

DOI: 10.13376/j.cblls/2021099

文章编号: 1004-0374(2021)07-0912-09

· 技术与应用 ·

CRISPR/Cas9基因编辑技术在阿尔茨海默病研究中的应用

孙谕莹, 周鹤妍, 黄汉昌*

(北京联合大学生物活性物质与功能食品北京市重点实验室, 北京 100191)

摘要: 阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种与基因和环境等多因素相关的神经退行性疾病, 其发病机理复杂, 目前也鲜有针对 AD 的治疗药物。CRISPR/Cas9 是基于 DNA 重组修复原理的第三代基因编辑技术, 该技术已经成功地应用于斑马鱼、啮齿类动物基因组的编辑, 将其应用于 AD 有助于推动 AD 发病机理和治疗方法的研究。该文在介绍 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的基础上, 综述了该技术在 AD 病理模型构建、致病风险因素筛查、治疗靶标寻找和靶向治疗等方面的研究和应用进展。

关键词: CRISPR/Cas9; 阿尔茨海默病; 基因编辑技术; AD 模型

中图分类号: Q78; R749.16 **文献标志码:** A

Application of CRISPR/Cas9 gene-editing technology on the research in Alzheimer's disease

SUN Yu-Ying, ZHOU He-Yan, HUANG Han-Chang*

(Beijing Key Laboratory of Bioactive Substances and Functional Food, Beijing Union University, Beijing 100191, China)

Abstract: Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease, which etiopathogenesis is related to multiple factors, such as genetic and environmental factors. The pathological mechanism of AD is quite complex, and there are only a few drugs developed for AD treatment. CRISPR/Cas9 is the third generation of gene-editing technology based on the principle of DNA recombination and repair. This technology has been successfully used in the genome modification from lower animals to mammals, such as zebrafish and rodents. The application of CRISPR/Cas9 technology in AD research might contribute to the discovery of pathological mechanism and the methodologic development of AD treatment. This article introduced the technology of CRISPR/Cas9 and reviewed the progress on research and application of this technology in AD, including the construction of pathological models, the screening of pathogenic risk factors, and the research for the therapeutic targets and the targeted therapy.

Key words: CRISPR/Cas9; Alzheimer's disease (AD); gene-editing technology; AD model

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种与年龄相关的神经退行性疾病。AD 患者在行为上表现为认知功能下降、记忆丢失以及生活自理能力降低等^[1]。根据美国阿尔茨海默病协会的调查, 自 2000 年至 2018 年, 美国因患 AD 死亡的人数增加了 146.2%; 到 21 世纪中叶, 美国 65 岁及以上的 AD 患者甚至可能会由现在的 580 万增加到 1 380 万^[2]。据统计, 目前我国痴呆症的患病率约为 6.0%, 年龄在 60 岁及以上的痴呆症患者人数约为 1 507 万, 其中 AD 患者约为 983 万^[3]。

年龄是 AD 患病风险因素之一。以发病年龄划分, AD 通常被划分为两类: 发病年龄在 65 岁之前的早发性 AD (early onset AD, EOAD) 和 65 岁之后的迟发性 AD (late onset, LOAD), 其中大多数 AD 患者为散发性 AD (sporadic AD, SAD)^[4]。以家族性 AD (family AD, FAD) 为主的 EOAD 通常是由淀粉

收稿日期: 2021-01-31; 修回日期: 2021-03-11

基金项目: 北京联合大学科研项目(XP202008, JZ10202001)

*通信作者: E-mail: hanchang@buu.edu.cn

样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP)、早老素 1 (presenilin 1, PS1)、早老素 2 (presenilin 2, PS2) 的基因突变或者缺失造成的^[5]。近 95% 的 AD 患者被认为属于 SAD, 其是由遗传因素及环境因素叠加诱发的, SAD 患者并没有家族患病史^[6]。

目前, AD 潜在的发病机制包括: β -淀粉样蛋白 (β -amyloid, A β) 沉积形成脑内老年斑 (senile plaques, SPs)^[7]、tau 蛋白过度磷酸化形成神经元纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFTs)^[8-9]、氧化应激损伤^[10]、胆碱能神经元变性^[11]、神经炎症诱发炎症因子释放^[12]、脑内金属离子紊乱^[13-14]、肠道菌群失衡^[15]等。因此, AD 的发病机制并非是线性过程, 而是涉及多种因素共同作用的结果。目前已批准用于治疗 AD 的药物是一些改善认知的神经递质类药物或脑代谢赋活药物^[16]。大多数治疗 AD 的药物都集中在减少 A β 和 tau 的毒性^[17], 但不幸的是绝大多数的药物都在临床试验期宣告失败。AD 研究和治疗的难点主要在于其复杂的病理机制导致的病理模型构建困难, 且费用高, 耗时长。

近年来, CRISPR/Cas9 基因编辑技术正在迅速地发展并应用于生物学基础研究和疾病治疗研究领域。该技术可以对细胞系、器官和动物的特定序列的基因进行编辑^[18], CRISPR/Cas9 在 AD 的致病机理研究和治疗方面具有广泛的应用前景。本文首先简要介绍了 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, 其次评述了该技术在 AD 病理模型的构建、致病风险因素的筛查、治疗靶标的寻找和靶向治疗等方面的研究应用进展。

1 CRISPR/Cas9基因编辑技术概述

1.1 CRISPR/Cas9系统组成及作用机制

CRISPR (clustered regularly-interspaced short palindromic repeats) 即簇状规则间隔的短回文重复序列。CRISPR/Cas 系统最早发现于细菌和古生菌中, 后经改造应用于真核生物细胞的基因编辑^[19]。Makarova 等^[20]将 CRISPR/Cas 系统主要分为两类: 1 类系统包含类型 I、III 和 IV, 2 类系统包含类型 II、V 和 VI。CRISPR/Cas9 属于 2 类系统中的 II 型, 是目前最常用的 CRISPR 基因编辑系统^[21]。图 1 为 CRISPR/Cas9 的作用机制。CRISPR/Cas9 系统由 Cas9 核酸酶 (其中包含 HNH 核酸酶结构域和 RuvC 核酸酶结构域^[22]) 和一个单链引导 RNA (single guide RNA, sgRNA/gRNA) 组成。其中, sgRNA 是 CRISPR RNA (crRNA) 和反式激活 RNA (trans-activating crRNA,

tracrRNA) 的融合体, 其与 Cas9 核酸酶结合后, 根据碱基互补配对规则引导 Cas9 核酸酶到达靶向序列^[23], 剪切产生双链断裂 (double-strand breaks, DSBs)^[24]。位于入侵 DNA 上的 crRNA 靶向序列附近的短的保守序列 (2~5 bp) 被称为 PAM (protospacer adjacent motif)。PAM 序列在靶标 DNA 的选择和切割方面具有重要作用^[25], 得使宿主能够区分入侵的外源 DNA 和宿主基因组中不包含 PAM 的 CRISPR 基因座。Cas9 通过在适当的 PAM 上游 3 bp 附近切割 DNA 而导致 DSBs 的产生^[26]。随后, DSBs 将触发细胞的 DNA 修复, 包括非同源末端连接 (nonhomologous end-joining, NHEJ) 介导的易错的 DNA 修复和同源性定向修复 (homology-directed repair, HDR) 介导的无偏差的 DNA 修复。HDR 允许将外源“供体”序列提供给细胞并交换到基因组中, 从而导致序列发生特定变化^[18]。NHEJ 介导的 DNA 修复可快速连接 DSBs, 但会在靶位点产生小的插入和缺失突变, 这些突变可以破坏或消除靶基因或基因组元件的功能^[27]。

1.2 CRISPR/Cas9作为基因编辑技术的优势

现代基因编辑技术是基于生物体对断裂后 DNA 的修复机制, 通过引入靶向 DSB 对动植物以及人类的基因组 DNA 序列进行有效且准确的编辑^[28]。在传统的基因编辑技术中, 靶向切割内源性基因组十分困难, 将细胞和生物体目的基因组引入特定位置进行修饰更加困难^[29-30]。因此, 针对 DNA 切割酶的开发和设计已然是该领域的热点^[30]。目前已被应用在基因编辑技术的四种核酸酶包括: 锌指核酸酶 (zinc-finger nucleases, ZFN)^[31]、转录激活因子样效应物核酸酶 (transcription activator-like effector nucleases,

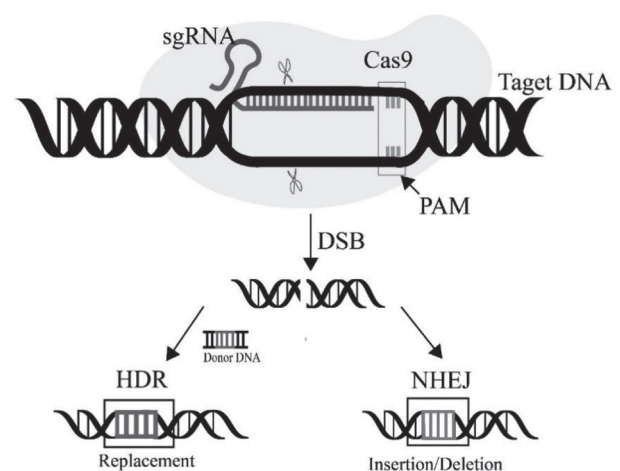


图1 CRISPR/Cas9作用机制图

TALEN)^[32]、归巢核酸内切酶 (eng-ineered meganucleases, MNs)^[33] 以及依赖 RNA 的 CRISPR/Cas9 系统。其中, MNs 虽然脱靶率较低, 但是由于其价格昂贵使用较少。表 1 比较了三代基因编辑技术的优缺点, 其中参考价格和实验周期主要综合了 Thermo Fisher、Simga、Add gene 和上海吉凯基因公司的基因编辑技术服务信息。

尽管 CRISPR/Cas9 目前存在着一些局限, 比如需要依赖 PAM 序列、递送问题等, 但与前两代的基因编辑技术相比, CRISPR/Cas9 具有价格较低、实验周期短、操作简单且脱靶率较低的特点。CRISPR/Cas9 已在人类基因治疗研究^[41]、水稻作物基因型改良^[42] 等方面有了较多应用。同时, CRISPR 领域正在以令人难以置信的速度发展, 在 NCBI、CNKI 等数据库中对基因编辑技术进行检索发现, 近年来的文章皆以 CRISPR/Cas9 为编辑技术。因此, 该技术具有广阔的应用前景。

2 CRISPR/Cas9在AD研究中的应用

近年来, 由于 CRISPR/Cas9 实验周期短且价格相对其他基因编辑技术较低, 其在 AD 的致病机理以及靶向治疗方向的研究十分热门。以 CRISPR/Cas9 以及 AD 为索引词在 PubMed 以及 CNKI 中进行检索, 发现近五年在 AD 研究领域该技术相关的论文发表量及应用如图 2 所示。目前, CRISPR/Cas9 在 AD 领域内的应用主要包括细胞模型构建、

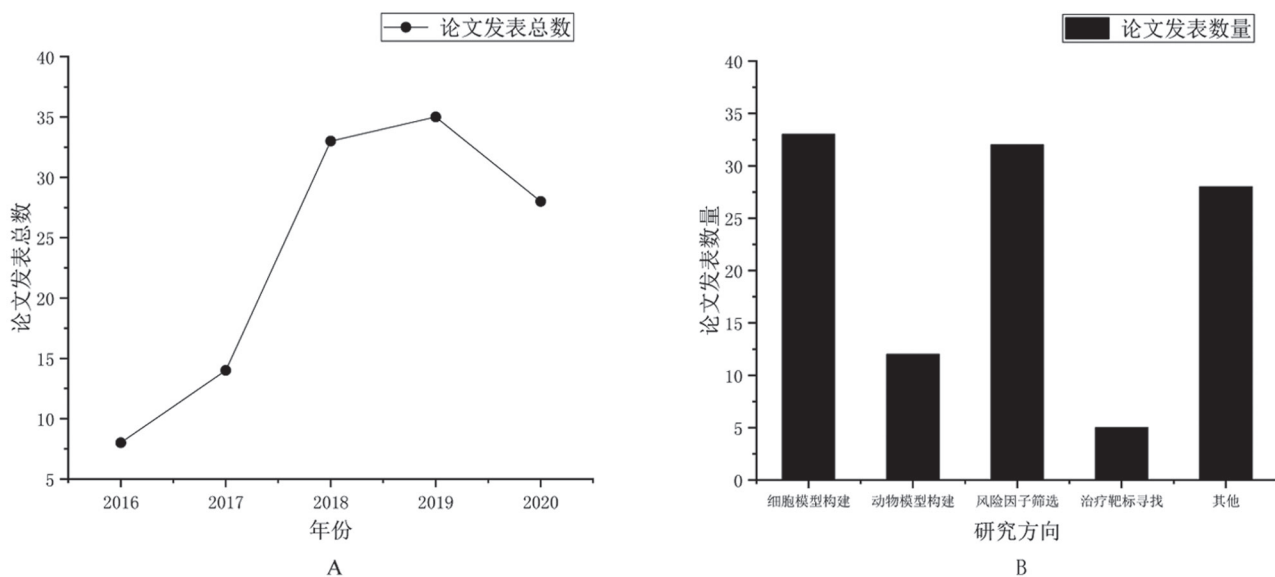
AD 鼠模型构建、AD 患病风险因子筛选以及 AD 治疗靶标寻找等方面。

2.1 AD细胞模型构建

基于动物伦理问题, 细胞模型由于其数量大、繁殖快、费用低等优点较为广泛地应用在 AD 致病机理及其相关代谢通路探究^[43]、相关治疗药物初筛^[44] 以及靶向治疗机制的初步验证^[45]。目前常用于 AD 研究的细胞主要包括人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 和 SK-N-SH, 以及小鼠海马神经元细胞系 HT22 和胶质细胞 BV2 等。CRISPR/Cas9 基因编辑技术可以从基因水平上构建 AD 细胞模型。部分实验室已经利用 CRISPR/Cas9 技术构建了一系列 AD 致病机理研究相关的细胞模型: 利用 CRISPR/Cas9 技术, Wang 等^[46] 下调了 HT22 细胞中硫氧还蛋白相互作用蛋白 (thioredoxin-interacting protein, Txnip) 的表达, 发现 A β 诱导的蛋白亚硝基化和亚磺酰化减弱, 验证了 A β 可能通过上调 Txnip 的表达从而抑制硫氧还蛋白 (thioredoxin, Trx) 的还原能力并增强蛋白质半胱氨酸氧化修饰, 进一步说明蛋白质半胱氨酸氧化修饰可能与 AD 发病有关。郭姗姗等^[47] 利用该技术建立了稳定的环磷腺苷效应因子结合蛋白 (cAMP response-element binding protein, CREB) 基因敲除 (KO) 的 HT22 细胞系, 并验证了 CREB 对 APP 基因的表达有一定的下调作用。Song 等^[48] 使用 CRISPR/Cas9 技术构建肾脏表达蛋白 (kidney and brain-expressed protein, KIBRA) 敲低的 HT22 细胞系,

表1 三代基因编辑技术的比较

技术类型	操作基因个数	脱靶率	价格	实验周期	应用举例	参考文献
ZFN	允许多基因	较高	\$ 25 000左右(高)	较长, 以月计	1. 纠正小鼠Hurler综合征 2. 将多个基因靶向整合到单个大豆基因座中 3. 利用ZFN破坏CCR5基因, 阻止HIV进入细胞	[34-36]
TALEN	单基因	较低	\$ 1 000左右(较低)	较短, 以天计	1. 破坏编码TCR α 亚基的TRAC基因 2. 在小麦中转入uidA基因, 并对内源lr21P基因进行编辑 3. 敲除鸡的DDX4基因座, 证明DDX4对生殖细胞谱系发育具有重要作用	[37-39]
CRISPR/Cas9	允许多基因	较低	\$ 500左右(较低)	较短, 几天到几周不等	1. 利用AAV-CRISPR/Cas9对LDLR基因突变体进行校正, 可以部分改善动脉粥样硬化 2. 修复了血友病B患者来源的iPSC中的致病突变 3. 利用CRISPR/Cas9建立C57Bl/6J小鼠受精卵Nomo1基因突变细胞模型	[40-42]



A: 近五年CRISPR/Cas9应用于AD研究的论文发表总数; B: 近五年AD研究领域CRISPR/Cas9相关的研究方向及相应论文发表数

图2 AD研究领域CRISPR/Cas9相关技术的论文数量及研究方向

并在体外证实了 *KIBRA* 是一种神经保护基因, 可促进细胞存活并抑制 $A\beta$ 诱导的细胞凋亡。目前, 依赖诱导性多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSC) 技术构建 AD 细胞系相关成果较多, 包括载脂蛋白 E (apolipoprotein E, ApoE) KO 或 *ApoE- ϵ 2/ ϵ 2*、*ApoE- ϵ 3/ ϵ 3*、*ApoE- ϵ 4/ ϵ 4* 基因型的 iPSC 系^[49]; 纯合的 miR-26b (与多种人类疾病有关, 包括 AD) 茎环敲除的 iPSC 系^[50]; APP Sweden 突变 (*APP^{Swe}*)/*PS1-M146V* “双突变” iPSC 系^[51]; *APP-KO* 的 iPSC 系, 并将其分化为人星形胶质细胞^[52]; *PS1/PS2-KO* 的 N2A 小鼠神经母细胞瘤细胞新型细胞系 (N2A-*PS1/2KO-8/71*), 并对 *PS1* 和 *PS2* 变体进行测试^[53]。

2.2 AD鼠模型构建

相比于细胞模型, 动物模型与人更相近, 能较好地模拟人体环境。Plc γ 2 的表达是髓样细胞触发受体 2 (triggering receptor expressed on myeloid cells 2, TREM2) 引发的信号通路所必需的。在小胶质细胞 TREM2-Plc γ 2 通路依赖性的药理学调节研究中, 有研究人员利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建了 *Plc γ 2* 基因 P522R 突变敲入 (KI) 小鼠模型^[54]。该 *Plc γ 2*-P522R 变体可促进与 TREM2 信号转导相关的保护功能, 可能是 AD 治疗的一种新的选择。Cheng-Hathaway 等^[55] 利用 CRISPR/Cas9 技术构建了一种表达 TREM2 蛋白 R47H 突变体的 *TREM2* 基因单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 的小鼠模型, 并在小鼠 4 个月大时对 *TREM2* 基因

的表达、 $A\beta$ 沉积的髓样细胞反应、噬菌斑负担、神经营养不良进行评估, 由此得出以下结论: AD 相关的 TREM2 R47H 变体可导致 TREM2 功能丧失, 并加剧 $A\beta$ 斑块周围的神经营养不良, 从而增加 AD 风险。该技术也可以直接对受精卵进行基因组编辑, 从而产生具有各种 *APP* 3'-UTR 缺失的嵌合体^[56]。陈晓娟等^[57] 利用该技术构建表达载体并将其显微注射入 C57BL/6J 品系野生雌性小鼠的受精卵中, 在 F2 代成功构建了 α 7 烟碱型胆碱能受体基因 (α 7 nicotinic acetylcholine receptor, *α 7nAChR*) KO 的 AD 模型小鼠。王海等^[58] 利用类似的方法成功构建了 *APP^{Swe}/PS1 Δ E9* 双转基因 AD 小鼠模型。这些 AD 鼠模型的构建为 AD 相关研究打下了基础。此外, 还有一些研究者构建了其他动物如斑马鱼^[59] 模型等。相比于目前较为成熟的 *APP/PS1* 双转基因模型鼠的商业化, CRISPR/Cas9 技术构建 AD 鼠模型大部分仍处于实验室阶段, 其主要问题在于 CRISPR/Cas9 技术的脱靶问题相较于成熟的胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ES) 打靶技术较为严重。不过, 部分公司如国内的赛业生物技术公司已经可以提供 CRISPR 基因 KO 鼠相关服务。CRISPR/Cas9 技术与传统 ES 打靶技术相比, 该技术不限物种、周期较短、价格便宜, 十分具有潜力。

2.3 AD的患病风险因素筛查

早期家族性 AD 的形成与 *APP* 和 *PS1/2* 基因的突变密切相关。相比之下, 散发性 AD 是一种多

因素疾病, 不仅可能与 *ApoE* 和许多其他基因的等位基因变异等遗传因素相关, 还与环境、年龄、甚至一些疾病包括血管疾病、糖尿病等相关, 而且线粒体功能障碍、感染等均为 AD 患病的风险因素^[60]。有假说认为 AD 中 tau 的聚集可能与朊蛋白的聚集作用机制类似: 从一个细胞释放的病理性 tau 聚集体被相邻的细胞摄取, 导致正常 tau 发生病理性改变。Kolay 和 Diamond^[61] 利用全基因组关联研究 (genome-wide association study, GWAS) 的 Meta 分析, 筛选了 22 个 AD 患病风险基因, 并利用 CRISPR/Cas9 技术进行基因敲除来研究这 22 个风险基因对 HEK293T 细胞 tau 的朊蛋白样病理改变作用。研究发现, ApoE、聚集素 (clusterin, CLU)、磷脂肌醇结合网格蛋白装配蛋白 (phosphatidylinositol-binding clathrin assembly, PICALM)、分拣蛋白相关受体 L1 (sortilin-related receptor 1, SORL1) 等在 22 种 AD 风险基因不太可能直接调控 tau 蛋白的朊蛋白样病理性聚集变化。

SORL1/SORLA 是与内体 (endosome) 运输相关的一种分选受体, 而且 *SORL1/SORLA* 基因也被认为是 AD 致病风险基因。Knupp 等^[62] 利用 CRISPR/Cas9 技术建立了 *SORL1-KO* 的 iPSC 细胞系, 研究发现: 与野生型相比, *SORL1* 基因缺失导致内体增大 (在 iPSC 分化的神经元中), 且内体增大与淀粉样蛋白加工途径无关, 但会影响 APP 在神经元内的运输, 这暗示 *SORL1* 可能在内体网络功能调节及 AD 发病中具有更广泛的作用。Sabbir^[63] 在体外使用基于 CRISPR/Cas9 的钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 2 (calcium/calmodulin dependent protein kinase 2, CaMKK2) 敲除 HEK293 和 HepG2 细胞系进行研究, 发现 CaMKK2 的缺失会干扰铁转运蛋白 (transferrin, TF) 的运输和周转。铁的异常积累或 Ca^{2+} 稳态失衡可导致 AD 中的神经变性。Pascual-Caro 等^[64] 构建了基质蛋白相互作用分子 1 (stromal interaction molecule 1, STIM1) 缺陷型 SH-SY5Y 细胞, 对 *STIM1*

基因座进行了编辑。对 *STIM1-KO* 细胞的研究发现, *STIM1* 不是分化所必需的, 但是对于细胞分化十分重要, 并且 *STIM1* 丢失会对线粒体去极化和衰老产生影响。*STIM1-KO* 细胞系不仅可用于研究神经调节过程中与 *STIM1* 相关的信号通路, 而且可以作为研究 AD 发病机理的体外细胞模型。

2.4 AD 相关基因的靶标寻找和靶向治疗

靶向基因治疗包括对靶点的寻找以及在机体内进行特定的靶向治疗, 如在脑内可以进行靶向 AD 致病基因的特异性治疗^[65]。CRISPR/Cas9 技术在构建实验模型探究靶标以及基因治疗方面已经引起了一定的关注。

在寻找靶标方面, 可以利用 CRISPR/Cas9 技术通过敲除或下调可疑基因的表达来研究该基因在机体中发挥的作用^[66], 或构建基于某个致病机理的 AD 疾病模型对一些指标进行分析。在寻找靶标时, 与利用 RNAi 技术靶向成熟转录本相比, CRISPR/Cas9 (CRISPRi) 技术更为强大, 该技术可以靶向整个转录单位, 包括其他剪接同工型和嵌入的非编码 RNA^[67], 实现基因敲除。利用该技术, 研究者可以为靶基因设计特定的 sgRNA 从而对该基因的作用进行探究, 甚至可以同时敲除多个基因, 其过程与传统敲除技术相比更加快捷。该技术在 AD 相关研究中的局限性在于所构建的模型均基于基因水平, 如基因敲除、内源基因表达调控^[19] 等, 但是对于 AD 致病机理相关假说中金属离子紊乱等需外源诱导的模型, 目前仍无法使用该技术。

近年来, 运用该技术寻找的与 AD 相关的可能治疗靶标如表 2 所示。Park 等^[68] 结合纳米载体递送技术, 利用 CRISPR/Cas9 技术靶向编辑有丝分裂神经元中的 β -分泌酶 1 基因 (β -secretase 1, *BACE1*), 并在 5 × FAD 和敲入 *APP* 基因的 AD 小鼠模型中证明了其治疗作用。Raikwar 等^[66] 研究了 CRISPR/Cas9 介导的胶质细胞成熟因子 (glia maturation factor, GMF) 基因编辑是否导致 GMF 表达抑制和小胶质

表2 利用CRISPR/Cas9技术发现的可能的AD治疗靶标

实验模型	具体操作及结果	靶标	参考文献
转基因 <i>APP^{swe}</i> 小鼠	破坏 <i>APP^{swe}</i> 等位基因, $A\beta$ 减少	<i>APP</i> 等位基因	[5]
BV2 小胶质细胞系	下调 <i>GMF</i> 的表达, 抑制小胶质细胞的激活	<i>GMF</i>	[66]
5 × FAD 小鼠及敲入 <i>APP</i> 基因小鼠	下调 <i>BACE1</i> 的表达, 降低两种模型中的 $A\beta$ 含量, 改善小鼠认知功能	<i>BACE1</i>	[68]
hiPSC 衍生的神经元	编辑 <i>APP</i> 的 C 末端并改变 <i>APP</i> 裂解途径, 使得 β 裂解途径减弱, $A\beta$ 减少, 同时 α 裂解途径增强	<i>APP</i> C 末端	[69]

细胞活化抑制, 并证明了 GMF 可能是一种新型的 AD 治疗靶标。György 等^[5]借助 CRISPR/Cas9 技术产生了 *APP^{sw}* 或 *APP^{WT}* 的等位基因特异性缺失, 该系统可能被开发为 *APP^{sw}* 和 A β 升高相关的其他点突变引起的 AD 的基因治疗工具。Sun 等^[69]基于 CRISPR/Cas9 策略, 在培养的神经元中对淀粉样蛋白形成途径进行干预, 在 C 末端编辑内源性 *APP* 基因, 减弱了 A β 的形成, 并且促进了 *APP* 的非淀粉样切割途径, 从而实现对神经的保护。

CRISPR/Cas9 技术在基因治疗方面的潜力不容小觑。2016 年, 四川大学华西医院进行了首例 CRISPR/Cas9 癌症治疗试验, 利用 CRISPR/Cas9 敲除离体 T 细胞中的程序性细胞死亡蛋白 1 (programmed cell death protein-1, PD-1) 基因, 扩增 T 细胞后再输回患者体内达到治疗目的^[70], 这一试验对 CRISPR/Cas9 基因编辑技术应用于基因治疗进行了概念性的验证。靶向基因治疗是一种靶标特异性很强的治疗手段, 但是其风险也很大, 递送介质的毒性以及能否穿过血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 仍然需要研究。除此之外, CRISPR/Cas9 的脱靶率、作用效果以及是否会对机体产生副作用都是值得考虑的。但是, AD 是一种与基因和环境等多因素相关的神经退行性疾病, 只在基因水平靶向治疗恐怕难以达到很好的治疗效果。

总之, 利用 CRISPR/Cas9 在体外寻找治疗靶点是可行的。但是, 目前将该技术应用于 AD 的靶向治疗尚不可行, 在降低脱靶率、设计良好的递送介质、降低治疗风险等方面仍需进一步的研究。另外, 在 AD 治疗应用方面, 该技术也需要与其他技术相辅相成。

3 总结及展望

CRISPR/Cas9 系统已成功应用于修饰不同动物的基因组 (包括小鼠^[55-56]、斑马鱼^[71-72]、猪^[73]等) 和细胞 (如胚胎细胞、干细胞^[74-75]等)。近年来, 该技术介导的 AD 相关的研究论文发表数量逐渐增加。其研究方向主要体现在利用该技术构建 AD 细胞模型和鼠模型、在相关模型中进行 AD 致病机理的研究, 通过敲除特定基因筛选风险因子、寻找 AD 治疗靶标, 以及在动物水平上研究靶向治疗等。但是, 由于该技术存在递送系统的脱靶和有效组织部位效应问题, CRISPR/Cas9 在 AD 动物模型构建以及靶向基因治疗方面的应用仍然面临严峻的挑战。目前, 大量降低脱靶率的研究主要聚焦在

CRISPR/Cas9 质粒的递送介质上, 其中包括脂质体^[76]和非病毒纳米粒子^[77]。这些递送技术的研究为将来 CRISPR/Cas9 技术应用于 AD 研究奠定了基础。尽管啮齿类动物模型被广泛用于 AD 研究, 但其寿命较短且无法完全模拟 AD 患者脑内的情况, 故基于啮齿类动物模型的研究应用于人类疾病的治疗需要谨慎地考量。近年来, 非人灵长类动物模型由于其生理与遗传上与人类高度相似而备受关注, CRISPR/Cas9 技术构建模型速度快且无需导入外源基因的特点使其可以直接在实验动物体内实现多位点突变, 更加适用于价格较贵的灵长类动物。另外, 利用 CRISPR/Cas9 技术编辑非人灵长类动物构建的模型可以表现与人类基本相同的病理特点。目前, 已有部分研究通过该技术构建了可用于疾病研究的实验动物模型, 包括早衰综合征 (Hutchinson-Gilford progeria syndrome) 食蟹猴模型^[78]、用于帕金森症 (Parkinson's disease, PD) 疾病机理研究的 *PINK1* (PTEN induced putative kinase 1) 基因 KO 的恒河猴模型^[79], 以及高表达 *APP* 基因的食蟹猴 AD 模型^[80]等。这提示 AD 相关研究者可以根据该技术构建非人灵长类动物疾病模型, 在此基础上进行基因治疗研究, 更好地重现 AD 的年龄依赖性特点, 并在一定程度上对 AD 的病理数据进行扩充。尽管如此, 实验动物的繁殖率和寿命仍需更多的研究来改善^[81]。因此, 排除经济因素, 运用 CRISPR/Cas9 技术编辑非人灵长类动物构建模型仍面临一定挑战。

CRISPR/Cas9 作为新一代的基因编辑技术, 无论是在实验周期、经济角度以及实验的复杂程度上均优于前两代; 基于其高效的编辑能力, 该技术应用于 AD 模型构建、AD 致病机理研究以及治疗靶标寻找前景十分可观。但考虑到其涉及的伦理和安全问题, 如利用该技术在生殖系编辑特定区域的伦理和安全问题以及运用该技术进行基因治疗是否会影 响人类基因组^[82]等, 该技术能否用于 AD 的基因治疗甚至基因组编辑是值得深思的。

[参 考 文 献]

- [1] Matthews BR. Memory dysfunction. *Continuum (Minneapolis)*, 2015, 21: 613-26
- [2] Osama A, Zhang J, Yao J, et al. Nrf2: a dark horse in Alzheimer's disease treatment. *Ageing Res Rev*, 2020, 64: 101206
- [3] Jia L, Du Y, Chu L, et al. Prevalence, risk factors, and management of dementia and mild cognitive impairment in adults aged 60 years or older in China: a cross-sectional study. *Lancet Public Health*, 2020, 5: e661-71

- [4] Kisilevsky R. From arthritis to Alzheimer's disease: current concepts on the pathogenesis of amyloidosis. *Can J Physiol Pharmacol*, 1987, 65: 1805-15
- [5] György B, Lööv C, Zaborowski MP, et al. CRISPR/Cas9 mediated disruption of the Swedish *APP* allele as a therapeutic approach for early-onset Alzheimer's disease. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018, 11: 429-40
- [6] Zetterberg H, Mattsson N. Understanding the cause of sporadic Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother*, 2014, 14: 621-30
- [7] Jack CR Jr, Knopman DS, Jagust WJ, et al. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol*, 2010, 9: 119-28
- [8] Ittner LM, Ke YD, Delerue F, et al. Dendritic function of tau mediates amyloid- β toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell*, 2010, 142: 387-97
- [9] Muralidar S, Ambi SV, Sekaran S, et al. Role of tau protein in Alzheimer's disease: the prime pathological player. *Int J Biol Macromol*, 2020, 163: 1599-617
- [10] Wang X, Wang W, Li L, et al. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1842: 1240-7
- [11] Grothe M, Heinsen H, Teipel SJ. Atrophy of the cholinergic basal forebrain over the adult age range and in early stages of Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*, 2012, 71: 805-13
- [12] He Y, Ruganzu JB, Jin H, et al. LRP1 knockdown aggravates $A\beta_{1-42}$ -stimulated microglial and astrocytic neuroinflammatory responses by modulating TLR4/NF- κ B/MAPKs signaling pathways. *Exp Cell Res*, 2020, 394: 112166
- [13] Huang HC, Hong L, Chang P, et al. Chitoooligosaccharides attenuate Cu^{2+} -induced cellular oxidative damage and cell apoptosis involving Nrf2 activation. *Neurotox Res*, 2015, 27: 411-20
- [14] Tomljenovic L. Aluminum and Alzheimer's disease: after a century of controversy, is there a plausible link? *J Alzheimers Dis*, 2011, 23: 567-98
- [15] Shen H, Guan Q, Zhang X, et al. New mechanism of neuroinflammation in Alzheimer's disease: the activation of NLRP3 inflammasome mediated by gut microbiota. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2020, 100: 109884
- [16] Ferreira-Vieira TH, Guimaraes IM, Silva FR, et al. Alzheimer's disease: targeting the cholinergic system. *Curr Neuropharmacol*, 2016, 14: 101-15
- [17] Scannevin RH. Therapeutic strategies for targeting neurodegenerative protein misfolding disorders. *Curr Opin Chem Biol*, 2018, 44: 66-74
- [18] Giau VV, Lee H, Shim KH, et al. Genome-editing applications of CRISPR-Cas9 to promote *in vitro* studies of Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging*, 2018, 13: 221-33
- [19] Gupta D, Bhattacharjee O, Mandal D, et al. CRISPR-Cas9 system: a new-fangled dawn in gene editing. *Life Sci*, 2019, 232: 116636
- [20] Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13: 722-36
- [21] Liu C, Zhang L, Liu H, et al. Delivery strategies of the CRISPR-Cas9 gene-editing system for therapeutic applications. *J Control Release*, 2017, 266: 17-26
- [22] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337: 816-21
- [23] Chira S, Gulei D, Hajitou A, et al. CRISPR/Cas9: transcending the reality of genome editing. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2017, 7: 211-22
- [24] Kleinstiver BP, Prew MS, Tsai SQ, et al. Broadening the targeting range of *Staphylococcus aureus* CRISPR-Cas9 by modifying PAM recognition. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 1293-8
- [25] Jiang F, Doudna JA. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms. *Annu Rev Biophys*, 2017, 46: 505-29
- [26] Shah SA, Erdmann S, Mojica FJ, et al. Protospacer recognition motifs: mixed identities and functional diversity. *RNA Biol*, 2013, 10: 891-9
- [27] Zhang F, Wen Y, Guo X. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Hum Mol Genet*, 2014, 23: R40-6
- [28] Maeder ML, Gersbach CA. Genome-editing technologies for gene and cell therapy. *Mol Ther*, 2016, 24: 430-46
- [29] Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 2014, 346: 1258096
- [30] Cong L, Zhang F. Genome engineering using CRISPR-Cas9 system. *Methods Mol Biol*, 2015, 1239: 197-217
- [31] Bilichak A, Sastry-Dent L, Sriram S, et al. Genome editing in wheat microspores and haploid embryos mediated by delivery of ZFN proteins and cell-penetrating peptide complexes. *Plant Biotechnol J*, 2020, 18: 1307-16
- [32] Benjamin R, Berges BK, Solis-Leal A, et al. TALEN gene editing takes aim on HIV. *Hum Genet*, 2016, 135: 1059-70
- [33] Redondo P, Prieto J, Muñoz IG, et al. Molecular basis of xeroderma pigmentosum group C DNA recognition by engineered meganucleases. *Nature*, 2008, 456: 107-11
- [34] Ou L, DeKolver RC, Rohde M, et al. ZFN-mediated *in vivo* genome editing corrects murine Hurler syndrome. *Mol Ther*, 2019, 27: 178-87
- [35] Bonawitz ND, Ainley WM, Itaya A, et al. Zinc finger nuclease-mediated targeting of multiple transgenes to an endogenous soybean genomic locus via non-homologous end joining. *Plant Biotechnol J*, 2019, 17: 750-61
- [36] Tebas P, Stein D, Tang WW, et al. Gene editing of *CCR5* in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N Engl J Med*, 2014, 370: 901-10
- [37] Harrison PT. Double TALEN-edited T-cells kick B-ALL into touch. *Gene Ther*, 2017, 24: 122
- [38] Luo M, Li H, Chakraborty S, et al. Efficient TALEN-mediated gene editing in wheat. *Plant Biotechnol J*, 2019, 17: 2026-8
- [39] Taylor L, Carlson DF, Nandi S, et al. Efficient TALEN-mediated gene targeting of chicken primordial germ cells. *Development*, 2017, 144: 928-34

- [40] Zhao H, Li Y, He L, et al. *In vivo* AAV-CRISPR/Cas9-mediated gene editing ameliorates atherosclerosis in familial hypercholesterolemia. *Circulation*, 2020, 141: 67-79
- [41] Morishige S, Mizuno S, Ozawa H, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene correction in hemophilia B patient-derived iPSCs. *Int J Hematol*, 2020, 111: 225-33
- [42] García-Tuñón I, Vuelta E, Lozano L, et al. Establishment of a conditional Nom1 mouse model by CRISPR/Cas9 technology. *Mol Biol Rep*, 2020, 47: 1381-91
- [43] Wang X, Zhang M, Liu H. LncRNA17A regulates autophagy and apoptosis of SH-SY5Y cell line as an *in vitro* model for Alzheimer's disease. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2019, 83: 609-21
- [44] Wan Y, Liang Y, Liang F, et al. A curcumin analog reduces levels of the Alzheimer's disease-associated amyloid- β protein by modulating A β PP processing and autophagy. *J Alzheimers Dis*, 2019, 72: 761-71
- [45] Kang JM, Yeon BK, Cho SJ, et al. Stem cell therapy for Alzheimer's disease: a review of recent clinical trials. *J Alzheimers Dis*, 2016, 54: 879-89
- [46] Wang Y, Wang Y, Bharti V, et al. Upregulation of thioredoxin-interacting protein in brain of amyloid- β protein precursor/presenilin 1 transgenic mice and amyloid- β treated neuronal cells. *J Alzheimers Dis*, 2019, 72: 139-50
- [47] 郭姗姗, 张冰莹, 何文欣, 等. 利用CRISPR/Cas9技术构建CREB基因敲除细胞系并探讨CREB对APP基因表达的调控作用. *中国细胞生物学学报*, 2017, 39: 1147-55
- [48] Song L, Tang S, Dong L, et al. The neuroprotection of KIBRA in promoting neuron survival and against amyloid β -induced apoptosis. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13: 137
- [49] Schmid B, Prehn KR, Nimsanor N, et al. Generation of a set of isogenic, gene-edited iPSC lines homozygous for all main APOE variants and an APOE knock-out line. *Stem Cell Res*, 2019, 34: 101349
- [50] Kung LHW, Sampurno L, Little CB, et al. Generation of a miR-26b stem-loop knockout human iPSC line, MCRIi019-A-1, using CRISPR/Cas9 editing. *Stem Cell Res*, 2020, 50: 102118
- [51] Kwart D, Gregg A, Scheckel C, et al. A large panel of isogenic APP and PSEN1 mutant human iPSC neurons reveals shared endosomal abnormalities mediated by APP β -CTFs, not A β . *Neuron*, 2019, 104: 256-70.e5
- [52] Fong LK, Yang MM, Dos Santos Chaves R, et al. Full-length amyloid precursor protein regulates lipoprotein metabolism and amyloid- β clearance in human astrocytes. *J Biol Chem*, 2018, 293: 11341-57
- [53] Pimenova AA, Goate AM. Novel presenilin 1 and 2 double knock-out cell line for *in vitro* validation of PSEN1 and PSEN2 mutations. *Neurobiol Dis*, 2020, 138: 104785
- [54] Takalo M, Wittrahm R, Wefers B, et al. The Alzheimer's disease-associated protective P1c2-P522R variant promotes immune functions. *Mol Neurodegener*, 2020, 15: 52
- [55] Cheng-Hathaway PJ, Reed-Geaghan EG, Jay TR, et al. The *Trem2* R47H variant confers loss-of-function-like phenotypes in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*, 2018, 13: 29
- [56] Nagata K, Takahashi M, Matsuba Y, et al. Generation of *App* knock-in mice reveals deletion mutations protective against Alzheimer's disease-like pathology. *Nat Commun*, 2018, 9: 1800
- [57] 陈晓娟, 李巍, 张旭亮. 应用CRISPR/Cas9技术制备阿尔茨海默病小鼠模型. *中国老年学杂志*, 2019, 39: 2742-5
- [58] 王海, 申及, 邹小冬, 等. 利用CRISPR/Cas9系统快速建立APP^{swe}/PS1^{dE9}双转基因阿尔茨海默病小鼠模型. *浙江医学*, 2020, 42: 1583-7+93
- [59] 张芳, 陈豪, 李行舟, 等. 基质金属蛋白酶-9基因敲除斑马鱼模型的建立. *国际药学研究杂志*, 2018, 45: 914-9+33
- [60] R AA. Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol*, 2019, 57: 87-105
- [61] Kolay S, Diamond MI. Alzheimer's disease risk modifier genes do not affect tau aggregate uptake, seeding or maintenance in cell models. *FEBS Open Bio*, 2020, 10: 1912-20
- [62] Knupp A, Mishra S, Martinez R, et al. Depletion of the AD risk gene *SORL1* selectively impairs neuronal endosomal traffic independent of amyloidogenic APP processing. *Cell Rep*, 2020, 31: 107719
- [63] Sabbir MG. Loss of Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase kinase 2 leads to aberrant transferrin phosphorylation and trafficking: a potential biomarker for Alzheimer's disease. *Front Mol Biosci*, 2018, 5: 99
- [64] Pascual-Caro C, Berrocal M, Lopez-Guerrero AM, et al. STIM1 deficiency is linked to Alzheimer's disease and triggers cell death in SH-SY5Y cells by upregulation of L-type voltage-operated Ca²⁺ entry. *J Mol Med (Berl)*, 2018, 96: 1061-79
- [65] Arora S, Layek B, Singh J. Design and validation of liposomal *ApoE2* gene delivery system to evade blood-brain barrier for effective treatment of Alzheimer's disease. *Mol Pharm*, 2021, 18: 714-25
- [66] Raikwar SP, Thangavel R, Dubova I, et al. Targeted gene editing of glia maturation factor in microglia: a novel Alzheimer's disease therapeutic target. *Mol Neurobiol*, 2019, 56: 378-93
- [67] Kampmann M, Horlbeck MA, Chen Y, et al. Next-generation libraries for robust RNA interference-based genome-wide screens. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: E3384-91
- [68] Park H, Oh J, Shim G, et al. *In vivo* neuronal gene editing via CRISPR-Cas9 amphiphilic nanocomplexes alleviates deficits in mouse models of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci*, 2019, 22: 524-8
- [69] Sun J, Carlson-Stevermer J, Das U, et al. CRISPR/Cas9 editing of APP C-terminus attenuates β -cleavage and promotes α -cleavage. *Nat Commun*, 2019, 10: 53
- [70] Cyranoski D. CRISPR gene-editing tested in a person for the first time. *Nature*, 2016, 539: 479
- [71] Bai H, Liu L, An K, et al. CRISPR/Cas9-mediated precise genome modification by a long ssDNA template in zebrafish. *BMC Genomics*, 2020, 21: 67
- [72] Naert T, Tulkens D, Edwards NA, et al. Maximizing CRISPR/Cas9 phenotype penetrance applying predictive

- modeling of editing outcomes in *Xenopus* and zebrafish embryos. *Sci Rep*, 2020, 10: 14662
- [73] Chen J, An B, Yu B, et al. CRISPR/Cas9-mediated knockin of human factor IX into swine factor IX locus effectively alleviates bleeding in hemophilia B pigs. *Haematologica*, 2021, 106: 829-37
- [74] Pavani G, Laurent M, Fabiano A, et al. *Ex vivo* editing of human hematopoietic stem cells for erythroid expression of therapeutic proteins. *Nat Commun*, 2020, 11: 3778
- [75] Rohn F, Kordes C, Buschmann T, et al. Impaired integrin α_5/β_1 -mediated hepatocyte growth factor release by stellate cells of the aged liver. *Aging Cell*, 2020, 19: e13131
- [76] Zhen S, Li X. Liposomal delivery of CRISPR/Cas9. *Cancer Gene Ther*, 2020, 27: 515-27
- [77] Chen F, Alphonse M, Liu Q. Strategies for nonviral nanoparticle-based delivery of CRISPR/Cas9 therapeutics. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2020, 12: e1609
- [78] Wang F, Zhang W, Yang Q, et al. Generation of a Hutchinson-Gilford progeria syndrome monkey model by base editing. *Protein Cell*, 2020, 11: 809-24
- [79] Yang W, Li S, Li XJ. A CRISPR monkey model unravels a unique function of PINK1 in primate brains. *Mol Neurodegener*, 2019, 14: 17
- [80] Ishigaki H, Shiina T, Ogasawara K. MHC-identical and transgenic cynomolgus macaques for preclinical studies. *Inflamm Regen*, 2018, 38: 30
- [81] Wan H, Feng C, Teng F, et al. One-step generation of *p53* gene biallelic mutant Cynomolgus monkey via the CRISPR/Cas system. *Cell Res*, 2015, 25: 258-61
- [82] Brokowski C, Adli M. CRISPR ethics: moral considerations for applications of a powerful tool. *J Mol Biol*, 2019, 431: 88-101