

· AD的基础和临床研究专题 ·

## CRISPR/Cas9基因编辑技术在阿尔茨海默病研究中的应用

何静 王蓉

100053 首都医科大学宣武医院中心实验室(何静、王蓉); 100053 北京市老年病医疗研究中心(王蓉); 100053 北京脑重大疾病研究院(王蓉)

通信作者: 王蓉, Email: rong\_wang72@aliyun.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2022.11.005

**【摘要】** 阿尔茨海默病是一种起病隐匿、症状逐渐加重的神经系统退行性疾病,其发病机制复杂,尚无可以逆转疾病的药物。CRISPR/Cas9技术具有周期短、细胞毒性低、价格低廉、传递简单的优点。由于CRISPR/Cas9技术可以针对不同细胞、组织或动物模型进行基因修饰,在神经退行性疾病的研究中显示出巨大的潜力。现介绍CRISPR/Cas9技术的发展、原理及其递送体系,以及目前CRISPR/Cas9技术在阿尔茨海默病模型构建、致病机制研究和靶向治疗等方面的应用与潜力,希望对相关领域的研究者起到参考作用。

**【关键词】** 阿尔茨海默病; CRISPR/Cas9; 递送载体; 阿尔茨海默病模型; 综述

**基金项目:** 国家重点研发计划(2018YFA0108503); 首都卫生发展科研专项(首发 2020-2Z-1034)

**Application of CRISPR/Cas9 gene-editing technology in Alzheimer disease** He Jing, Wang Rong  
Department of Central Laboratory, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China (He J, Wang R); Beijing Geriatric Medical Research Center, Beijing 100053, China (Wang R); Beijing Institute for Brain Disorders, Beijing 100053, China (Wang R)

Corresponding author: Wang Rong, Email: rong\_wang72@aliyun.com

**【Abstract】** Alzheimer disease (AD) is a chronic neurodegenerative disorder with insidious onset and gradual aggravation, with complex pathogenesis. At present, there is no drug to reverse the course of the disease. CRISPR/Cas9 technology has the advantages of short cycle, low cytotoxicity, low price and simple transmission. Because it can be genetically modified for different cells, tissues or animal models, it shows great potential in the study of neurodegenerative diseases. This paper introduces the development, principle and delivery system of CRISPR/Cas9 technology, as well as the application and potential of CRISPR/Cas9 technology in AD model construction, pathogenesis research and targeted therapy, hoping to play a reference role for researchers in related fields.

**【Key words】** Alzheimer disease; CRISPR/Cas9; Delivery carrier; Alzheimer disease model; Review

**Fund programs:** National Key R&D Program of China (2018YFA0108503); Capital Health Research and Development of Special (2020-2Z-1034)

AD是一种中枢神经系统退行性疾病,是最常见的、不可逆的、进行性加重的痴呆症,约占痴呆患者的60%~70%。据WHO统计,2019年AD和其他形式的痴呆症被列为全球第7大死因<sup>[1]</sup>,目前全世界有超过5 500万人患有痴呆症,且估计2050年将约有约1.39亿痴呆症患者<sup>[2]</sup>。痴呆症是全球导致残疾和依赖的主要原因,全球痴呆症的总社会成本估计为1.3万亿美元。从2000至2019年,AD的伤残调整生命年(disability adjusted life year, DALY)增加了一倍多<sup>[1,3]</sup>。我国第7次全国人口普查显示,我国老龄

化进程明显加快,60岁及以上人口约2.64亿,占总人口的18.70%,与2010年第6次全国人口普查相比人口的比重上升5.4个百分点<sup>[4]</sup>。一项横断面研究显示,我国痴呆的总患病率为6.0%,60岁及以上人群中约有1 507万例痴呆患者,其中AD患者983万例<sup>[5]</sup>。1990至2019年,我国因AD导致死亡的顺位从第10位上升至第5位,AD及其他痴呆的疾病负担也从第27位快速上升至第15位,标化DALY率增长了5.7%<sup>[6]</sup>。因此加强对AD的检测、预防与治疗,是有效应对我国人口老龄化的必要之举,也是缓解

全球人口压力,稳定社会和经济发展的必经之路。

随着对AD相关生物标志物的开发、神经心理测评的标准化以及老年痴呆防治服务网络的逐步建立,AD的预防、早期识别与干预正在逐步走上正轨。但AD的治疗手段仍然较局限,国内已上市的药物主要包括胆碱酯酶抑制剂和N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)受体拮抗剂等。因此,有必要引入新的研究方法,以获得更加精准有效的研究与治疗手段。随着基因编辑技术的发展,尤其是CRISPR/Cas9技术的出现,基因治疗不再遥不可及。该技术不仅为遗传病的治愈提供了新方法,更是为复杂的特发性疾病的研究及治疗提供了新思路。

### 一、CRISPR/Cas9基因编辑技术

基因组编辑是一种基因工程技术,是指在细胞DNA中引入特定的序列变化。常用方法是利用工程化核酸酶在特定位点产生DNA双链断裂(double strand break, DSB),诱导非同源末端连接(non-homologous end-joining, NHEJ)或同源重组(homologous recombination, HR),从而完成特定序列的插入、删除、修改或替换。常见工程化核酸酶有锌指核酸酶(ZFNS)、转录激活样效应型核酸酶(Talen)和Cas(clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated protein)核酸酶等。其中,CRISPR/Cas9基因编辑技术的发现者被授予了2020年诺贝尔化学奖<sup>[7]</sup>。自2002年CRISPR被命名至今只有20年<sup>[8]</sup>,但其发展却是激增的,可见其创新性与变革性。

1. CRISPR/Cas基因编辑系统: CRISPR/Cas系统是细菌和古细菌的适应性免疫系统,通过切割外源DNA并整合到CRISPR近端的宿主染色体上,以保护其自身免受病毒和质粒的入侵,从而能够检测特异性序列和沉默外源核酸<sup>[9-10]</sup>。通过设计引导RNA可以靶向和切割特异的目的基因序列,因此CRISPR/Cas系统是高效的、通用的、可编程的基因组编辑工具<sup>[11]</sup>。CRISPR/Cas系统大体分为2类,第1类为CRISPR/Cas系统利用多蛋白效应复合物<sup>[12]</sup>,第2类为CRISPR/Cas系统利用单蛋白效应复合物<sup>[13]</sup>。

2. CRISPR/Cas9基因编辑技术的发展与应用: 目前应用最广泛的CRISPR/Cas9系统属于第2类,是源于化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的Cas9核酸酶(SpCas9),不仅可以在体外切割双链DNA<sup>[13]</sup>,还可以在细菌<sup>[14]</sup>、哺乳动物和人类细胞中实现基因组编辑<sup>[15-16]</sup>。该系统由CRISPR相关核酸酶Cas9、一种特异性决定的CRISPR RNA(CrRNA)和一种辅

助的反式激活的crRNA(TracrRNA)组成<sup>[12]</sup>,其中crRNA和tracrRNA可以通过局部碱基配对嵌合成一个单导RNA(single guide RNA, sgRNA)发挥作用<sup>[17]</sup>。sgRNA含20nt靶基因互补配对序列,用于识别目的基因组序列,并引导Cas9蛋白酶对DNA双链进行有效切割,形成双链断裂。此外,该目的基因序列的3'端需有合适的PAM(protospacer adjacent motif)序列,其功能类似于开关,触发Cas9在靶序列中产生双链DNA断裂。不同的Cas酶要求不同的PAM序列,Cas9所需的PAM序列为5'-NGG。随着越来越多的自然或工程Cas9同源物及其他Cas酶的发现,其适用范围在不断扩大<sup>[18]</sup>。如Liu等通过噬菌体辅助的定向进化开发出了SpCas9的突变体,其将PAM序列的范围扩大了至少4倍<sup>[19]</sup>。

对于双链断裂后修复过程的精确调控是目前亟待解决的问题之一<sup>[20]</sup>,有研究希望通过先导编辑(prime editor)<sup>[21-22]</sup>、表观遗传编辑(chroma epigenetic editor)<sup>[23]</sup>等方法,实现不断裂DNA双链即可实现基因编辑或精准调控基因表达。Cas9通过2个催化结构域(RuvC和HNH)在DNA中引入双链断裂,将这2个结构域定点突变(D10A和H480A)后形成核酸酶失活的Cas9(nuclease-dead Cas9, dCas9)变体<sup>[11]</sup>。dCas9可通过与各种效应域融合,作为序列特异性募集效应蛋白的多功能工具,从而产生CRISPR干扰(CRISPRi)或CRISPR激活(CRISPRa),实现基因表达调节<sup>[24]</sup>、表观遗传编辑<sup>[25]</sup>等。CRISPR/Cas9作为一种低成本、快速、高效、可扩展的操纵基因组序列的工具<sup>[25-27]</sup>,其蕴含的用于疾病治疗的潜力也在不断被挖掘,越来越多的研究在探索基因治疗的新策略<sup>[28-30]</sup>。

### 二、基因编辑系统递送载体

CRISPR/Cas9基因编辑系统可以以3种形式被递送:(1)编码Cas9蛋白和sgRNA的质粒;(2)翻译为Cas9的mRNA和sgRNA;(3)Cas9蛋白和sgRNA形成的核糖核蛋白复合物(ribonucleoprotein complex, RNP)。相较而言,以RNP形式递送的脱靶效应较低<sup>[31]</sup>。物理递送的方法主要包括显微注射(microinjection)和电穿孔(electroporation)等,适用于体外递送实验。体内递送更具挑战性,主要有病毒载体和非病毒纳米颗粒载体。目前,如何高效且有针对性地将CRISPR/Cas9基因编辑系统递送至体内所需细胞中,仍是基因编辑体细胞治疗发展中的最大瓶颈<sup>[32]</sup>。

1. 病毒载体: 常见病毒载体包括腺病毒载体、慢病毒载体和腺病毒相关病毒(adeno-associated virus, AAV)载体等, 其最突出的优势在于转染效率相对较高。病毒载体中应用最为广泛的是AAV, 现已有5种使用AAV载体的基因治疗药物被批准用于临床, 如用于脊髓性肌萎缩的Zolgensma和用于先天性失明患者的Luxturna<sup>[33-34]</sup>。

AAV是依赖病毒属细小病毒科的一种非包膜的单链DNA病毒, 与其他病毒相比, 免疫原性较低<sup>[35]</sup>。重组AAV载体由于缺少反应元件, 不会与宿主基因组整合, 当然其引起插入突变的风险仍然存在<sup>[36]</sup>。通过设计改造AAV载体或定向进化AAV变异体等方式, AAV载体也在不断开发中。最近, 有研究显示一种新的重组AAV变异体(rAAV 2-Retro)可以对投影神经元进行稳健地逆行访问, 从而有潜力实现检查神经回路功能, 以及在目标神经元中进行基因组编辑<sup>[37]</sup>。AAV载体最大的缺点在于装载量较低, 通常只能携带约4.4 kb的外源DNA, 而编码SpCas9的DNA长度为4.2 kb。因此当需要插入同源定向DNA修复的模板时, 就需要同时使用多个载体。当然, 随着源于空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)的Cas9核酸酶(CjCas9)等较小的Cas9蛋白的发现, 可以规避这个问题<sup>[38]</sup>。病毒类载体还有一个共性问题在于, 基因编辑元件的长时程表达, 这可能会导致脱靶效应及免疫反应的产生, 其持久性与安全性仍需考量<sup>[39-41]</sup>。有研究通过改造慢病毒颗粒来递送Cas9的mRNA, 以实现基因编辑系统的瞬时表达<sup>[42]</sup>。

2. 非病毒载体: 虽然非病毒载体的递送效率不如病毒载体, 但其可瞬时暴露基因编辑系统, 且能通过递送RNP以减少Toll样受体(Toll-like receptors, TLR)的激活, 具有较低的免疫毒性<sup>[43]</sup>。常见的非病毒载体有脂质纳米颗粒(lipid nanoparticles, LNP)、无机纳米颗粒(inorganic nanoparticles)等。

LNP是应用时间最久研究最深入的非病毒载体, 其优点在于低免疫原性和毒性。由于LNP入胞后易被引导进入溶酶体途径从而使内容物被降解, 因此其递送效率较低。通过修饰LNP表面可帮助颗粒靶向特定的细胞或组织、避免免疫系统检测或促进内体逃逸<sup>[44]</sup>。

无机纳米颗粒中的金纳米颗粒(gold nanoparticles, AuNPs)由于稳定、易合成和表面功能化等优点, 近年来发展较快。AuNPs的核心为直径为15 nm的金粒子, 其与5'-硫醇修饰的单链DNA(DNA-SH)结合, 然后与供体DNA杂交后可装载RNP, 最后用能够破

坏核内体的聚合物PAsp(Det)包被, 从而AuNPs入胞后内容物可快速向胞质释放<sup>[45]</sup>。

较新颖的非病毒纳米载体还有: 细胞穿透肽(cell-penetrating peptides, CPPs), 两亲性的或非极性的短链氨基酸<sup>[46]</sup>; DNA纳米粒子(DNA nanoclew), 通过滚动循环放大方法合成的类似纱线的DNA纳米粒子等<sup>[47]</sup>。

### 三、CRISPR/Cas9技术在AD治疗研究中的应用进展

CRISPR/Cas9作为一种快速、高效的工具, 不仅促进了AD疾病模型的建立, 而且是AD致病机制研究中的一种有力手段。惊喜的是由于CRISPR/Cas9在疾病治疗方面具有潜力, 关于致病机制研究可扩展为基因治疗靶点的选择, 为AD的治疗提供了新策略。

1. 建立AD疾病模型: 动物/细胞系疾病模型是研究发病机制、疾病进展和治疗方法的重要工具。CRISPR/Cas9技术的发展使得突变动物/细胞系模型的建立变得更加便宜、快速和精确, 从而开发出更接近疾病状况的模型<sup>[48]</sup>。

啮齿类动物由于寿命相对较短、繁殖容易、繁殖速度快、成本较低而被广泛应用于建立疾病模型。可通过手术或药物处理的方式来模拟AD病症, 如向大鼠脑中海马区域注射寡聚 $\beta$ -淀粉样<sub>1-42</sub>肽<sup>[49]</sup>, 或直接向大鼠脑室内注射喹啉酸<sup>[50-51]</sup>、AF64A<sup>[52]</sup>等化合物以损伤胆碱能神经元。虽然这类方法造模时间短, 但由于个体差异等因素, 其结果的再现性不佳<sup>[53]</sup>。目前在AD基础研究中啮齿类转基因小鼠模型的应用最为广泛。1996年由Hsiao等<sup>[54]</sup>建立的Tg2576小鼠, 通过外源启动子过表达含有双重瑞典突变(K670N和M671L)的人源APP695。APP/PS1小鼠过表达APP(K670N, M671L)和早老素-1(presenilin-1, PS1) (M146L), 是由Tg2576小鼠和表达突变型PS1 (M146L)基因的小鼠杂交的后代<sup>[55]</sup>。2006年Oakley等通过小鼠胚胎原核显微注射建立了5xFAD小鼠<sup>[56]</sup>, 包含APP双重瑞典突变(K670N/M671L)、佛罗里达突变(I716V)、伦敦突变(V717I)和PS1突变(M146L+L286V)5个家族性AD (familial Alzheimer disease, FAD)相关突变。上述模型中涉及的传统转基因方法依赖于胚胎干细胞, 既耗时又昂贵。CRISPR/Cas介导的基因组编辑可以高效地同时产生多个基因的突变, 更便宜, 更快, 更精确<sup>[57]</sup>。最近有研究利用CRISPR/Cas9将小鼠和大鼠APP基因中3个关键残基突变(G676R, F681Y, R684H), 以生

成内源性APP基因中携带人源化A $\beta$ 序列的小鼠和大鼠,从而避免了通过外源基因的异位表达来过表达人源APP基因时对插入位点或其附近的基因的影响<sup>[58]</sup>。也有很多研究希望使用CRISPR/Cas9编辑大型动物的基因以模拟人类基因突变,从而建立大型神经退行性疾病动物模型,如猪、猕猴等<sup>[59-61]</sup>。

诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSC)具有类似于胚胎干细胞的全能性,又无道德伦理争议,自被提出以来就在构建疾病模型方面显示出极大的优势<sup>[62]</sup>。很多研究是利用患者来源的iPSC细胞建立AD模型<sup>[63]</sup>,2016年Paquet等<sup>[64]</sup>利用CRISPR/Cas9在正常人来源的hiPSC中高效导入特异性纯合或杂合突变,从而构建杂合/纯合APP<sup>Swe</sup>和PSEN1<sup>M146V</sup>突变的iPSC衍生的皮层神经元AD模型。这使得建模时间缩短,并且不受患者细胞的可用性和可变遗传背景的限制<sup>[65]</sup>。

2.致病机制研究:目前对于AD发病原因的认识仍然有限。随着CRISPR/Cas9技术的发展,基因编辑得以越来越精确地实现,能够很好地降低非目标效应产生,从而有利于特定基因的细胞功能及相关信号通路的研究。

FAD已被证明与编码淀粉样蛋白 $\beta$ 前体蛋白(amyloid-beta precursor protein, APP)、早老素1(presenilin 1, PSEN1)和早老素2(presenilin 2, PSEN2)的基因突变有关<sup>[66]</sup>。然而大多数AD病例为散发性AD(sporadic Alzheimer disease, SAD)。最近的全基因组关联研究显示,SAD的风险在一定程度上也是由基因驱动的<sup>[67]</sup>。SAD最强的遗传危险因素是APOE  $\epsilon$  4,是载脂蛋白E(apolipoprotein E, APOE)的4个等位基因之一<sup>[68]</sup>。有研究利用CRISPR/Cas9构建了APOE敲除的SK-N-SH人神经母细胞瘤细胞AD模型,以进一步研究APOE的内源性功能。有研究通过CRISPR/Cas9技术建立风险基因敲除的hiPSC细胞系,并证实了AD风险基因SORL1/SORLA在调节APP加工过程中的重要性,并提示了它可能在调节核内体网络功能中发挥更广泛的作用<sup>[69]</sup>。髓样细胞触发受体2(TREM2)基因也是AD风险基因,主要在小胶质细胞和星形胶质细胞的细胞膜上表达,其突变可提高AD的发病风险<sup>[70]</sup>。为研究TREM-2-Y38C变异体及TREM-2缺陷对神经元功能的影响,有研究利用CRISPR/Cas9技术建立了TREM-2<sup>Y38C/Y38C</sup>和TREM-2<sup>-/-</sup>小鼠,发现在无病理触发的情况下,小鼠小胶质细胞形态改变,突触蛋白丢失而且海马突触可塑性降低,从体内途径证明

了TREM-2会影响神经元的功能<sup>[71]</sup>。细胞朊蛋白(cellular prion protein, PrP<sup>C</sup>)的分子功能及其在AD中的神经毒性作用机制目前尚不完全清楚。有研究利用CRISPR/Cas9技术建立PrP基因敲除的小鼠乳腺NMuMG细胞克隆,然后进行了定量蛋白质组学研究<sup>[72]</sup>。

3.基因治疗潜力:虽然AD致病机制还未完全被揭示,但其典型的病理学表现为A $\beta$ 肽的沉积和神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFT)的存在,而可溶性A $\beta$ 低聚物相对于纤维状A $\beta$ 更具显著神经毒性等理论是已被大家广为接受的<sup>[73]</sup>,由此为通过基因编辑改善A $\beta$ 相关表型,从而治疗或缓解AD提供了依据。Duan等<sup>[74]</sup>利用可跨越血脑屏障的AAV-PHP.eB作为载体<sup>[75]</sup>,通过静脉注射后向5XFAD和APP/PS1转基因小鼠大脑递送CRISPR-Cas9系统,实现了在体内选择性地有效地编辑人APP<sup>Swe</sup>等位基因,不仅减轻了转基因小鼠模型中A $\beta$ 相关的病理、小胶质细胞增生和神经突营养不良,而且改善了小鼠的认知功能。Bace1编码 $\beta$ 分泌酶1,是生产A $\beta$ 肽段所必需的。Park等<sup>[76]</sup>利用两亲R7L10纳米颗粒作为载体,直接注射至APP<sup>NL-G-F/NL-G-F</sup>和5XFAD转基因小鼠海马CA3区递送CRISPR-Cas9系统靶向Bace1,降低了Bace1表达,并在一定程度上改善了AD小鼠模型的认知缺陷。

也有研究希望通过CRISPR-Cas9介导保护性碱基突变或基因激活以实现AD的预防或治疗。2012年Jonsson等<sup>[77]</sup>在对1795名冰岛人的全基因组序列数据研究中发现了APP基因的一个编码突变(A673T)。这一突变可减少APP的BACE1裂解,赋予AD保护作用。Guyon等<sup>[78]</sup>通过CRISPR/Cas9修饰了HEK293T细胞和SH-SY5Y神经母细胞瘤中的APP基因,实现了A673T突变,并使得A $\beta$ <sub>40</sub>及A $\beta$ <sub>42</sub>肽表达下降。解整合素金属蛋白酶10(A disintegrin and metalloprotease 10, ADAM10)是 $\alpha$ 分泌酶家族的成员,而 $\alpha$ 分泌酶与生成A $\beta$ 的 $\beta$ 分泌酶途径是相互排斥的。因此ADAM10 $\alpha$ 分泌酶活性的上调可能会使得A $\beta$ 积累减少并上调海马体中的神经发生<sup>[79]</sup>。Park等<sup>[80]</sup>利用两亲R7L10纳米颗粒作为载体递送CRISPR/Cas9激活剂系统,直接注射至5x3FAD转基因AD小鼠的海马区,观察到Adam10水平显著增加,缓解了A $\beta$ 斑块沉积并改善了认知缺陷,且不诱发双链断裂DNA损伤。

综上所述,CRISPR/Cas9基因编辑技术具有周期短、成本低廉、高效且可扩展等优点,在基础研究

中表现出了强大的动力,在临床治疗中也显示出巨大的潜力。尽管现已有很多成果显示出其在AD研究及治疗中的作用,但仍有许多问题待解决。最突出的问题在于需开发一种安全、靶向性强、高编辑效率及低免疫原性的递送载体。对于CRISPR/Cas9基因编辑技术的脱靶效应,以及人类对Cas9有预先存在的体液和细胞介导的适应性免疫反应等问题也不容忽视。此外,基因编辑技术的应用应该遵循道德、伦理与法律的约束。

**利益冲突** 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

**作者贡献声明** 论文构思设计为何静、王蓉,资料收集和论文撰写为何静,论文修订、审校为王蓉

### 参 考 文 献

- [ 1 ] World Health Organization. Mortality database [ DB/OL ]. (2020) [ 2022-01-30 ]. [http://www.who.int/healthinfo/mortality\\_data/en/index.html](http://www.who.int/healthinfo/mortality_data/en/index.html).
- [ 2 ] Global status report on the public health response to dementia [ M ]. Geneva: World Health Organization, 2021.
- [ 3 ] GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 [ J ]. *Lancet*, 2020, 396(10258): 1204-1222. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30925-9.
- [ 4 ] 国家统计局,国务院第七次全国人口普查领导小组办公室.第七次全国人口普查公报(第五号)——人口年龄构成情况 [ J ]. *中国统计*, 2021(5): 10-11.
- [ 5 ] 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 [ J ]. *Lancet Public Health*, 2020, 5(12): e661-e671. DOI: 10.1016/S2468-2667(20)30185-7.
- [ 6 ] 任汝静,殷鹏,王志会,等.中国阿尔茨海默病报告2021 [ J ]. *诊断学理论与实践*, 2021, 20(4): 317-337. DOI: 10.16150/j.1671-2870.2021.04.001.  
Ren RJ, Yin P, Wang ZH, et al. China Alzheimer disease report 2021 [ J ]. *Journal of Diagnostics Concepts & Practice*, 2021, 20(4): 317-337.
- [ 7 ] The Nobel Prize in Chemistry 2020 [ EB/OL ]. (2020-11-04). [ 2020-01-30 ]. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2020/summary/>.
- [ 8 ] Jansen R, Embden JD, Gastra W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes [ J ]. *Mol Microbiol*, 2002, 43(6): 1565-1575. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x.
- [ 9 ] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes [ J ]. *Science*, 2007, 315(5819): 1709-1712. DOI: 10.1126/science.1138140.
- [ 10 ] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III [ J ]. *Nature*, 2011, 471(7340): 602-607. DOI: 10.1038/nature09886.
- [ 11 ] 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.
- [ 12 ] Koonin EV, Krupovic M. Evolution of adaptive immunity from transposable elements combined with innate immune systems [ J ]. *Nat Rev Genet*, 2015, 16(3): 184-192. DOI: 10.1038/nrg3859.
- [ 13 ] Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems [ J ]. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13(11): 722-736. DOI: 10.1038/nrmicro3569.
- [ 14 ] Jiang W, Bikard D, Cox D, et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems [ J ]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 233-239. DOI: 10.1038/nbt.2508.
- [ 15 ] 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.
- [ 16 ] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [ J ]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823. DOI: 10.1126/science.1231143.
- [ 17 ] Komor AC, Badran AH, Liu DR. CRISPR-Based Technologies for the Manipulation of Eukaryotic Genomes [ J ]. *Cell*, 2017, 168(1/2): 20-36. DOI: 10.1016/j.cell.2016.10.044.
- [ 18 ] Liu JJ, Orlova N, Oakes BL, et al. CasX enzymes comprise a distinct family of RNA-guided genome editors [ J ]. *Nature*, 2019, 566(7743): 218-223. DOI: 10.1038/s41586-019-0908-x.
- [ 19 ] Hu JH, Miller SM, Geurts MH, et al. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity [ J ]. *Nature*, 2018, 556(7699): 57-63. DOI: 10.1038/nature26155.
- [ 20 ] Yao X, Wang X, Hu X, et al. Homology-mediated end joining-based targeted integration using CRISPR/Cas9 [ J ]. *Cell Res*, 2017, 27(6): 801-814. DOI: 10.1038/cr.2017.76.
- [ 21 ] Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA [ J ]. *Nature*, 2019, 576(7785): 149-157. DOI: 10.1038/s41586-019-1711-4.
- [ 22 ] Anzalone AV, Gao XD, Podracky CJ, et al. Programmable deletion, replacement, integration and inversion of large DNA sequences with twin prime editing [ J ]. *Nat Biotechnol*, 2021. DOI: 10.1038/s41587-021-01133-w.
- [ 23 ] Nuñez JK, Chen J, Pommier GC, et al. Genome-wide programmable transcriptional memory by CRISPR-based epigenome editing [ J ]. *Cell*, 2021, 184(9): 2503-2519, e17. DOI: 10.1016/j.cell.2021.03.025.
- [ 24 ] Cheng AW, Wang H, Yang H, et al. Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system [ J ]. *Cell Res*, 2013, 23(10): 1163-1171. DOI: 10.1038/cr.2013.122.
- [ 25 ] Hilton IB, D'Ippolito AM, Vockley CM, et al. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers [ J ]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(5): 510-517. DOI: 10.1038/NBT.3199.
- [ 26 ] Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system [ J ]. *Nat Protoc*, 2013, 8(11): 2281-2308. DOI: 10.1038/nprot.2013.143.
- [ 27 ] Cong L, Zhang F. Genome engineering using CRISPR-Cas9 system [ J ]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1239: 197-217. DOI: 10.1007/978-1-4939-1862-1\_10.
- [ 28 ] Zhao H, Li Y, He L, et al. In Vivo AAV-CRISPR/Cas9-

- Mediated Gene Editing Ameliorates Atherosclerosis in Familial Hypercholesterolemia [ J ]. *Circulation*, 2020, 141(1): 67-79. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.042476.
- [ 29 ] 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.
- [ 30 ] Men K, Duan X, He Z, et al. CRISPR/Cas9-mediated correction of human genetic disease [ J ]. *Sci China Life Sci*, 2017, 60(5): 447-457. DOI: 10.1007/s11427-017-9032-4.
- [ 31 ] Liang X, Potter J, Kumar S, et al. Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection [ J ]. *J Biotechnol*, 2015, 208: 44-53. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2015.04.024.
- [ 32 ] Doudna JA. The promise and challenge of therapeutic genome editing [ J ]. *Nature*, 2020, 578(7794): 229-236. DOI: 10.1038/s41586-020-1978-5.
- [ 33 ] Mendell JR, Al-Zaidy S, Shell R, et al. Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy [ J ]. *N Engl J Med*, 2017, 377(18): 1713-1722. DOI: 10.1056/NEJMoa1706198.
- [ 34 ] Mendell JR, Al-Zaidy SA, Rodino-Klapac LR, et al. Current Clinical Applications of In Vivo Gene Therapy with AAVs [ J ]. *Mol Ther*, 2021, 29(2): 464-488. DOI: 10.1016/j.ymthe.2020.12.007.
- [ 35 ] Shirley JL, de Jong YP, Terhorst C, et al. Immune Responses to Viral Gene Therapy Vectors [ J ]. *Mol Ther*, 2020, 28(3): 709-722. DOI: 10.1016/j.ymthe.2020.01.001.
- [ 36 ] Daya S, Berns KI. Gene therapy using adeno-associated virus vectors [ J ]. *Clin Microbiol Rev*, 2008, 21(4): 583-593. DOI: 10.1128/CMR.00008-08.
- [ 37 ] Tervo DG, Hwang BY, Viswanathan S, et al. A Designer AAV Variant Permits Efficient Retrograde Access to Projection Neurons [ J ]. *Neuron*, 2016, 92(2): 372-382. DOI: 10.1016/j.neuron.2016.09.021.
- [ 38 ] Kim E, Koo T, Park SW, et al. In vivo genome editing with a small Cas9 orthologue derived from *Campylobacter jejuni* [ J ]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14500. DOI: 10.1038/ncomms14500.
- [ 39 ] Nelson CE, Wu Y, Gemberling MP, et al. Long-term evaluation of AAV-CRISPR genome editing for Duchenne muscular dystrophy [ J ]. *Nat Med*, 2019, 25(3): 427-432. DOI: 10.1038/s41591-019-0344-3.
- [ 40 ] Charlesworth CT, Deshpande PS, Dever DP, et al. Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans [ J ]. *Nat Med*, 2019, 25(2): 249-254. DOI: 10.1038/s41591-018-0326-x.
- [ 41 ] Li A, Lee CM, Hurley AE, et al. A Self-Deleting AAV-CRISPR System for In Vivo Genome Editing [ J ]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2018, 12: 111-122. DOI: 10.1016/j.omtm.2018.11.009.
- [ 42 ] Ling S, Yang S, Hu X, et al. Lentiviral delivery of co-packaged Cas9 mRNA and a Vegfa-targeting guide RNA prevents wet age-related macular degeneration in mice [ J ]. *Nat Biomed Eng*, 2021, 5(2): 144-156. DOI: 10.1038/s41551-020-00656-y.
- [ 43 ] Hensley SE, Amalfitano A. Toll-like receptors impact on safety and efficacy of gene transfer vectors [ J ]. *Mol Ther*, 2007, 15(8): 1417-1422. DOI: 10.1038/sj.mt.6300217.
- [ 44 ] Tanifum EA, Dasgupta I, Srivastava M, et al. Intravenous delivery of targeted liposomes to amyloid- $\beta$  pathology in APP/PSEN1 transgenic mice [ J ]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e48515. DOI: 10.1371/journal.pone.0048515.
- [ 45 ] Lee K, Conboy M, Park HM, et al. Nanoparticle delivery of Cas9 ribonucleoprotein and donor DNA in vivo induces homology-directed DNA repair [ J ]. *Nat Biomed Eng*, 2017, 1: 889-901. DOI: 10.1038/s41551-017-0137-2.
- [ 46 ] Kardani K, Milani A, H Shabani S, et al. Cell penetrating peptides: the potent multi-cargo intracellular carriers [ J ]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2019, 16(11): 1227-1258. DOI: 10.1080/17425247.2019.1676720.
- [ 47 ] Sun W, Ji W, Hall JM, et al. Self-assembled DNA nanoclews for the efficient delivery of CRISPR-Cas9 for genome editing [ J ]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015, 54(41): 12029-12033. DOI: 10.1002/anie.201506030.
- [ 48 ] Giau VV, Lee H, Shim KH, et al. Genome-editing applications of CRISPR-Cas9 to promote in vitro studies of Alzheimer's disease [ J ]. *Clin Interv Aging*, 2018, 13: 221-233. DOI: 10.2147/CIA.S155145.
- [ 49 ] Karthick C, Nithyanandan S, Essa MM, et al. Time-dependent effect of oligomeric amyloid- $\beta$  (1-42)-induced hippocampal neurodegeneration in rat model of Alzheimer's disease [ J ]. *Neurol Res*, 2019, 41(2): 139-150. DOI: 10.1080/01616412.2018.1544745.
- [ 50 ] Yamada K, Fujii K, Nabeshima T, et al. Neurotoxicity induced by continuous infusion of quinolinic acid into the lateral ventricle in rats [ J ]. *Neurosci Lett*, 1990, 118(1): 128-131. DOI: 10.1016/0304-3940(90)90265-b.
- [ 51 ] Rahman A, Rao MS, Khan KM. Intraventricular infusion of quinolinic acid impairs spatial learning and memory in young rats: a novel mechanism of lead-induced neurotoxicity [ J ]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 263. DOI: 10.1186/s12974-018-1306-2.
- [ 52 ] Nakahara N, Iga Y, Mizobe F, et al. Effects of intracerebroventricular injection of AF64A on learning behaviors in rats [ J ]. *Jpn J Pharmacol*, 1988, 48(1): 121-130. DOI: 10.1254/jjp.48.121.
- [ 53 ] Paulo SL, Ribeiro-Rodrigues L, Rodrigues RS, et al. Sustained Hippocampal Neural Plasticity Questions the Reproducibility of an Amyloid- $\beta$ -Induced Alzheimer's Disease Model [ J ]. *J Alzheimers Dis*, 2021, 82(3): 1183-1202. DOI: 10.3233/JAD-201567.
- [ 54 ] Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, et al. Correlative memory deficits, A $\beta$  elevation, and amyloid plaques in transgenic mice [ J ]. *Science*, 1996, 274(5284): 99-102. DOI: 10.1126/science.274.5284.99.
- [ 55 ] Kurt MA, Davies DC, Kidd M, et al. Neurodegenerative changes associated with beta-amyloid deposition in the brains of mice carrying mutant amyloid precursor protein and mutant presenilin-1 transgenes [ J ]. *Exp Neurol*, 2001, 171(1): 59-71. DOI: 10.1006/exnr.2001.7717.
- [ 56 ] Oakley H, Cole SL, Logan S, et al. Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation [ J ]. *J Neurosci*, 2006, 26(40): 10129-10140. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1202-06.2006.
- [ 57 ] Wang H, Yang H, Shivalila CS, et al. One-step generation

- of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering[J]. *Cell*, 2013, 153(4): 910-918. DOI: 10.1016/j.cell.2013.04.025.
- [ 58 ] Serneels L, T'Syen D, Perez-Benito L, et al. Modeling the  $\beta$ -secretase cleavage site and humanizing amyloid-beta precursor protein in rat and mouse to study Alzheimer's disease[J]. *Mol Neurodegener*, 2020, 15(1): 60. DOI: 10.1186/s13024-020-00399-z.
- [ 59 ] Yang W, Chen X, Li S, et al. Genetically modified large animal models for investigating neurodegenerative diseases[J]. *Cell Biosci*, 2021, 11(1): 218. DOI: 10.1186/s13578-021-00729-8.
- [ 60 ] Holm IE, Alstrup AK, Luo Y. Genetically modified pig models for neurodegenerative disorders[J]. *J Pathol*, 2016, 238(2): 267-287. DOI: 10.1002/path.4654.
- [ 61 ] Oishi T, Imai H, Go Y, et al. Sporadic premature aging in a Japanese monkey: a primate model for progeria[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e111867. DOI: 10.1371/journal.pone.0111867.
- [ 62 ] Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells[J]. *Science*, 2007, 318(5858): 1917-1920. DOI: 10.1126/science.1151526.
- [ 63 ] Yagi T, Ito D, Okada Y, et al. Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells[J]. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(23): 4530-4539. DOI: 10.1093/hmg/ddr394.
- [ 64 ] Paquet D, Kwart D, Chen A, et al. Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9 [J]. *Nature*, 2016, 533(7601): 125-129. DOI: 10.1038/nature17664.
- [ 65 ] Hernández D, Rooney LA, Daniszewski M, et al. Culture Variabilities of Human iPSC-Derived Cerebral Organoids Are a Major Issue for the Modelling of Phenotypes Observed in Alzheimer's Disease[J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2022, 18(2): 718-731. DOI: 10.1007/s12015-021-10147-5.
- [ 66 ] Webster SJ, Bachstetter AD, Nelson PT, et al. Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models[J]. *Front Genet*, 2014, 5: 88. DOI: 10.3389/fgene.2014.00088.
- [ 67 ] Kunkle BW, Grenier-Boley B, Sims R, et al. Genetic meta-analysis of diagnosed Alzheimer's disease identifies new risk loci and implicates A $\beta$ , tau, immunity and lipid processing[J]. *Nat Genet*, 2019, 51(3): 414-430. DOI: 10.1038/s41588-019-0358-2.
- [ 68 ] Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, et al. Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90(20): 9649-9653. DOI: 10.1073/pnas.90.20.9649.
- [ 69 ] 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[J]. *Cell Rep*, 2020, 31(9): 107719. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.107719.
- [ 70 ] Hammond TR, Marsh SE, Stevens B. Immune Signaling in Neurodegeneration[J]. *Immunity*, 2019, 50(4): 955-974. DOI: 10.1016/j.immuni.2019.03.016.
- [ 71 ] Jadhav VS, Lin PBC, Pennington T, et al. Trem2 Y38C mutation and loss of Trem2 impairs neuronal synapses in adult mice[J]. *Mol Neurodegener*, 2020, 15(1): 62. DOI: 10.1186/s13024-020-00409-0.
- [ 72 ] Mehrabian M, Brethour D, MacIsaac S, et al. CRISPR-Cas9-based knockout of the prion protein and its effect on the proteome[J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e114594. DOI: 10.1371/journal.pone.0114594.
- [ 73 ] Reiss AB, Arain HA, Stecker MM, et al. Amyloid toxicity in Alzheimer's disease[J]. *Rev Neurosci*, 2018, 29(6): 613-627. DOI: 10.1515/revneuro-2017-0063.
- [ 74 ] Duan Y, Ye T, Qu Z, et al. Brain-wide Cas9-mediated cleavage of a gene causing familial Alzheimer's disease alleviates amyloid-related pathologies in mice[J]. *Nat Biomed Eng*, 2022, 6(2): 168-180. DOI: 10.1038/s41551-021-00759-0.
- [ 75 ] Chan KY, Jang MJ, Yoo BB, et al. Engineered AAVs for efficient noninvasive gene delivery to the central and peripheral nervous systems[J]. *Nat Neurosci*, 2017, 20(8): 1172-1179. DOI: 10.1038/nn.4593.
- [ 76 ] 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[J]. *Nat Neurosci*, 2019, 22(4): 524-528. DOI: 10.1038/s41593-019-0352-0.
- [ 77 ] Jonsson T, Atwal JK, Steinberg S, et al. A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline[J]. *Nature*, 2012, 488(7409): 96-99. DOI: 10.1038/nature11283.
- [ 78 ] Guyon A, Rousseau J, Bégin FG, et al. Base editing strategy for insertion of the A673T mutation in the APP gene to prevent the development of AD in vitro[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2021, 24: 253-263. DOI: 10.1016/j.omtn.2021.02.032.
- [ 79 ] Suh J, Choi SH, Romano DM, et al. ADAM10 missense mutations potentiate  $\beta$ -amyloid accumulation by impairing prodomain chaperone function[J]. *Neuron*, 2013, 80(2): 385-401. DOI: 10.1016/j.neuron.2013.08.035.
- [ 80 ] Park H, Hwang Y, Kim J. Transcriptional activation with Cas9 activator nanocomplexes rescues Alzheimer's disease pathology[J]. *Biomaterials*, 2021, 279: 121229. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2021.121229.

(收稿日期: 2022-02-15)

(本文编辑: 赵金鑫)