51–56. DOI: 10. 1038/nature09941.
- [27] Zhong X, Gutierrez C, Xue T, et al. Generation of three-dimensional retinal tissue with functional photoreceptors from human iPSCs [J/OL]. *Nat Commun*, 2014, 5 : 4047 [2022–11–28]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24915161>. DOI: 10. 1038/ncomms5047.
- [28] Gonzalez-Cordero A, Kruczek K, Naeem A, et al. Recapitulation of human retinal development from human pluripotent stem cells generates transplantable populations of cone photoreceptors [J]. *Stem Cell Reports*, 2017, 9 (3) : 820–837. DOI: 10. 1016/j. stemcr. 2017. 07. 022.
- [29] De Masi C, Spitalieri P, Murdocca M, et al. Application of CRISPR/Cas9 to human-induced pluripotent stem cells: from gene editing to drug discovery [J/OL]. *Hum Genomics*, 2020, 14 (1) : 25 [2022–11–28]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32591003>. DOI: 10. 1186/s40246-020-00276-2.
- [30] Zhu D, Xie M, Gademann F, et al. Protective effects of human iPSC-derived retinal pigmented epithelial cells on retinal degenerative disease [J/OL]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11 (1) : 98 [2022–11–28]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32131893>. DOI: 10. 1186/s13287-020-01608-8.
- [31] Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, et al. Autologous induced stem-cell-derived retinal cells for macular degeneration [J]. *N Engl J Med*, 2017, 376 (11) : 1038–1046. DOI: 10. 1056/NEJMoa1608368.
- [32] Nishida M, Tanaka Y, Tanaka Y, et al. Human iPSC cell derived RPE strips for secure delivery of graft cells at a target place with minimal surgical invasion [J/OL]. *Sci Rep*, 2021, 11 (1) : 21421 [2022–11–28]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34728664>. DOI: 10. 1038/s41598-021-00703-x.
- [33] Wiley LA, Burnight ER, Songstad AE, et al. Patient-specific induced pluripotent stem cells (iPSCs) for the study and treatment of retinal degenerative diseases [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2015, 44 : 15–35. DOI: 10. 1016/j. pretyeres. 2014. 10. 002.
- [34] Kamao H, Mandai M, Okamoto S, et al. Characterization of human induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelium cell sheets aiming for clinical application [J]. *Stem Cell Reports*, 2014, 2 (2) : 205–218. DOI: 10. 1016/j. stemcr. 2013. 12. 007.
- [35] Wahlin KJ, Maruotti JA, Sripathi SR, et al. Photoreceptor outer segment-like structures in long-term 3D retinas from human pluripotent stem cells [J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7 (1) : 766 [2022–11–28]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28396597>. DOI: 10. 1038/s41598-017-00774-9.
- [36] Bharti K, Rao M, Hull SC, et al. Developing cellular therapies for retinal degenerative diseases [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014, 55 (2) : 1191–1202. DOI: 10. 1167/iovs. 13-13481.
- [37] Boye SE, Alexander JJ, Witherspoon CD, et al. Highly efficient delivery of adeno-associated viral vectors to the primate retina [J]. *Hum Gene Ther*, 2016, 27 (8) : 580–597. DOI: 10. 1089/hum. 2016. 085.
- [38] Moore NA, Morral N, Ciulla TA, et al. Gene therapy for inherited retinal and optic nerve degenerations [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2018, 18 (1) : 37–49. DOI: 10. 1080/14712598. 2018. 1389886.
- [39] Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy [J]. *Nat Rev Genet*, 2003, 4 (5) : 346–358. DOI: 10. 1038/nrg1066.
- [40] Lee M, Kim H. Therapeutic application of the CRISPR system; current issues and new prospects [J]. *Hum Genet*, 2019, 138 (6) : 563–590. DOI: 10. 1007/s00439-019-02028-2.
- [41] Wang HX, Li M, Lee CM, et al. CRISPR/Cas9-based genome editing for disease modeling and therapy: challenges and opportunities for nonviral delivery [J]. *Chem Rev*, 2017, 117 (15) : 9874–9906. DOI: 10. 1021/acs. chemrev. 6b00799.
- [42] Huang S, Deshmukh H, Rajagopalan KK, et al. Gold nanoparticles electroporation enhanced polyplex delivery to mammalian cells [J]. *Electroporation*, 2014, 35 (12–13) : 1837–1845. DOI: 10. 1002/elps. 201300617.
- [43] Hung SS, Chrysostomou V, Li F, et al. AAV-mediated CRISPR/Cas9 gene editing of retinal cells *in vivo* [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57 (7) : 3470–3476. DOI: 10. 1167/iovs. 16-19316.
- [44] Wang D, Mou H, Li S, et al. Adenovirus-mediated somatic genome editing of Pten by CRISPR/Cas9 in mouse liver in spite of Cas9-specific immune responses [J]. *Hum Gene Ther*, 2015, 26 (7) : 432–442. DOI: 10. 1089/hum. 2015. 087.
- [45] Li F, Hung S, Mohd Khalid M, et al. Utility of self-destructing CRISPR/Cas constructs for targeted gene editing in the retina [J]. *Hum Gene Ther*, 2019, 30 (11) : 1349–1360. DOI: 10. 1089/hum. 2019. 021.
- [46] Nishiguchi KM, Fujita K, Miya F, et al. Single AAV-mediated mutation replacement genome editing in limited number of photoreceptors restores vision in mice [J/OL]. *Nat Commun*, 2020, 11 (1) : 482 [2022–11–30]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31980606>. DOI: 10. 1038/s41467-019-14181-3.
- [47] Suzuki K, Tsunekawa Y, Hernandez-Benitez R, et al. *In vivo* genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration [J]. *Nature*, 2016, 540 (7631) : 144–149. DOI: 10. 1038/nature20565.
- [48] Xian B, Huang B. The immune response of stem cells in subretinal transplantation [J/OL]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6 : 161 [2022–11–30]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26364954>. DOI: 10. 1186/s13287-015-0167-1.
- [49] Sengillo JD, Justus S, Tsai YT, et al. Gene and cell-based therapies for inherited retinal disorders: an update [J]. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2016, 172 (4) : 349–366. DOI: 10. 1002/ajmg. c. 31534.
- [50] Campochiaro PA, Mir TA. The mechanism of cone cell death in retinitis pigmentosa [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2018, 62 : 24–37. DOI: 10. 1016/j. pretyeres. 2017. 08. 004.
- [51] Buskin A, Zhu L, Chichagova V, et al. Disrupted alternative splicing for genes implicated in splicing and ciliogenesis causes PRPF31 retinitis pigmentosa [J/OL]. *Nat Commun*, 2018, 9 (1) : 4234 [2022–11–30]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30315276>. DOI: 10. 1038/s41467-018-06448-y.
- [52] Deng WL, Gao ML, Lei XL, et al. Gene correction reverses ciliopathy and photoreceptor loss in iPSC-derived retinal organoids from retinitis

- pigmentosa patients[J]. Stem Cell Reports, 2018, 10(4): 1267-1281. DOI: 10.1016/j.stemcr.2018.02.003.
- [53] Moreno AM, Fu X, Zhu J, et al. In situ gene therapy via AAV-CRISPR-Cas9-mediated targeted gene regulation[J]. Mol Ther, 2018, 26(7): 1818-1827. DOI: 10.1016/j.ymthe.2018.04.017.
- [54] Bakondi B, Lv W, Lu B, et al. In vivo CRISPR/Cas9 gene editing corrects retinal dystrophy in the S334ter-3 rat model of autosomal dominant retinitis pigmentosa[J]. Mol Ther, 2016, 24(3): 556-563. DOI: 10.1038/mt.2015.220.
- [55] Molday RS, Kellner U, Weber BH. X-linked juvenile retinoschisis: clinical diagnosis, genetic analysis, and molecular mechanisms[J]. Prog Retin Eye Res, 2012, 31(3): 195-212. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2011.12.002.
- [56] Huang S, Deshmukh H, Rajagopalan KK, et al. Gold nanoparticles electroporation enhanced polyplex delivery to mammalian cells[J]. Electrophoresis, 2014, 35(12-13): 1837-1845. DOI: 10.1002/elps.201300617.
- [57] Ronquillo CC, Hanke-Gogokhia C, Revelo MP, et al. Ciliopathy-associated IQCB1/NPHP5 protein is required for mouse photoreceptor outer segment formation[J]. FASEB J, 2016, 30(10): 3400-3412. DOI: 10.1096/fj.201600511R.
- [58] Wang AG, Fann MJ, Yu HY, et al. OPA1 expression in the human retina and optic nerve[J]. Exp Eye Res, 2006, 83(5): 1171-1178. DOI: 10.1016/j.exer.2006.06.004.
- [59] Yang TC, Chang CY, Yarmishyn AA, et al. Carboxylated nanodiamond-mediated CRISPR-Cas9 delivery of human retinoschisis mutation into human iPSCs and mouse retina[J]. Acta Biomater, 2020, 101: 484-494. DOI: 10.1016/j.actbio.2019.10.037.
- [60] Moore L, Yang J, Lan TT, et al. Biocompatibility assessment of detonation nanodiamond in non-human primates and rats using histological, hematologic, and urine analysis[J]. ACS Nano, 2016, 10(8): 7385-7400. DOI: 10.1021/acsnano.6b00839.
- [61] Kumaran N, Moore AT, Weleber RG, et al. Leber congenital amaurosis/early-onset severe retinal dystrophy: clinical features, molecular genetics and therapeutic interventions[J]. Br J Ophthalmol, 2017, 101(9): 1147-1154. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2016-309975.
- [62] den Hollander AI, Koeneke RK, Yzer S, et al. Mutations in the CEP290 (NPHP6) gene are a frequent cause of Leber congenital amaurosis[J]. Am J Hum Genet, 2006, 79(3): 556-561. DOI: 10.1086/507318.
- [63] Ruan GX, Barry E, Yu D, et al. CRISPR/Cas9-mediated genome editing as a therapeutic approach for Leber congenital amaurosis 10[J]. Mol Ther, 2017, 25(2): 331-341. DOI: 10.1016/j.ymthe.2016.12.006.
- [64] Maeder ML, Stefanidakis M, Wilson CJ, et al. Development of a gene-editing approach to restore vision loss in Leber congenital amaurosis type 10[J]. Nat Med, 2019, 25(2): 229-233. DOI: 10.1038/s41591-018-0327-9.
- [65] Bessis N, GarciaCozar FJ, Boissier MC. Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms[J]. Gene Ther, 2004, 11 Suppl 1: S10-S17. DOI: 10.1038/sj.gt.3302364.

(收稿日期: 2023-01-15 修回日期: 2023-07-24)

(本文编辑: 张宇 骆世平)

读者 · 作者 · 编者

本刊稿件处理流程

本刊实行以同行审稿为基础的三级审理制度(编辑初审、专家外审、编委会终审)稿件评审。编辑部在稿件审理过程中坚持客观、公平、公正的原则,郑重承诺审稿过程中尊重和保护审稿专家、作者及稿件的私密权。专家审理认为不宜刊用的稿件,编辑部将告知作者专家的审理意见,对稿件处理有不同看法的作者有权向编辑部申请复议,但请写出申请理由和意见。

稿件审理过程中作者可通过“中华医学会杂志社远程稿件管理系统”查询稿件的审理结果。作者如需要采用通知或退稿通知可与编辑部联系。编辑部发给作者修改再评的稿件,如 2 个月没有修回,视为作者自行撤稿。编辑部的各种通知将通过 Email 发出,投稿后和稿件审理期间请作者留意自己的电子信箱。作者自收到采用通知之日起,即视为双方建立合约关系,作者如撤稿必须向编辑部申诉理由并征得编辑部同意。一旦稿件进入编排阶段,作者不应提出自撤稿件,在此期间因一稿两投或强行撤稿而给本刊造成不良影响和/或经济损失者,编辑部有权给以公开曝光、通报并实施经济赔偿,作者自行承担一切责任和后果。

根据《中华人民共和国著作权法》的相关条文,本刊编辑可对待发表的来稿按照编辑规范和专业知识进行文字加工、修改和删减,修改后的稿件作者须认真校对核实,修改涉及文章的核心内容时双方应进行沟通并征得作者同意。除了编辑方面的技术加工以外,作者对已经发表论文的全部内容文责自负。稿件编辑流程中编辑退回作者修改的稿件逾期 2 个月不修回者,视作自行撤稿。

本刊征稿启事

《中华实验眼科杂志》是由中国科学技术协会主管、中华医学会主办、河南省眼科研究所 河南省立眼科医院承办的眼科专业学术期刊,月刊,每月 10 日出版。本刊的报道范围主要为眼科基础和临床研究领域领先的科研成果,主要栏目设有专家述评、实验研究、临床研究、调查研究、综述、病例报告等,学术内容涉及眼科疾病的基因学研究、基因诊断和基因靶向治疗、眼科遗传学研究、分子生物学研究、眼科微生物学研究、眼科药理学研究、眼科生物材料研究、眼科表观遗传研究、眼科疾病的动物模型、眼科疾病的流行病学研究、眼科疾病的多中心或单中心随机对照临床试验、循证医学临床实践及眼科疾病的临床研究等。本刊拟刊出海外学者的中文或英文原创性论文或评述类文章,欢迎国内外眼科研究人员踊跃投稿。

(本刊编辑部)