

# 中国医药工业杂志



2018-8  
第49卷·第8期

- 全国中文核心期刊
- 中国生物医学核心期刊
- 中国期刊方阵入选期刊
- 中国科技核心期刊
- 中国科学引文数据库来源期刊
- 华东地区优秀期刊

关注患者的顺应性

使用卡乐康包衣的片剂才是完美的

聪明的企业正通过口服固体制剂的外观设计来减少用药差错，并提高患者服药的顺应性。他们相信——片剂产品的外观会影响患者对药物的辨识和感受。监管部门同样深知这一点。

利用卡乐康薄膜包衣技术开发易于吞服的、独特的、品牌化的片剂可以为产品带来额外的价值。卡乐康为您打开了片剂设计的窗口，通过不同颜色、形状和薄膜包衣的组合，打造与众不同的片剂外观。联系我们，使您的片剂更完美。

从片芯到包衣  
您可信赖的供应商  
[www.colorcon.com.cn](http://www.colorcon.com.cn)





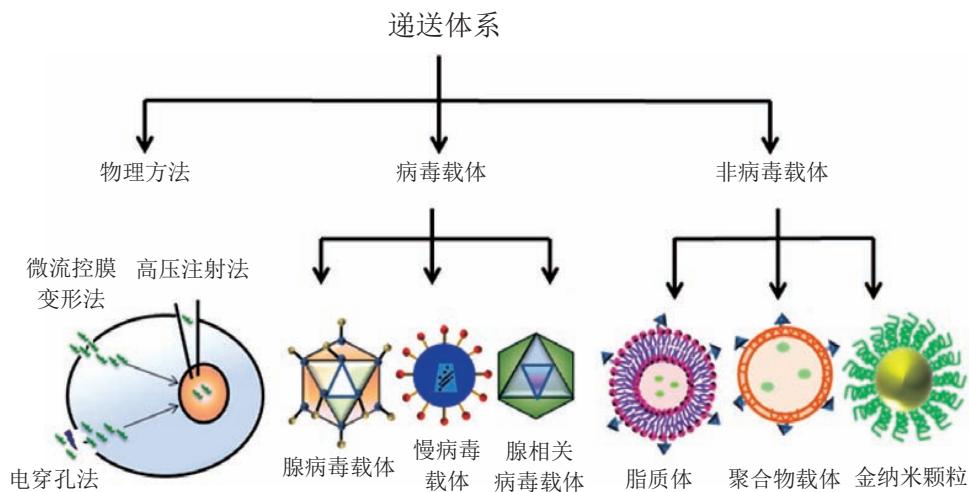
主办  
上海医药工业研究院  
中国药学会  
中国化学制药工业协会



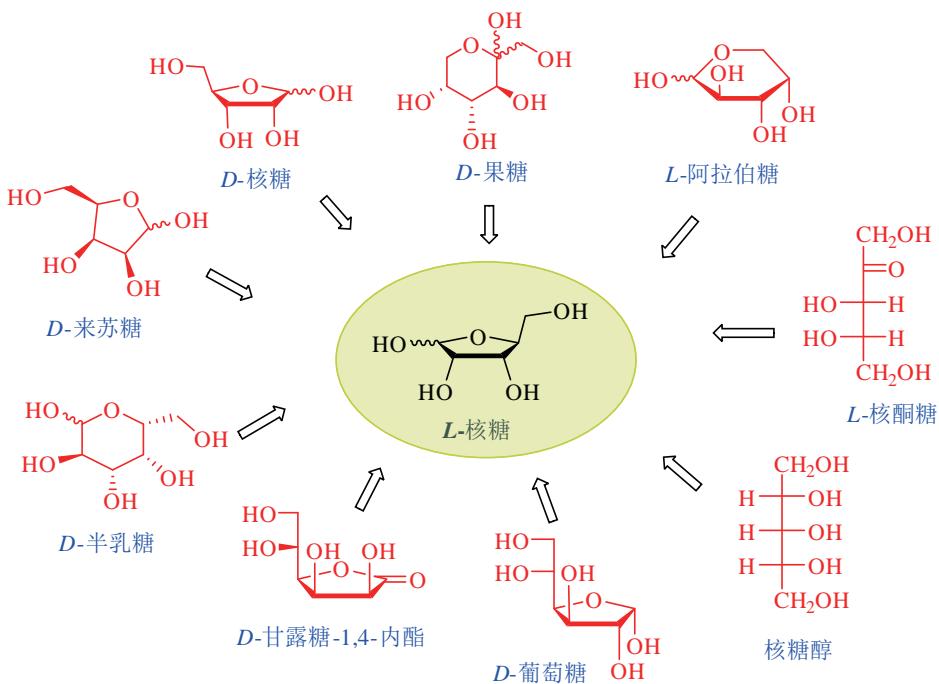
微信号 :cjph-cjph

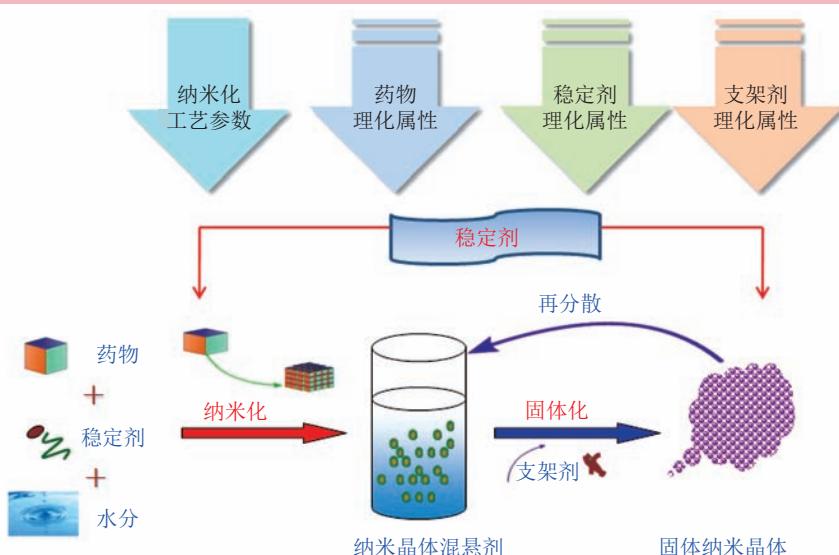
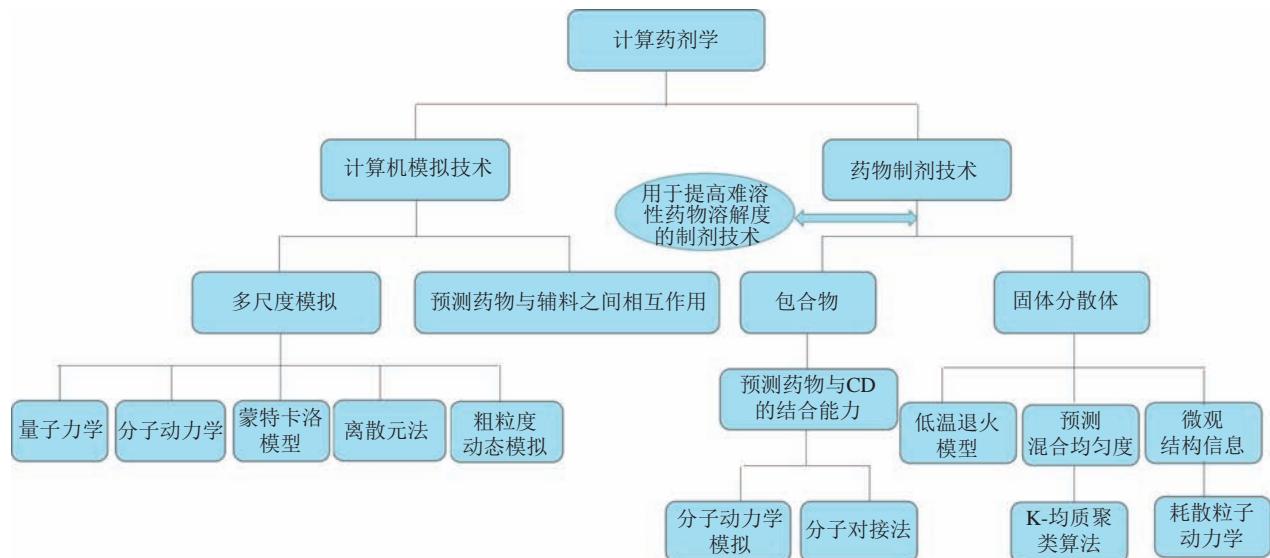
· 专论与综述 ·

- 1041 CRISPR 药物递送系统的研究现状及发展趋势.....** 沈洁, 李燕, 卢治国, 张田露, 张欣\*
- DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.08.001



- 1053 L-核糖的合成研究进展.....** 邹晔, 苏为科\*
- DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.08.002

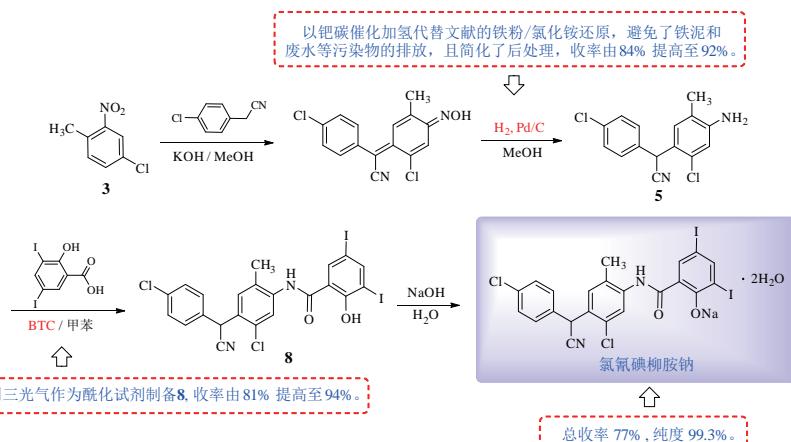




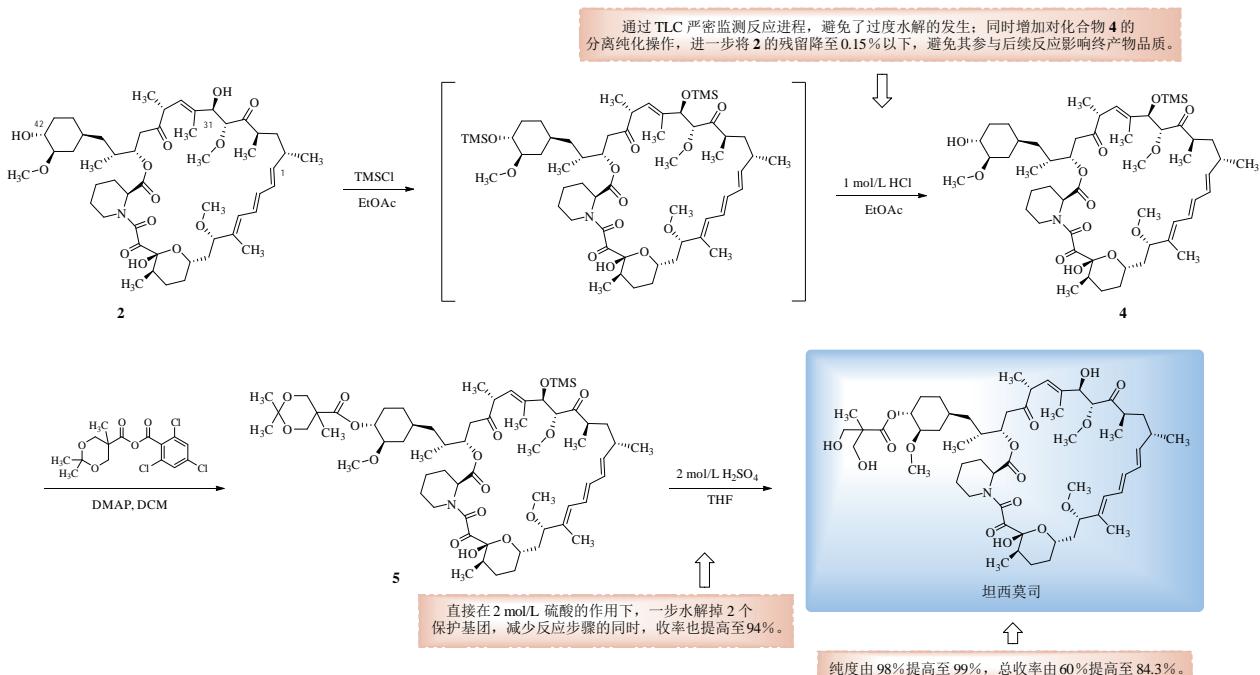
喷雾冷冻干燥(SFD)技术在吸入制剂中的应用

· 研究论文 ·

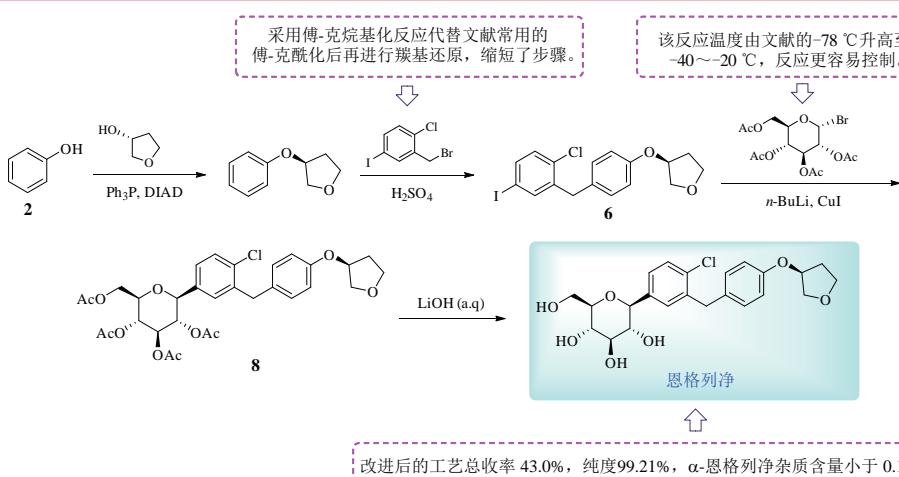
1091 氯氟碘柳胺钠的合成工艺改进.....邹晔，李林玲，陈仁尔，苏为科\*  
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.08.006



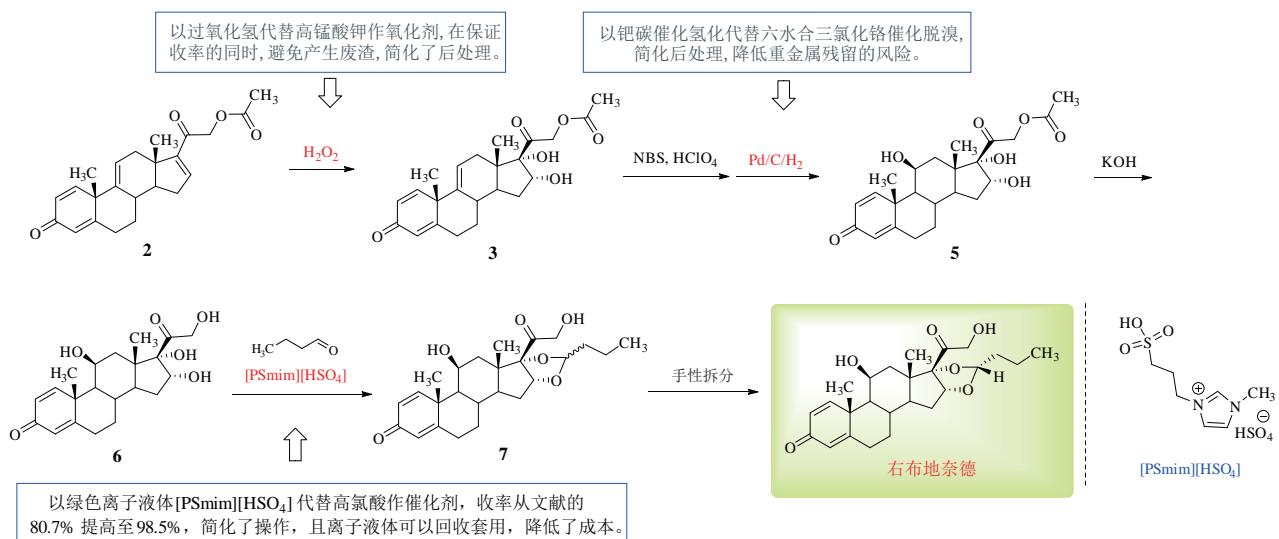
1095 坦西莫司的合成工艺优化.....白文钦，唐贞波，宋传玲，张贵民\*  
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.08.007



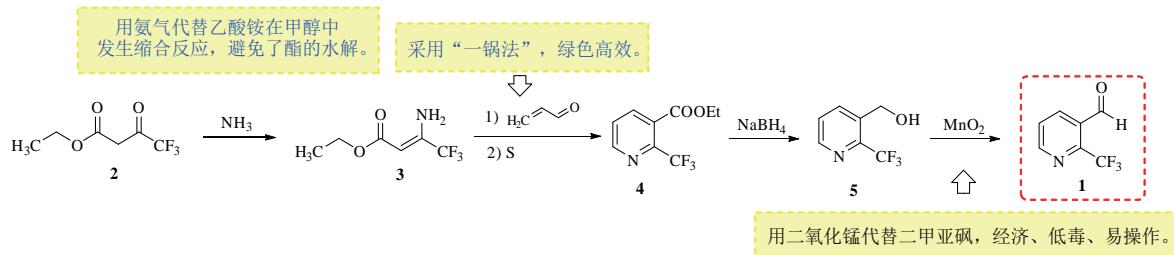
1100 恩格列净合成工艺改进.....石克金，陈林\*，李江红，任凤英，杨晨，苟小军  
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.08.008



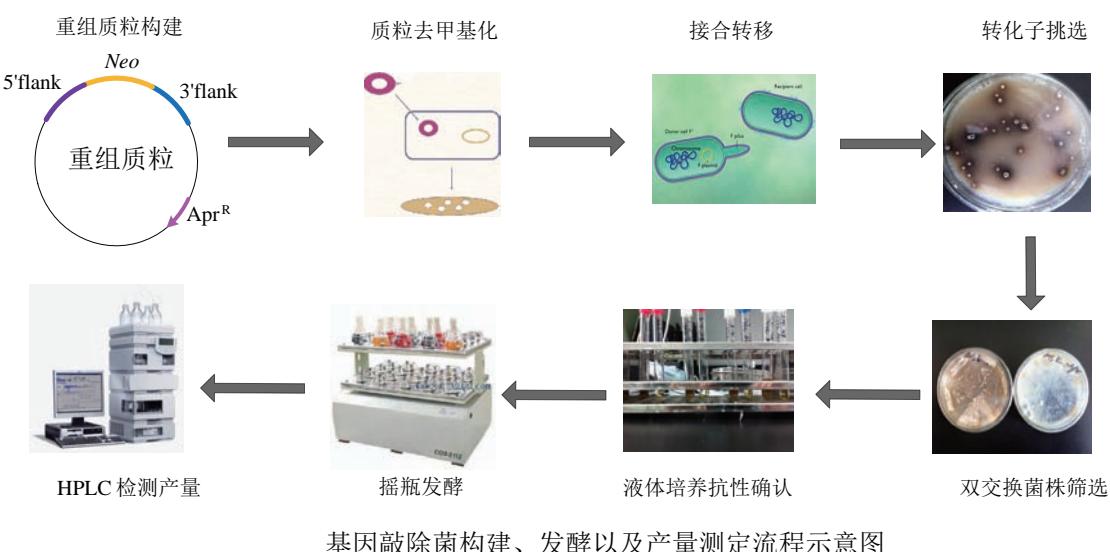
1104 右布地奈德的合成工艺改进.....邢丽华  
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.08.009



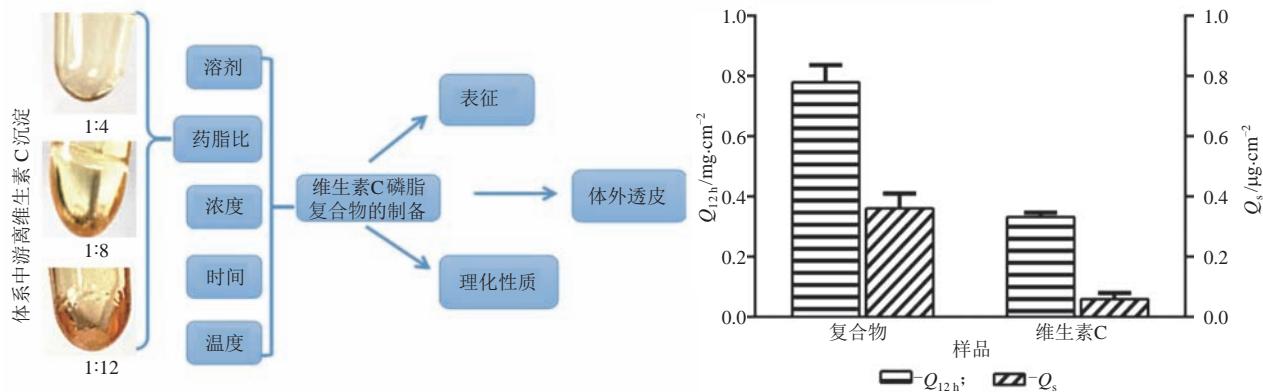
1109 2-(三氟甲基)吡啶-3-甲醛的合成.....陆杨，王萍萍，钱超\*  
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.08.010



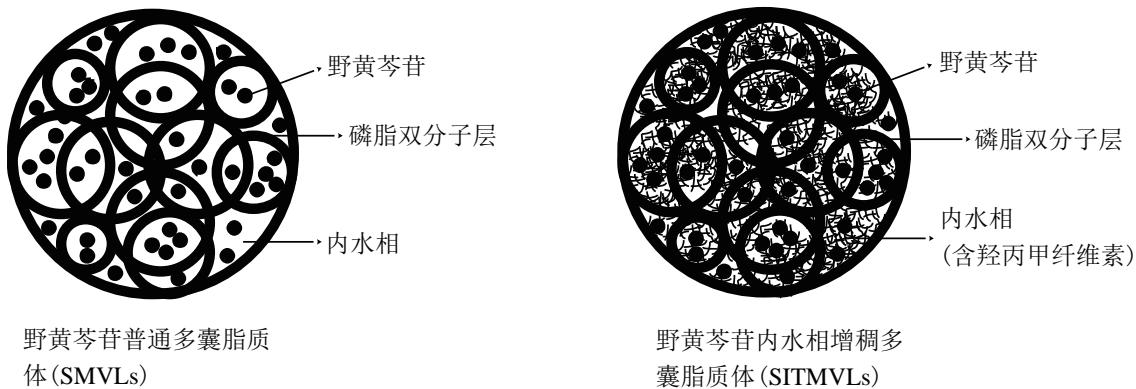
1112 阿维链霉菌转化系统的优化及其不同 PKS 敲除菌株的构建.....孟令卓，王勇，储炬\*  
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.08.011



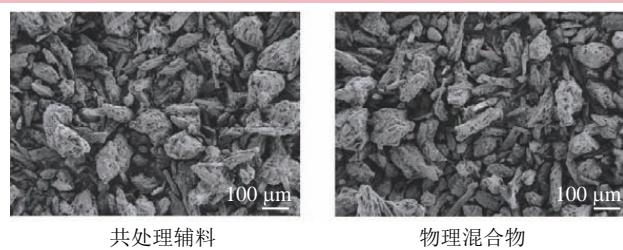
**1121 维生素 C 磷脂复合物的制备及其理化性质及透皮性能考察**.....  
.....黃 蓓, 黃传利, 张彩凤, 陆伴仪, 龙晓英\*  
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.08.012



**1129 野黄芩苷内水相增稠多囊脂质体的制备及其稳定性的初步考察**.....李海刚, 徐佳敏, 徐康  
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.08.013

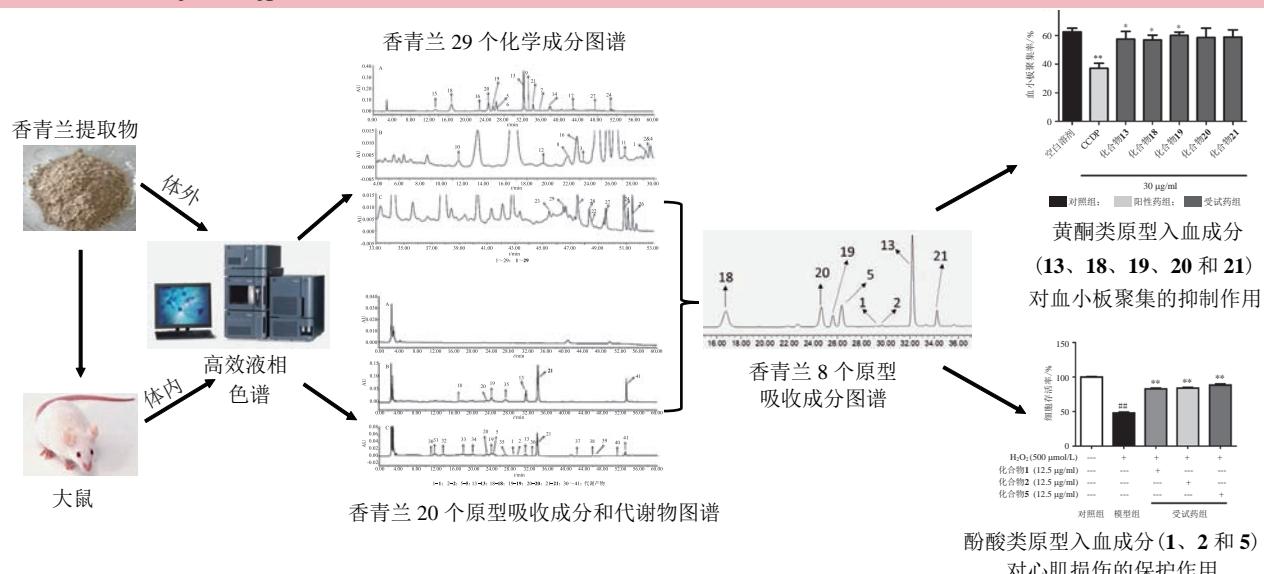


**1136 微晶纤维素共处理辅料的粉体学性质及在直接压片工艺中的应用**.....蔡杰, 顾王文, 丁亚萍\*  
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.08.014



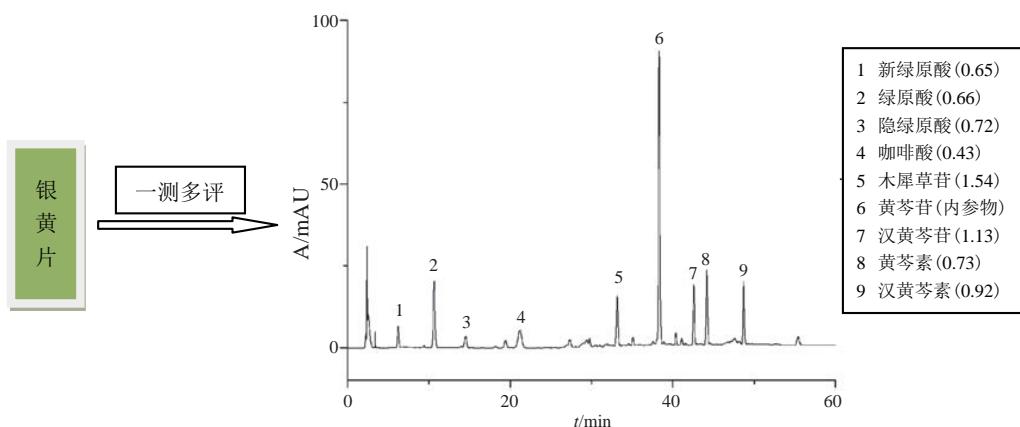
**1142 基于血清药物化学研究香青兰抗心肌缺血活性部位的活性成分.....**  
.....李志红, 颜仁杰, 邢建国, 吴 形, 刘 莉\*

DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.08.015



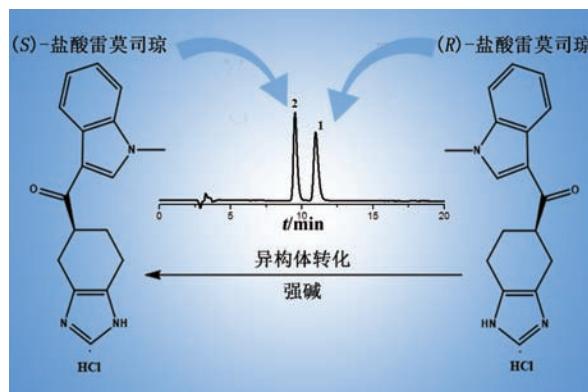
**1149 一测多评法测定银黄片中的 9 种有效成分.....**  
.....宁淑博, 王加锋, 展照双, 周明波, 辛 丹, 滕佳林\*

DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.08.016

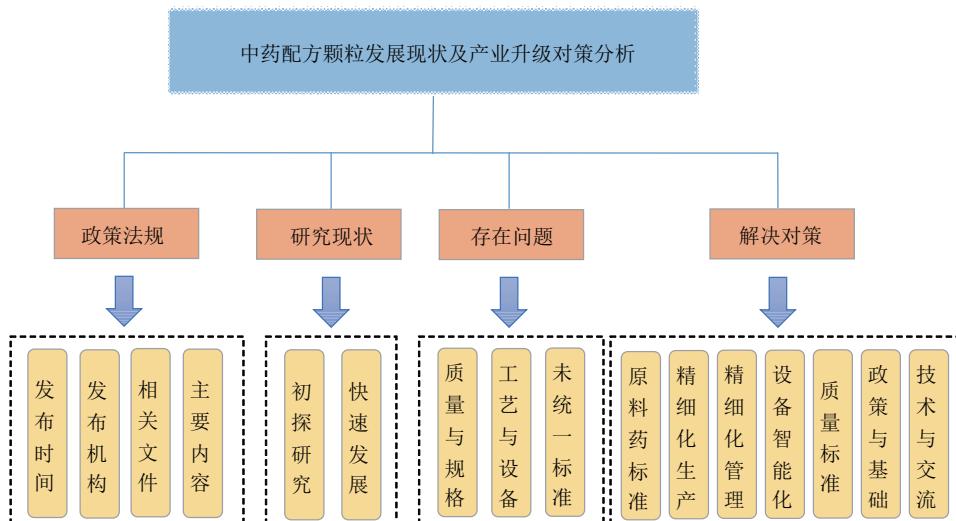


**1155 盐酸雷莫司琼的异构体杂质检测及异构体化影响因素.....**  
.....沈 晨, 夏 旭, 高文彦, 曾珊珊, 叶金翠\*

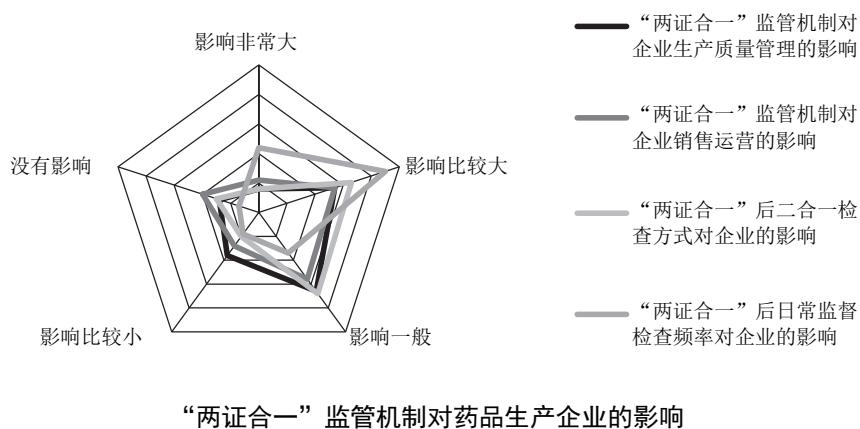
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.08.017



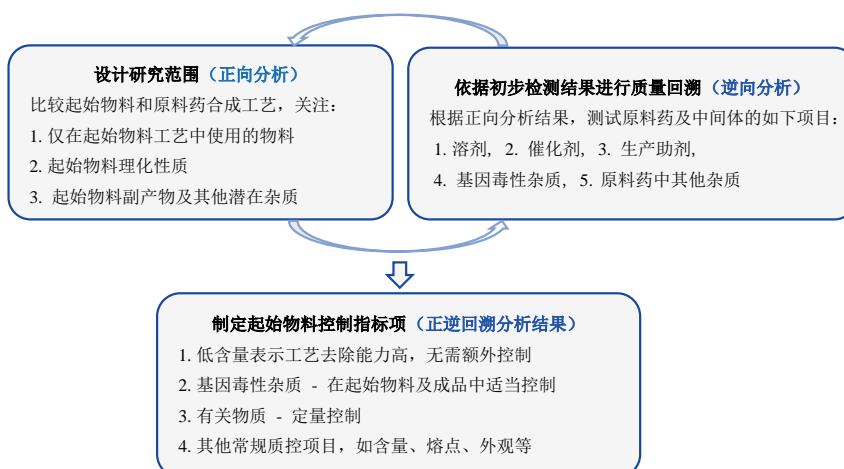
1161 中药配方颗粒发展现状及产业升级对策分析..... 林环玉, 伍振峰\*, 曾丽华, 王学成, 杨明\*  
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.08.018

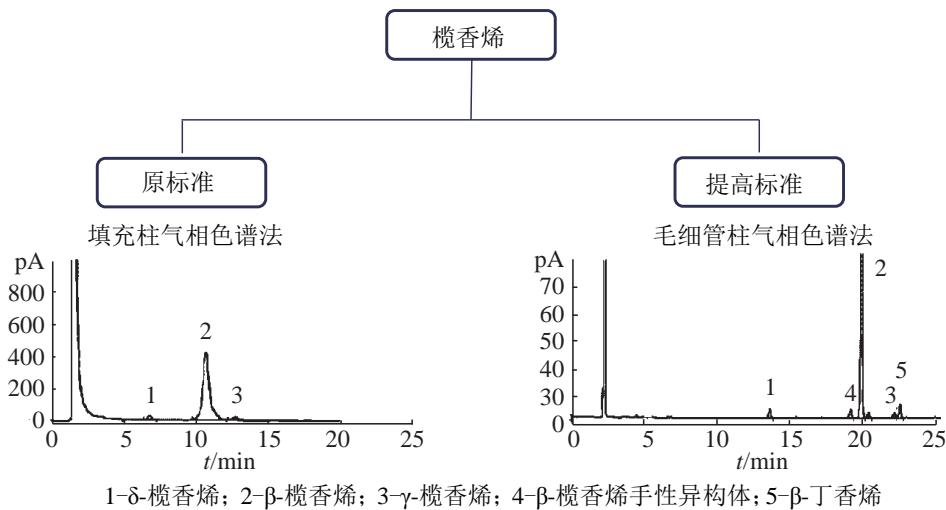
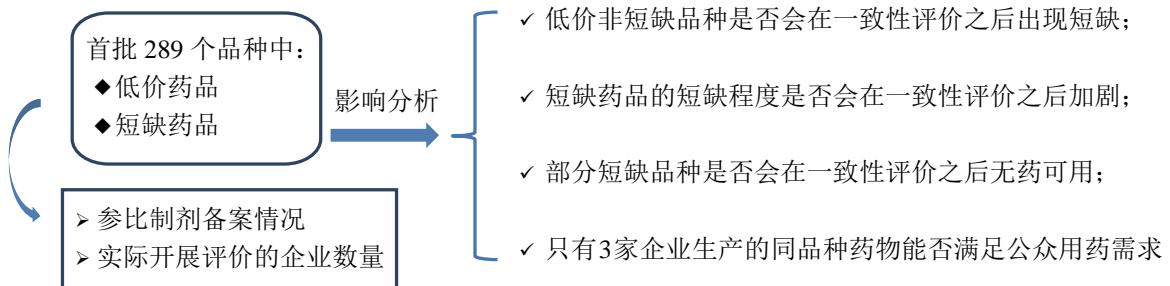


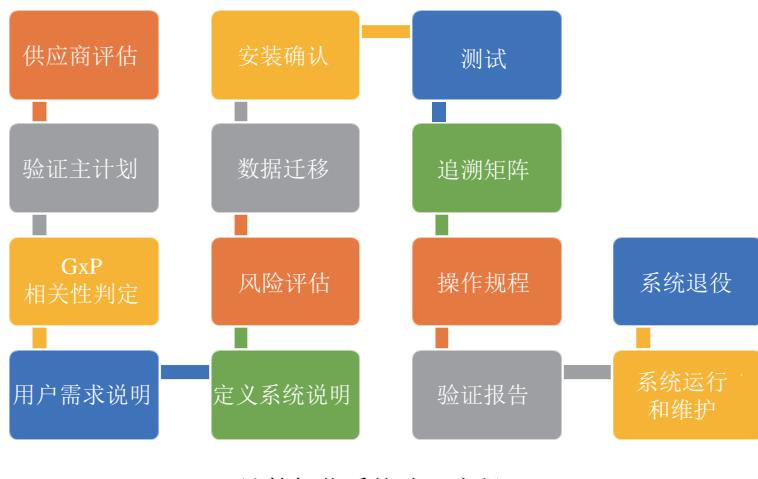
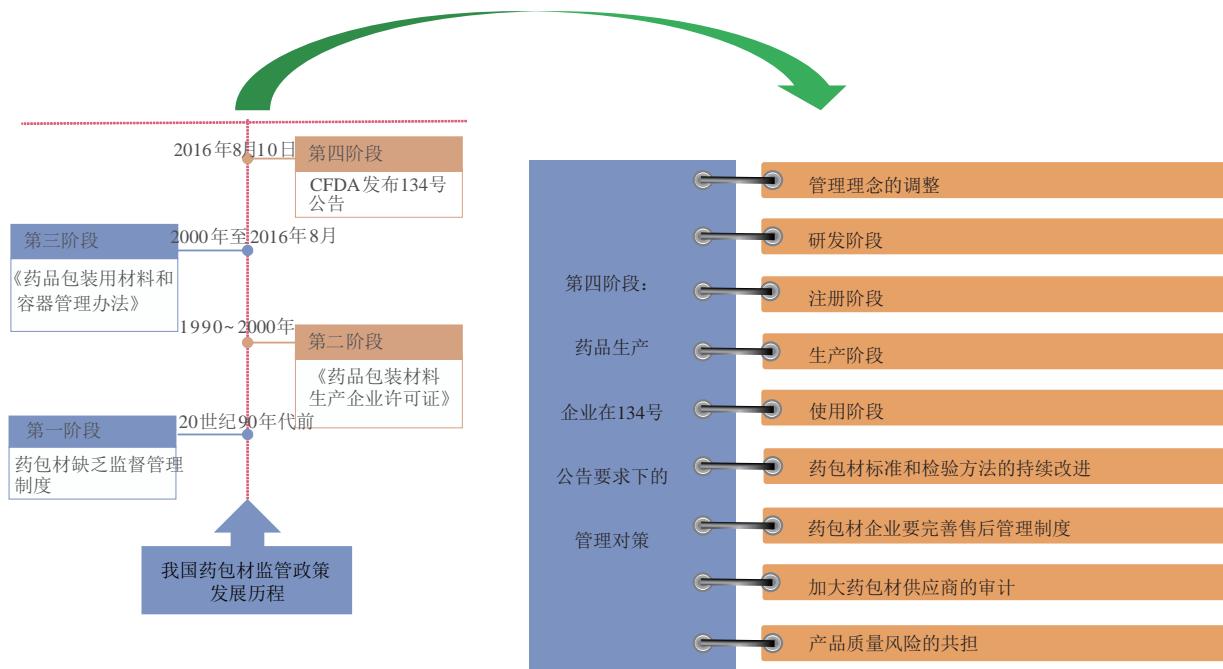
1166 浅析“两证合一”监管机制对药品生产企业的影响..... 颜孙燕, 俞佳宁, 朱佳娴\*  
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.08.019



1172 化学合成原料药申报过程中起始物料的选择与控制..... 杜爽, 梁毅\*  
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.08.020







### · 其他 ·

广告索引(1071)

制剂技术文摘 P49-34~35(1107) P49-36~37(1119) P49-38~39(1134) P49-40~41(1194)

# CONTENTS

Chinese Journal of Pharmaceuticals

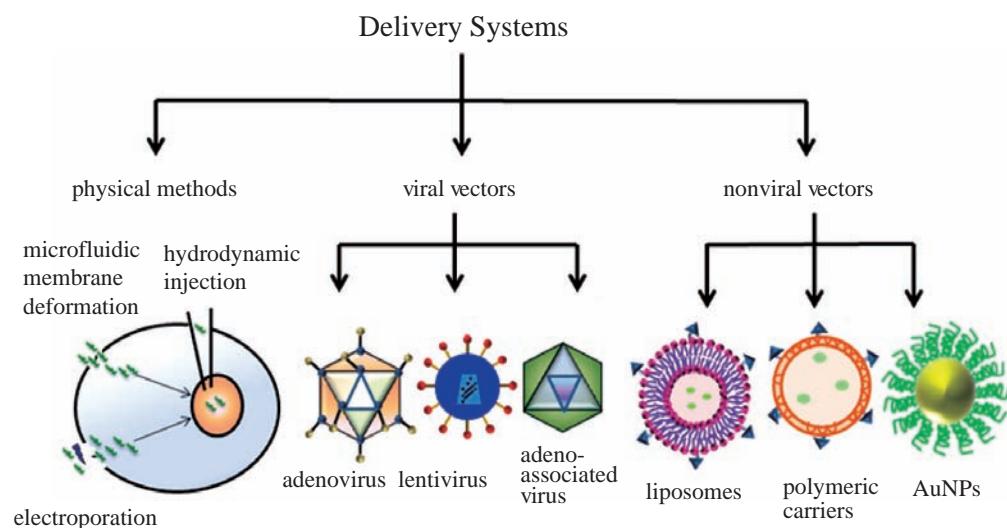
Founded in 1970, Monthly

Volume 49, Number 8

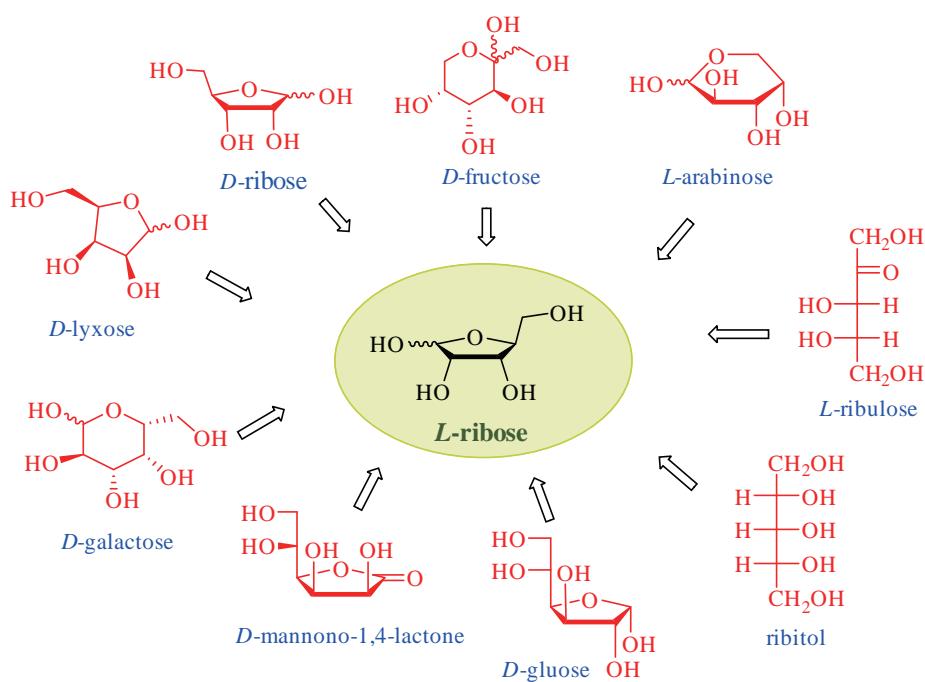
August 10, 2018

## Perspectives & Review

- 1041 Research Status and Trends of CRISPR Delivery Systems.....  
.....SHEN J, LI Y, LU Z G, ZHANG T L, ZHANG X\*  
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.08.001



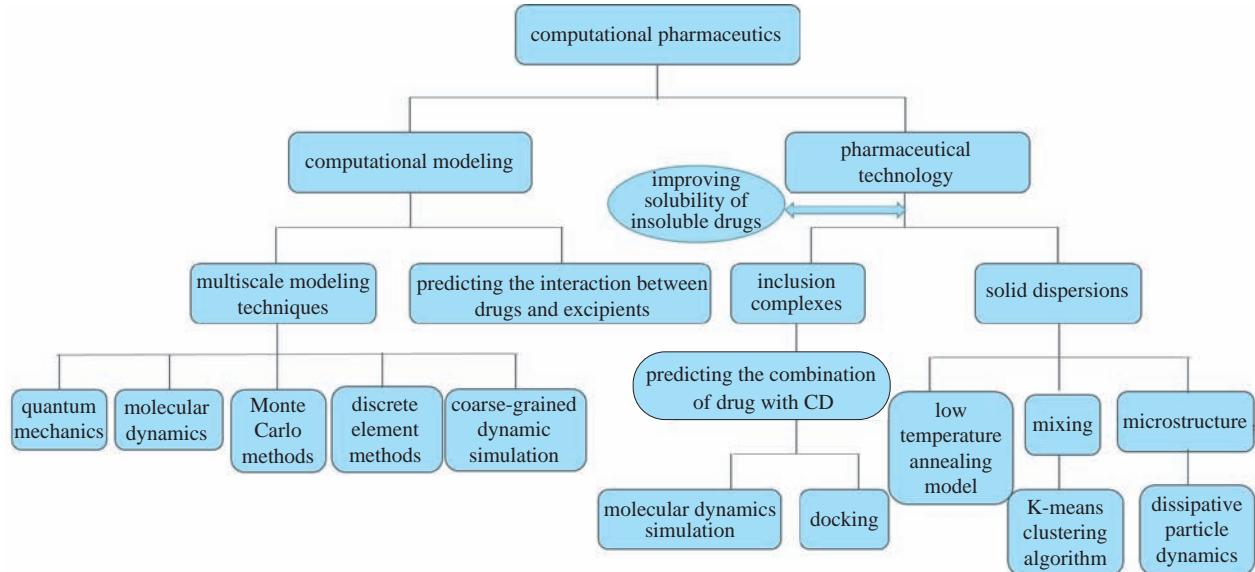
- 1053** Progress in Synthesis of *L*-Ribose.....*ZOU Y, SU W K\**  
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.08.002



**1066 Application of Computational Pharmaceutics in Improving Solubility of Insoluble Drugs**

.....WANG J X, LUAN H S\*, WANG H

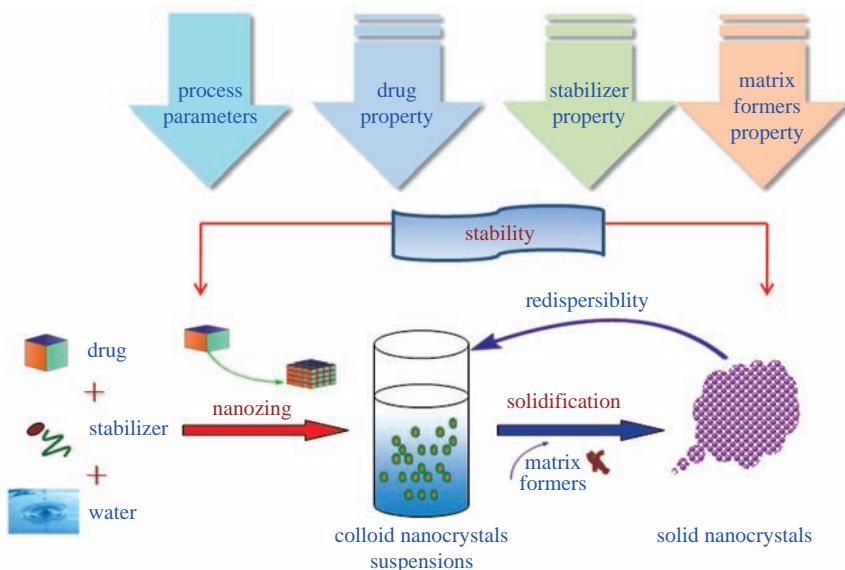
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.08.003



**1073 Research Progress of Key Factors Influencing Stability of Solid Nanocrystals**

.....LIU Y, XIE J, XU J N, YUE P F\*, YANG M\*

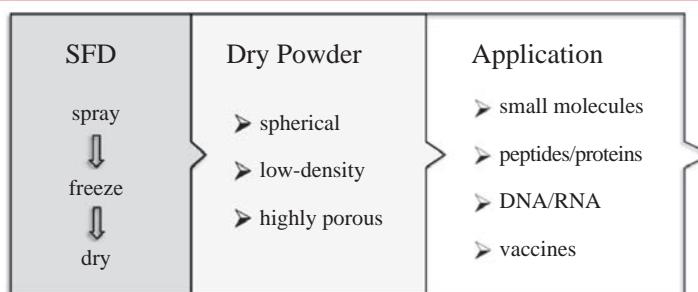
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.08.004



**1083 Spray Freeze Drying Technology and Its Application in Preparations for Inhalation**

.....WANG J, ZHU Z Z, ZHANG X H\*

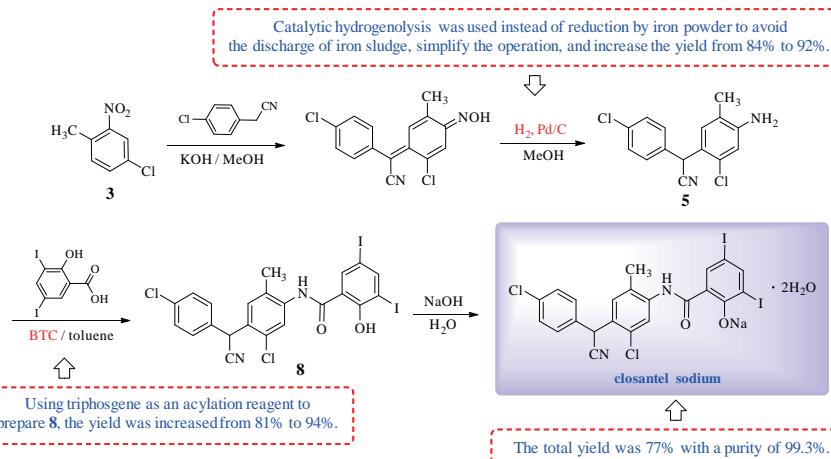
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.08.005



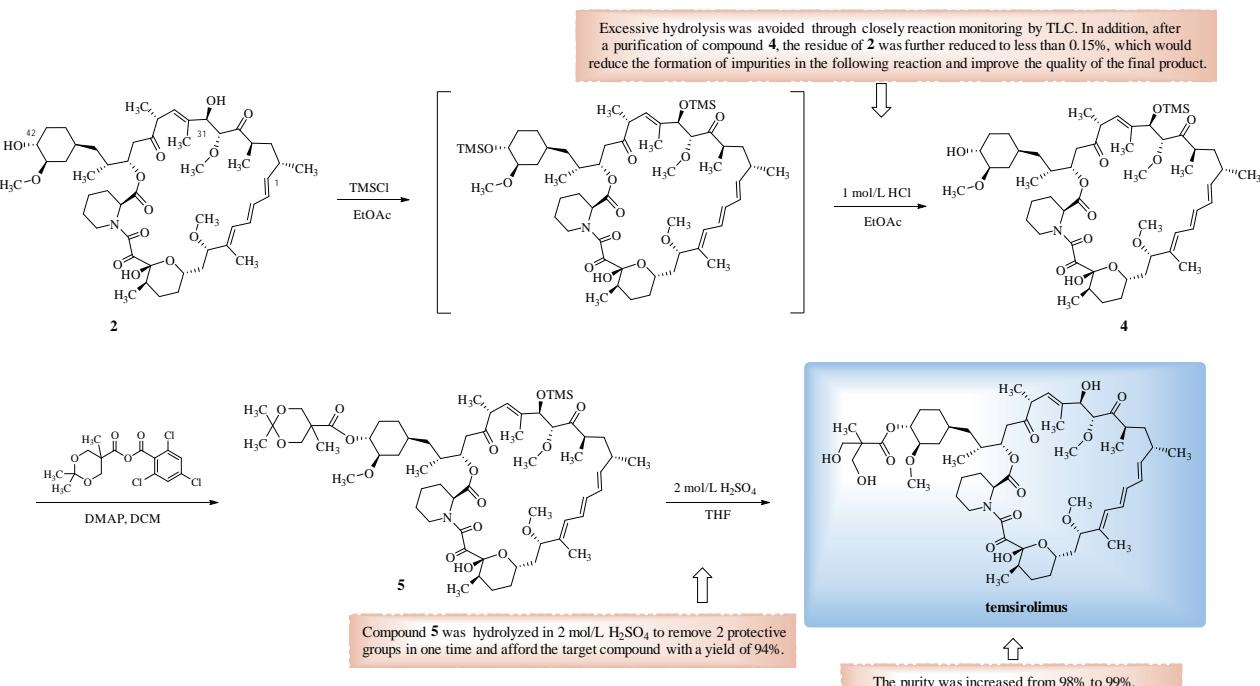
Application of Spray Freeze Drying (SFD) Technology in Inhalation Preparations

## Paper

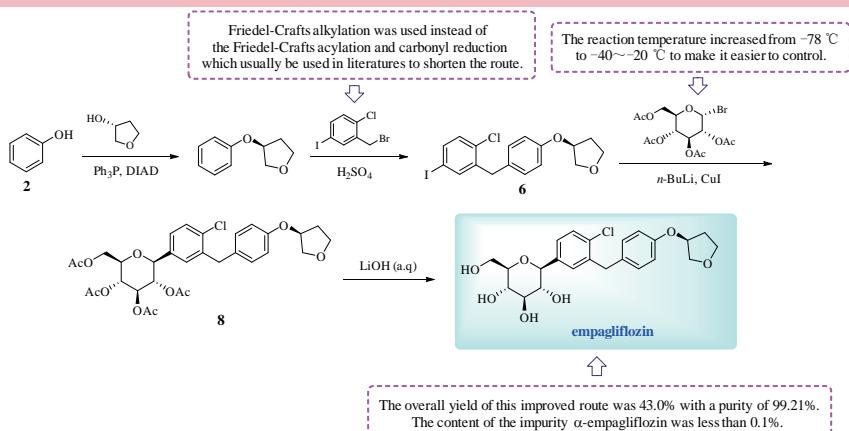
**1091 Improved Synthesis of Closantel Sodium** ..... *ZOU Y, LI L L, CHEN R E, SU W K\**  
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.08.006



**1095 Improved Synthesis of Temsirolimus** ..... *BAI W Q, TANG Z B, SONG C L, ZHANG G M\**  
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.08.007



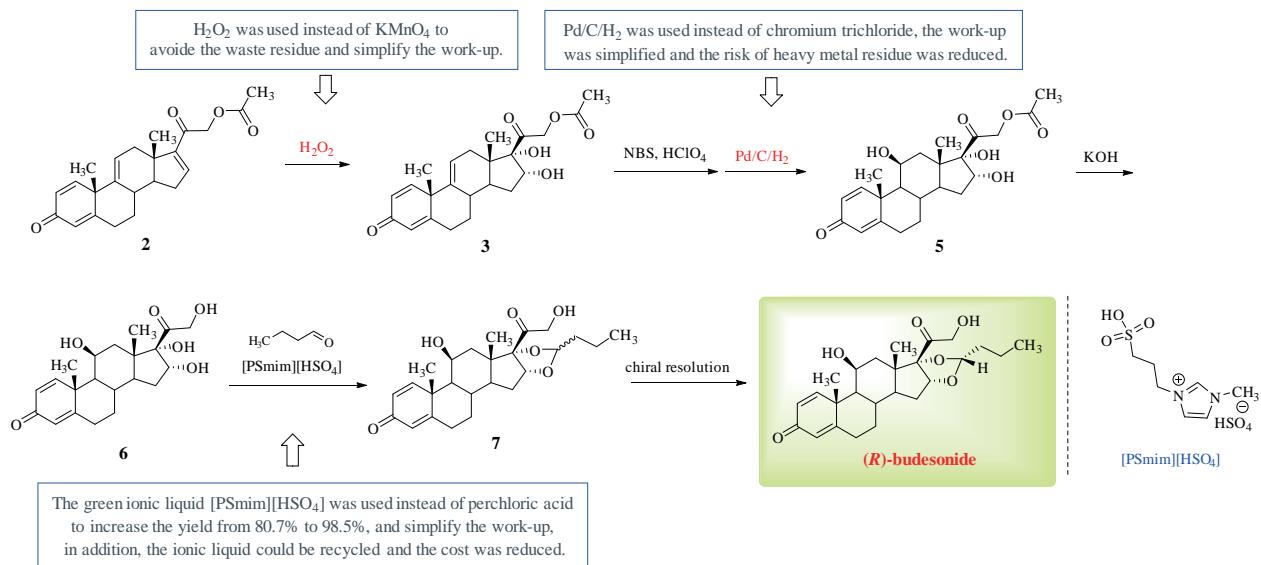
**1100 Improved Synthetic Process of Empagliflozin** ..... *SHI K J, CHEN L\*, LI J H, REN F Y, YANG C, GOU X J*  
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.08.008



**1104 Improved Synthesis of (*R*)-Budesonide**

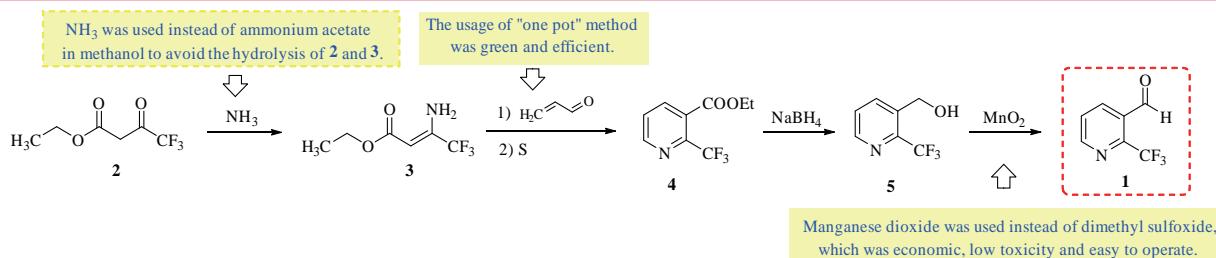
XING L H

DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.08.009



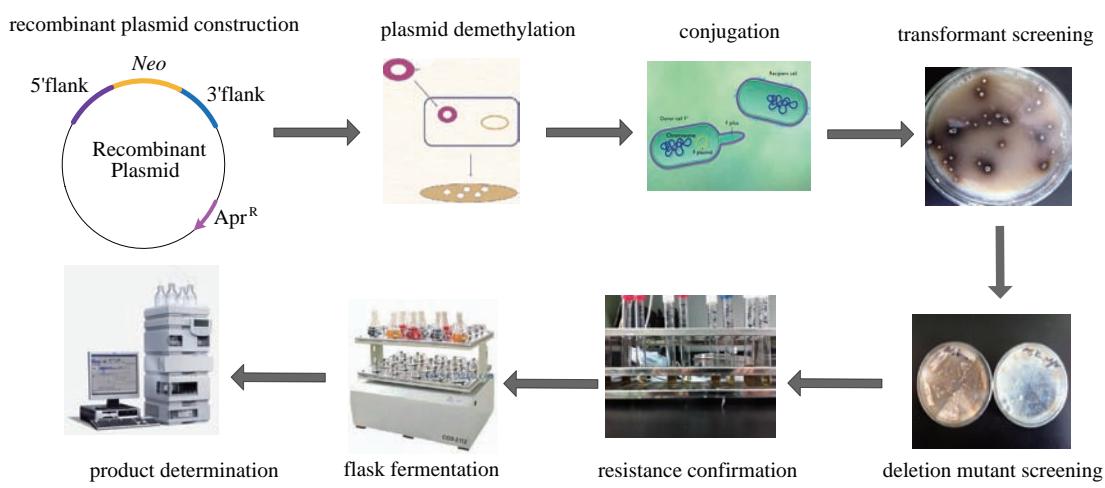
**1109 Improved Synthesis of 2-Trifluoromethylpyridine-3-carboxaldehyde** ··· LU Y, WANG P P, QIAN C\*

DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.08.010



**1112 Construction of 7 PKS-deleted Mutants for *Streptomyces avermitilis* and Improvement of Conjugational Transformation System** ··· MENG L Z, WANG Y, CHU J\*

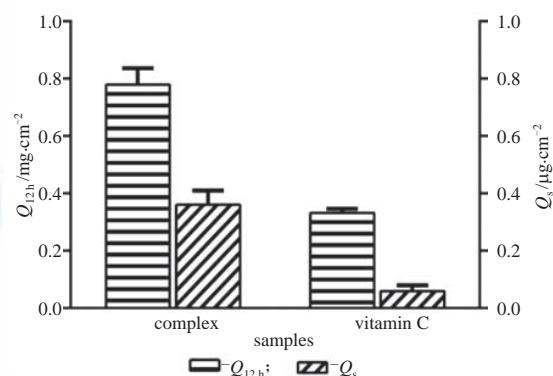
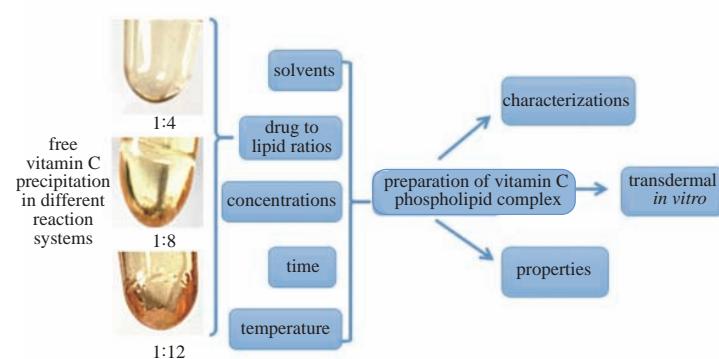
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.08.011



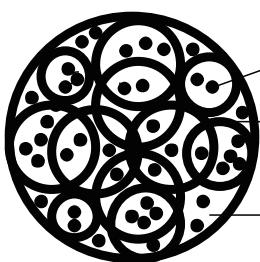
The Flow Diagram of the Deletion Mutants Construction, Fermentation and Product Determination

**1121** Preparation, Physicochemical Properties and Transdermal Performance of Vitamin C Phospholipid Complex.....*HUANG B, HUANG C L, ZHANG C F, LU B Y, LONG X Y\**

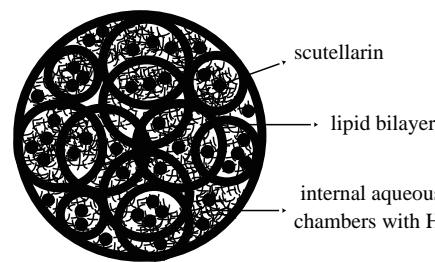
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.08.012

**1129** Preparation and Preliminary Stability of Scutellarin Internal Phase Thickened Multivesicular Liposomes.....*LI H G, XU J M, XU K*

DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.08.013



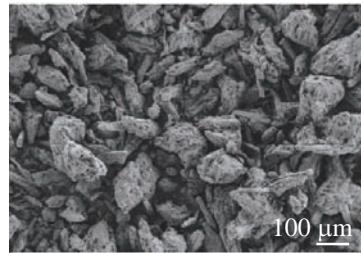
scutellarin multivesicular liposomes (SMVLs)



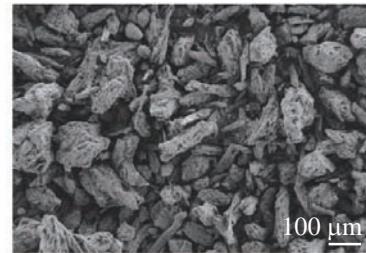
scutellarin internal phase thickened multivesicular liposomes (SITMVLs)

**1136** Properties of the Co-processed Excipient Including Microcellulose and Application in Direct Compression.....*CAI J, GU W W, DING Y P\**

DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.08.014

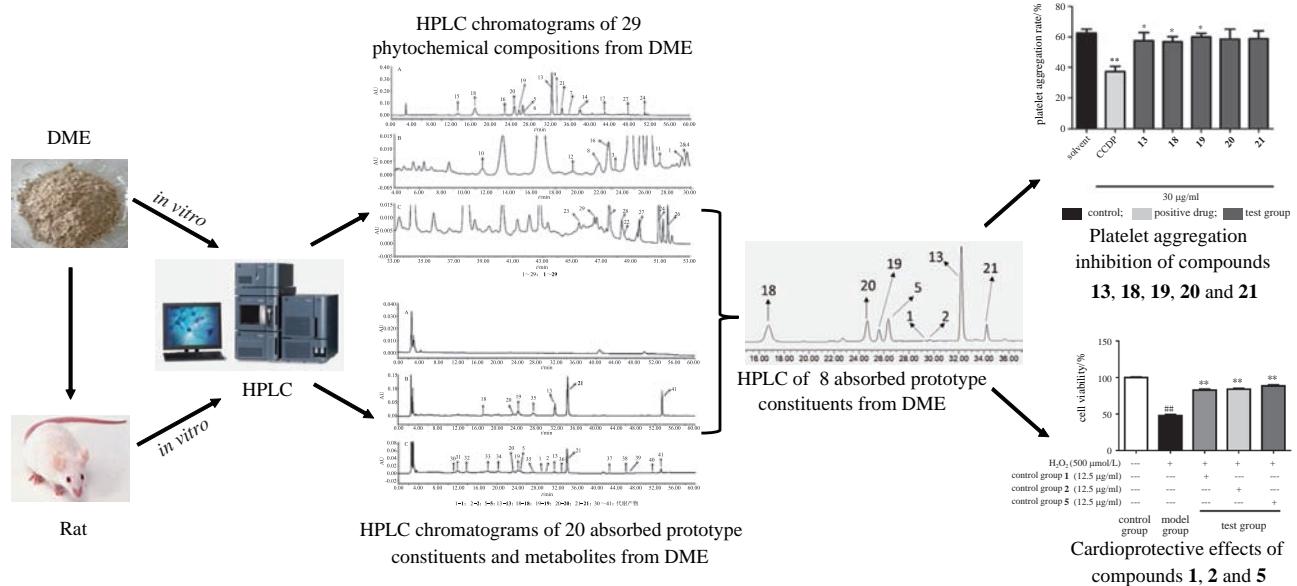


co-processed excipient

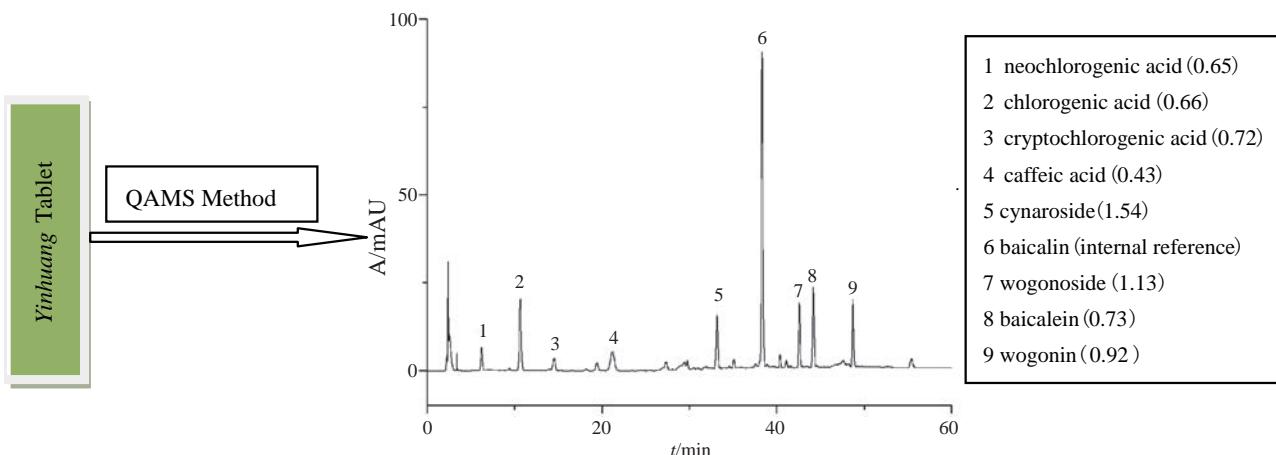


physical mixture

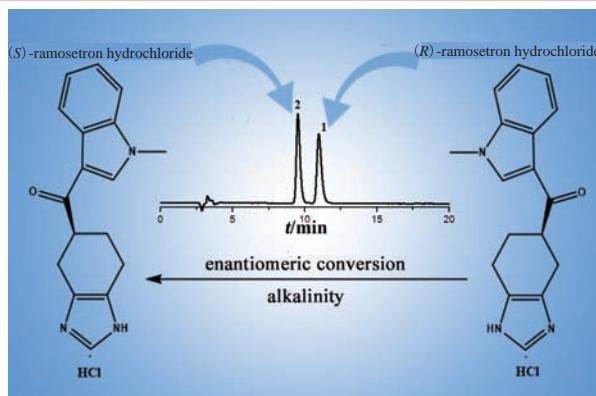
**1142** Anti-myocardial Ischemia Components from *Dracocephalum moldavica* Extraction Based on Serum Pharmacocchemistry Analysis.....*LIZH, YANRJ, XINGJG, WUT, LIUL\**  
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.08.015



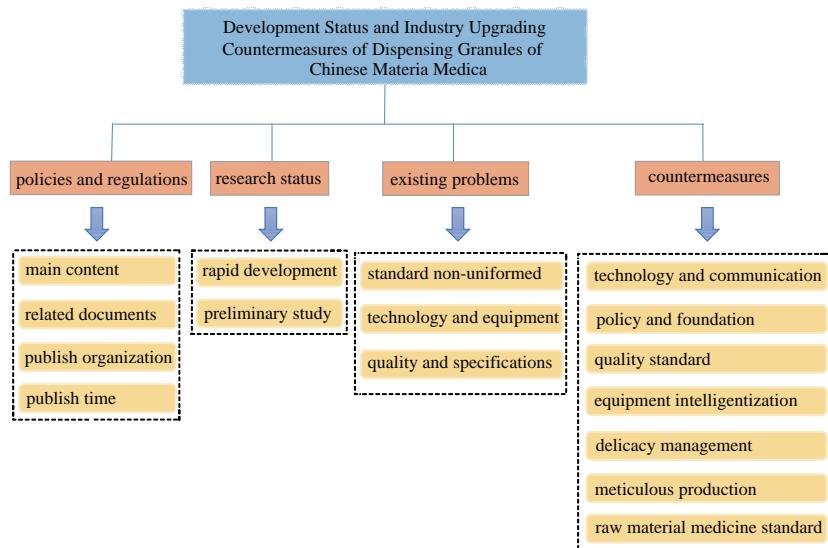
**1149** Determination of Nine Active Components in *Yinhuang* Tablets by QAMS Method.....*NINGSB, WANGJF, ZHANZS, ZHOUMB, XIND, TENGJL\**  
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.08.016



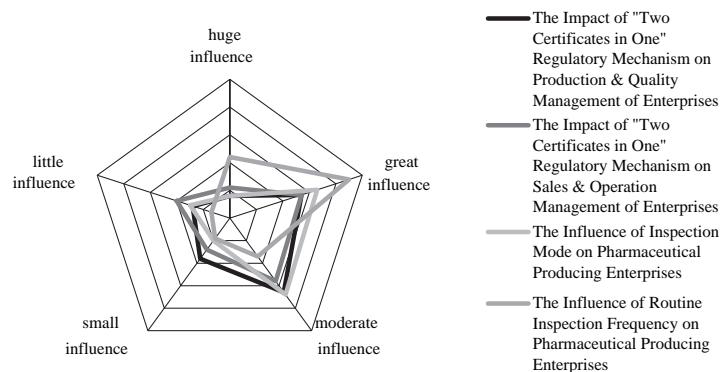
**1155** Determination of (*S*)-Enantiomer of Ramosetron Hydrochloride by HPLC and Influencing Factors of the Enantiomeric Conversion.....*SHENC, XIAX, GAOWY, ZENGSS, YEJC\**  
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.08.017



- 1161** Development Status and Industry Upgrading Countermeasures of Dispensing Granules of Chinese Materia Medica.....*LIN H Y, WU Z F\*, ZENG L H, WANG X C, YANG M\**  
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.08.018

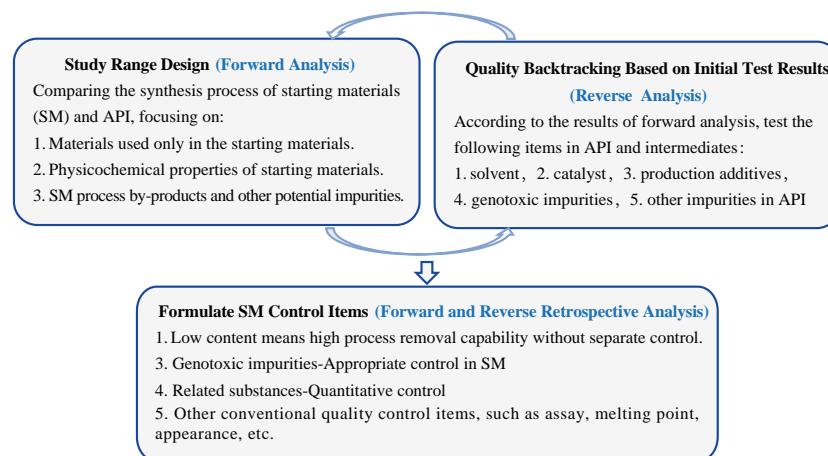


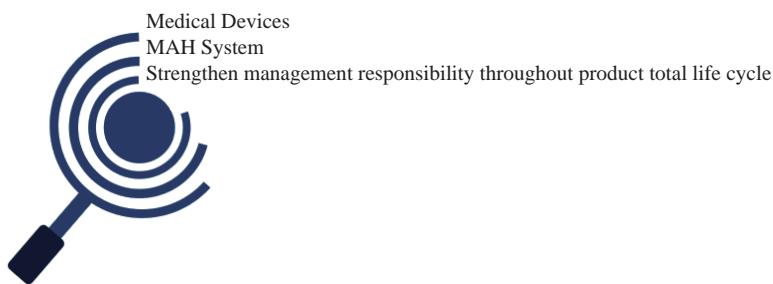
- 1166** Impact Analysis of Regulatory Strategy of Combining Manufacturing Authorization Certificate and the GMP Certificate on Pharmaceutical Producing Enterprises....*ZHUANSUN Y, YU J N, ZHU J X\**  
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.08.019



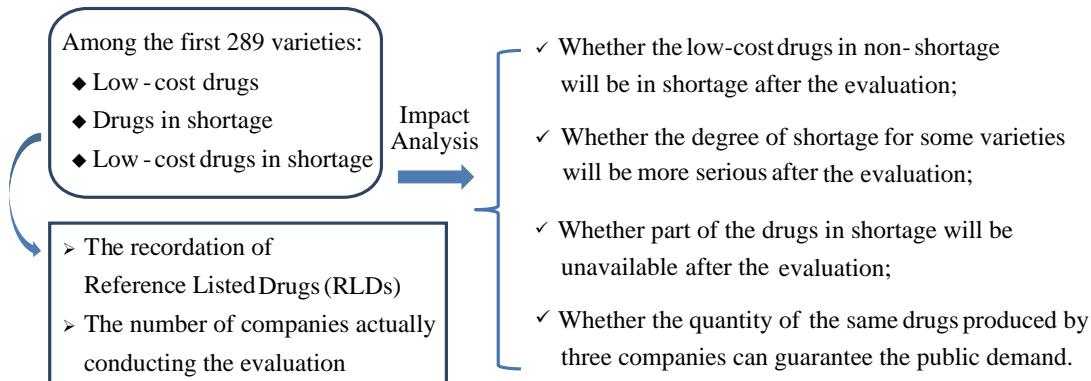
The Impact of "Two Certificates in One" Regulatory Mechanism on Pharmaceutical Producing Enterprises

- 1172** Selection and Control of Starting Materials in the Process of Chemical Synthetic APIs Submission.....*DU S, LIANG Y\**  
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.08.020

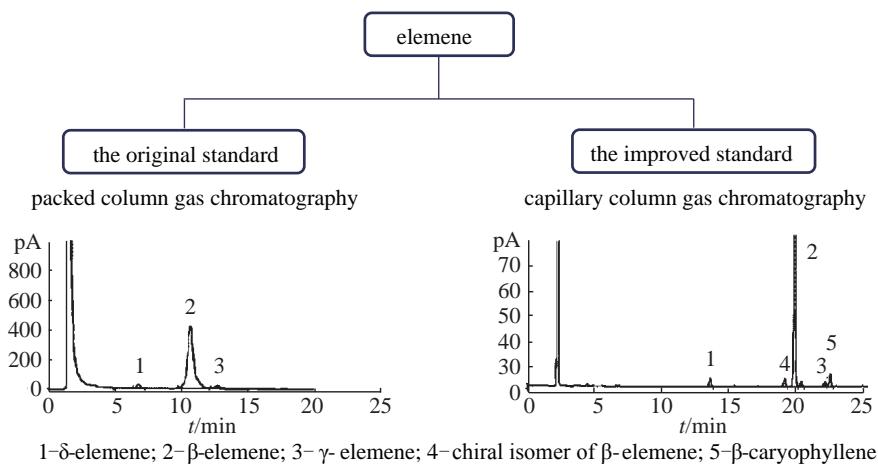




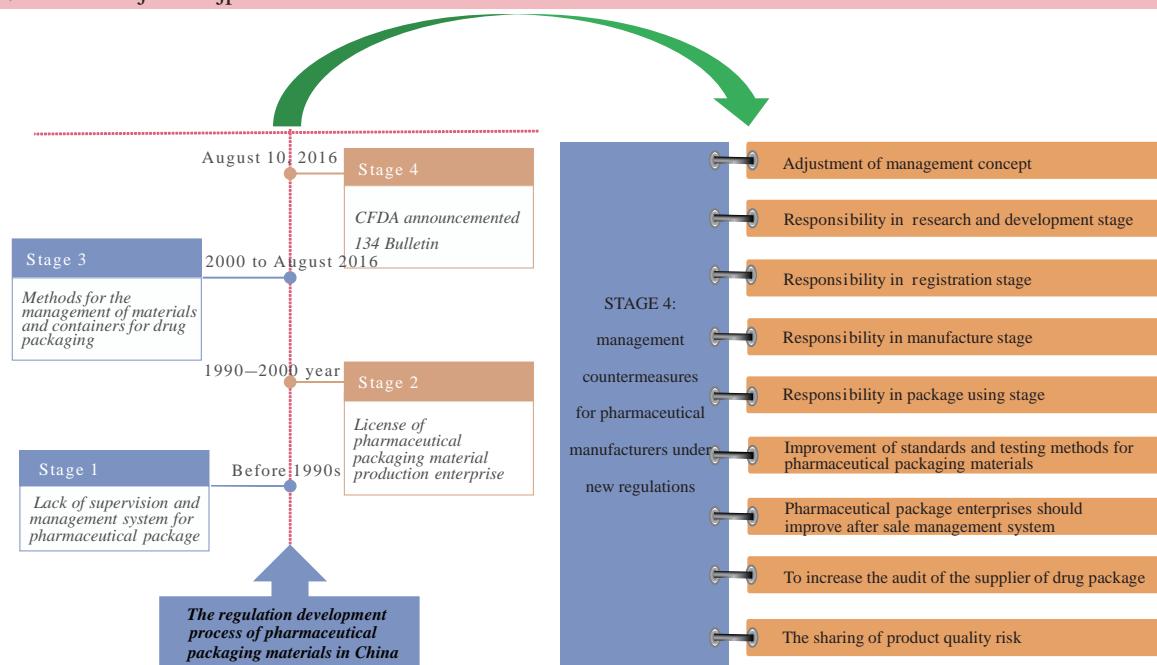
1182 Analysis and Proposal of Quality and Efficacy Consistency Evaluation for Generics on the Low-cost Drugs and Drugs in Shortage.....YU X W, DONG M, YOU C N\*



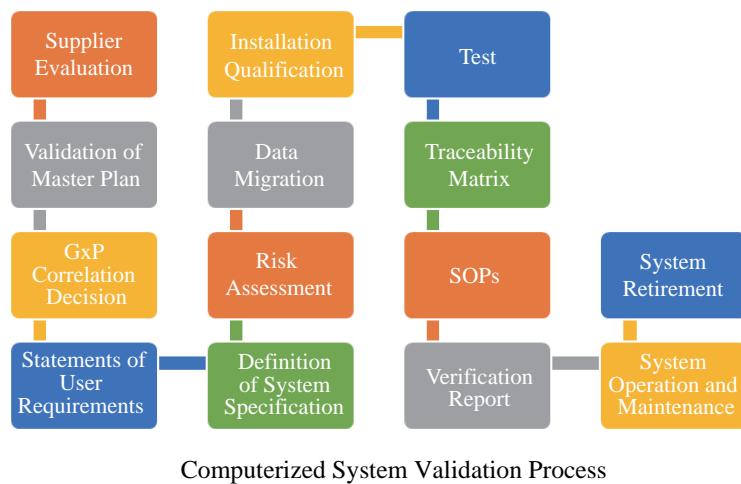
1187 Analysis of Improvement of National Standards of Elemene and Its Preparations•YUE Z H, LI H Y



**1191 Quality Control Improvement of Pharmaceutical Packaging Materials in Drug Products Enterprise under the Associated Evaluation and Approval Policy Combining Drug Products and Pharmaceutical Packaging Materials and Pharmaceutical Excipients.....LIU S**  
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.08.024



**1195 Application of Computerized System Validation Based on GAMP5.....SHEN C, LU Z Y, XU X H, XU R, LAI C C**  
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.08.025



# 中国医药工业杂志

ZHONGGUO YIYAO GONGYE ZAZHI

(月刊, 1970年11月创刊)

2018年第49卷 第8期 8月10日出版

版权所有



Monthly (Founded in 1970)

Vol.49 No.8 August 10, 2018

©All Rights Reserved

主 管	上海医药工业研究院	Director	Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry
主 办	上海医药工业研究院 中国药学会 中国化学制药工业协会	Sponsor	Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry Chinese Pharmaceutical Association China Pharmaceutical Industry Association
协 办	浙江海正集团有限公司 上海数图健康医药科技有限公司 山东罗欣药业集团股份有限公司 楚天科技股份有限公司 鲁南制药集团股份有限公司 广东东阳光药业有限公司	Assist Sponsor	Zhejiang Hisun Group Co., Ltd. China Pharmadl (Shanghai) Co., Ltd. Shandong Luoxin Pharmaceutical Group Stock Co., Ltd. Truking Technology Limited Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd. Sunshine Lake Pharma Co., Ltd., HEC Pharma Group
总 编 辑	周伟澄	Managing Editor	ZHOU Weicheng
副 总 编 辑	黄志红, 刘玲玲	Associate Managing Editor	HUANG Zhihong, LIU Lingling
责 任 编 辑	吴霖萍	Executive Editor	WU Linping
编 辑 出 版	《中国医药工业杂志》编辑部	Editor by	Editorial Board of <i>Chinese Journal of Pharmaceuticals</i>
编 辑 部 地 址	上海市北京西路1320号(200040)	Address for Foreign Subscriber	1320 Beijing Road (W), Shanghai 200040, China
电 话	021-62793151	Tel	0 086-21-62793151
传 真	021-62473200	Fax	0 086-21-62473200
电 子 邮 件	cjph@pharmadl.com	E-mail	cjph@pharmadl.com
网 址	www.cjph.com.cn www.pharmadl.com	Web Site	http://www.cjph.com.cn http://www.pharmadl.com
广告发行联系			
电 话	021-62474272	Tel	021-62474272
传 真	021-62473200	Fax	021-62473200
电 子 邮 件	taoxh@pharmadl.com ouyy@pharmadl.com	E-mail	taoxh@pharmadl.com ouyy@pharmadl.com
印 刷	上海欧阳印刷厂有限公司	Printed by	Shanghai Ouyang Printing Co., Ltd.
发 行 范 围	公开发行		
国 内 发 行	上海市报刊发行局	Domestic Distributed by	Local Post Office
国 外 发 行	中国国际图书贸易集团有限公司 (北京399信箱, 100044)	Abroad Distributed by	China International Book Trading Corporation (P.O.Box 399, Beijing 100044, China)
国 内 订 阅	全国各地邮政局		

\* 通信联系人: 如为第一作者则不加“\*”号。征稿简则刊登于当年第1期 \*To whom correspondence should be addressed

[期刊基本参数] CN 31-1243/R \*1970\*m\*A4\*162\*zh\*P\*20.00\* \*25\*2018-08

2018年版权归《中国医药工业杂志》编辑部所有, 除非特别声明, 本刊刊出的所有文章不代表本刊编委会的观点。

ISSN 1001-8255

CN 31-1243/R

国内邮发代号 4-205

国外邮发代号 M6070

CODEN: ZYGZEA

国内定价: 每册 20.00 元



公众微信  
微信号: cjph-cjph



公众微博  
weibo.com/cjph

# 《中国医药工业杂志》第十四届编辑委员会

EDITORIAL BOARD OF 《CHINESE JOURNAL OF PHARMACEUTICALS》

(以姓名拼音为序)

## 名誉主编(HONORARY EDITOR-IN-CHIEF)

桑国卫\*(SANG Guowei)

## 顾问(CONSULTANT)

陈凯先\*(CHEN Kaixian)

蒋建东(JIANG Jiandong)

沈克康(SHEN Jingkang)

杨胜利\*(YANG Shengli)

丁 健\*(DING Jian)

孔德云(KONG Deyun)

王广基\*(WANG Guangji)

朱宝泉(ZHU Baoquan)

侯惠民\*(HOU Huimin)

李绍顺(LI Shaoshun)

吴晓明(WU Xiaoming)

## 主任编委(EDITOR-IN-CHIEF)

陈芬儿\*(CHEN Fener)

## 副主任编委(ASSOCIATE EDITOR-IN-CHIEF) (^常务副主任编委)

白 鹏(BAI Hua)

陈桂良(CHEN Guiliang)

唐 岳(TANG Yue)

魏宝康(WEI Baokang)

张 霽(ZHANG Ji)

周 斌(ZHOU Bin)

朱建伟(ZHU Jianwei)

陈 兵(CHEN Bing)

胡文浩(HU Wenhao)

王 浩^△(WANG Hao)

杨 超(YANG Chao)

张万斌(ZHANG Wanbin)

周伟澄^△(ZHOU Weicheng)

陈代杰^△(CHEN Daijie)

李明华(LI Minghua)

王军志(WANG Junzhi)

张贵民(ZHANG Guimin)

张绪穆(ZHANG Xumu)

周 燕(ZHOU Yan)

## 编委(MEMBER OF THE EDITORIAL BOARD)

蔡正艳(CAI Zhengyan)

邓卫平(DENG Weiping)

董树沛(DONG Shupei)

冯 军(FENG Jun)

干荣富(GAN Rongfu)

何严萍(HE Yanping)

黄志红(HUANG Zhihong)

刘玲玲(LIU Lingling)

龙亚秋(LONG Yaqiu)

罗国强(LUO Guoqiang)

马 璞(MA Jing)

邵 蓉(SHAO Rong)

孙飘扬(SUN Piaoyang)

孙 逊(四川大学)(SUN Xun)

屠永锐(TU Yongrui)

王 昱(WANG Min)

王 彦(WANG Yan)

吴 伟(WU Wei)

杨立荣(YANG Lirong)

杨玉社(YANG Yushe)

张福利(ZHANG Fuli)

张卫东(ZHANG Weidong)

赵临襄(ZHAO Linxiang)

钟大放(ZHONG Dafang)

周建平(ZHOU Jianping)

陈少欣(CHEN Shaoxin)

丁锦希(DING Jinxi)

范代娣(FAN Daidi)

傅 磊(FU Lei)

郭 文(GUO Wen)

胡海峰(HU Haifeng)

李范珠(LI Fanzhu)

刘新泳(LIU Xinyong)

陆伟根(LU Weigen)

罗一斌(LUO Yibin)

潘卫三(PAN Weisan)

宋秋玲(SONG Qiuling)

孙小强(SUN Xiaoqiang)

陶 涛(TAO Tao)

王建新(WANG Jianxin)

王全瑞(WANG Quanrui)

王玉成(WANG Yucheng)

吴 勇(WU Yong)

杨 明(YANG Ming)

殷 明(YIN Ming)

张启明(ZHANG Qiming)

张英俊(ZHANG Yingjun)

赵文杰(ZHAO Wenjie)

钟为慧(ZHONG Weihui)

程卯生(CHENG Maosheng)

董江萍(DONG Jiangping)

方 浩(FANG Hao)

甘 勇(GAN Yong)

何 菱(HE Ling)

胡又佳(HU Youjia)

李建其(LI Jianqi)

刘 忠(LIU Zhong)

陆伟跃(LU Weiyue)

吕 扬(LÜ Yang)

朴虎日(PIAO Huri)

苏为科(SU Weike)

孙 逊(复旦大学)(SUN Xun)

涂 涛(TU Tao)

王 健(WANG Jian)

王善春(WANG Shanchun)

吴 彤(WU Tong)

吴勇琪(WU Yongqi)

杨苏蓓(YANG Subei)

尤启冬(YOU Qidong)

张庆文(ZHANG Qingwen)

张志荣(ZHANG Zhirong)

郑起平(ZHENG Qiping)

周虎臣(ZHOU Huchen)

## \*院士

### 《中国医药工业杂志》编辑部成员(EDITORIAL STAFF)

总编辑(Managing Editor): 周伟澄(ZHOU Weicheng)

副总编辑(Associate Managing Editor): 黄志红(HUANG Zhihong), 刘玲玲(LIU Lingling)

责任编辑(Editor): 刘玲玲(LIU Lingling)(兼), 王 盈(WANG Ying), 吴霖萍(WU Linping), 郭琳琳(GUO Linlin)

美术编辑(Art Editor): 沈建成(SHEN Jiancheng), 陆燕玲(LU Yanling), 钱苗苗(QIAN Miaomiao)

编辑助理(Editorial Assistant): 韦旭华(WEI Xuhua)

广告、发行负责(Advertisement Manager): 陶旭辉(TAO Xuhui), 欧阳怡(OUYANG Yi)

## 专论 Perspectives

# CRISPR 药物递送系统的研究现状及发展趋势

沈 洁<sup>1,2</sup>, 李 燕<sup>1</sup>, 卢治国<sup>1,2</sup>, 张田露<sup>1</sup>, 张 欣<sup>1\*</sup>

(1. 中国科学院过程工程研究所, 生化工程国家重点实验室, 北京 100190; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要:** CRISPR (clustered regularly interspersed short palindromic repeats) 是一种新型基因编辑技术, 可以通过对基因进行精准修饰来达到治疗肿瘤、艾滋病等疾病的目的。然而, 基因药物存在不稳定、易降解、入胞能力差等问题, 限制了 CRISPR 技术的应用。因此, 需要寻求合适的递送系统, 将药物有效地递送至靶细胞中, 进而提升 CRISPR 技术的效率及特异性。本文主要综述了近年来 CRISPR 技术的药物递送系统的研究进展, 对病毒载体和非病毒载体的优势、劣势, 研究现状及发展趋势等进行总结和阐述, 为各类药物递送系统在生物医药治疗领域的应用提供参考。

**关键词:** CRISPR; 载体; 治疗

中图分类号: R94 文献标志码: A 文章编号: 1001-8255(2018)08-1041-12

DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.08.001



**【专家介绍】**张欣, 女, 研究员。2010 年以百人计划加盟中国科学院过程工程所, 建立了“基因药物剂型工程”团队, 现任生化工程国家重点实验室副主任。2015 年获得国家自然科学基金优秀青年科学基金, 同年受邀担任 Theranostics 编委。2018 年被 Nano Research 期刊授予“2018 Young Innovator Award in Nanobiotechnology”, 同年获得中国生物材料学会“青年科学家奖”。聚焦制约基因治疗成败的瓶颈等前沿和关键科学问题, 通过生物材料分子的理性设计, 发现了生物材料分子结构与功能随微环境变化的特征, 论证了对基因药物输递过程进行调控的可能性和机制, 建立了具有自己特色的基因药物输递的研究方向。Tel : 010-82544853 ; E-mail : xzhang@ipe.ac.cn。

基因治疗是指通过操作遗传物质来干预疾病的发生、发展和进程，包括替代或纠正人自身基因结构或功能上的错乱，杀灭病变的细胞或增强机体清除病变细胞的能力等，从而达到治疗疾病的目的<sup>[1]</sup>。传统的基因治疗技术主要有锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFNs)技术、转录激活子样效应物核酸酶(transcription activator-like effectors nucleases, TALENs)技术等。然而，ZFNs技术具有效率低、耗费时间长、成本高的缺点<sup>[2]</sup>，TALEN蛋白的相对分子质量较大使实验操作不便<sup>[3]</sup>。CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)技术作为一种新型基因治疗技术，具有扩展性更强、简便、低成本的优点<sup>[4]</sup>，是基因治疗技术研究的热点。

CRISPR是存在于细菌及古细菌中的一段回文序列，是大多数细菌及古细菌中的一种天然免疫方式<sup>[5]</sup>。有超过40%的细菌和90%的古细菌基因组具有这样的回文序列结构<sup>[6]</sup>。CRISPR已被开发成为一种新型基因编辑工具，通过对基因进行修饰、编辑等过程来达到治疗疾病的目的。根据功能元件的不同，CRISPR/Cas系统可分为I类、II类和III类系统，不同类型的CRISPR/Cas系统完成基因剪切的步骤不同。其中，II类系统比较简单，不需要依赖多蛋白复合物，而只需要单独的Cas9核酸酶即可，也是目前研究最成熟、应用最广泛的系统<sup>[7]</sup>。CRISPR/Cas9是一种RNA导向的DNA核酸内切酶系统，在该系统中Cas9核酸内切酶由2种天然的RNA组成，分别是crRNA(即CRISPR RNA)和反式激活的crRNA(即trans activating CRISPR RNA, tracrRNA)，该复合物能够通过20个核苷酸数的导向序列靶向特异性基因组位点<sup>[8]</sup>。

收稿日期：2018-01-02

作者简介：沈洁(1995—)，女，硕士研究生，专业方向：药物载体分子的设计、合成。

Tel: 13167386825

E-mail: shenjie17@mails.ucas.ac.cn

通信联系人：张欣(1979—)，女，研究员，主要从事新型药物给药载体的设计、制备及应用等研究。

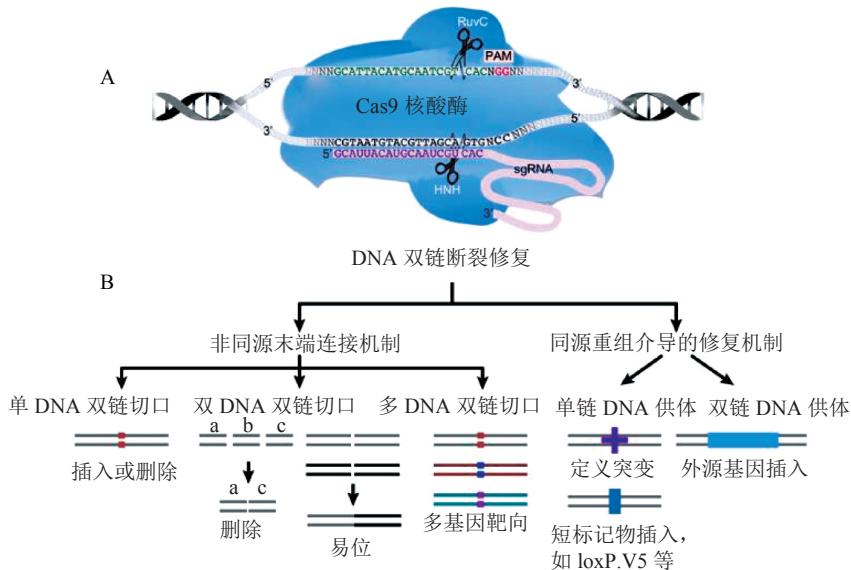
Tel: 010-82544853

E-mail: xzhang@ipe.ac.cn

通过人工设计这2种RNA，可以将其改造成为单链导向RNA(single guide RNA, sgRNA, 如图1A所示)<sup>[9]</sup>，sgRNA可以介导Cas9核酸酶在特定位点处进行切割，形成DNA双链断裂，从而对基因进行精准编辑等操作<sup>[10]</sup>。sgRNA对确定特异性目标序列十分重要。另一个重要因素是原间隔序列临近基序，即PAM(protospacer adjacent motif)基序，它通常由NGG3个碱基构成。CRISPR/Cas9介导的DNA双链断裂能够通过同源重组机制和非同源末端连接机制被修复(如图1B所示)，非同源末端连接机制可以在目标位点上对基因进行小范围的插入或删除，而同源重组机制则以宿主的等位基因为模板复原野生型序列<sup>[11]</sup>。通过这2种修复机制可以对基因进行精准的剪切、插入等操作，进而治疗疾病<sup>[12]</sup>。

CRISPR技术已在治疗肿瘤、艾滋病、神经退行性疾病等方面取得了很大的进展。Chen等利用CRISPR技术开发出肿瘤的一种新型基因疗法<sup>[13]</sup>，能够靶向作用于促癌融合基因的DNA序列，融合基因通常会诱发肿瘤。该研究在接受人类前列腺癌细胞和肝癌细胞移植植物的小鼠模型中，利用CRISPR组分对融合基因中的突变DNA进行切割，并且用能够诱发肿瘤细胞死亡的基因来替换突变的DNA，从而使小鼠体内肿瘤尺寸减小30%，且所有小鼠均存活。该方法特异性高，为开发治疗肿瘤的新型疗法提供了参考。Yin等利用CRISPR/Cas9技术从活体动物基因组中切除HIV-1靶向片段<sup>[14]</sup>，将病毒基因的RNA表达降低了60%~95%，从而消除了HIV感染。该研究为彻底治愈HIV感染带来希望。Basu等使用CRISPR/Cas9基因编辑技术开发出了一种监控内生α-突触核蛋白转录的工具<sup>[15]</sup>，由于α-突触核蛋白与帕金森病发病直接相关，因此该工具可用来筛查帕金森病。Yang等利用CRISPR/Cas9基因编辑技术敲除小鼠脑细胞中突变的亨廷顿蛋白的一部分基因<sup>[16]</sup>，使小鼠脑部的蛋白聚集物消失，运动能力得到改善。

CRISPR技术的出现使得基因治疗更加高效，为基因编辑技术的研究和改造带来了巨大的潜力。



A : Cas9-RNA 复合物连接目标 DNA 的结构图, B : CRISPR-Cas9 介导的双链 DNA 断裂通过内源性 DNA 修复机制进行修复, 主要包括非同源末端连接机制 (NHEJ) 和同源重组介导的修复机制 (HDR)

图 1 CRISPR-Cas9 介导的基因编辑原理及修复机制<sup>[12]</sup>  
Fig.1 CRISPR-Cas9-mediated Genome Editing and Gene Repair<sup>[12]</sup>

但是, 基因药物存在不稳定、易降解、入胞能力差等问题。为克服上述问题, 需要合适的递送方法有效地将药物递送至靶细胞或靶器官内。理想的载体应当具有无毒、靶向性好、高效、成本低廉、可生物降解等优点。目前, CRISPR 药物递送主要采取 3 种方法——物理方法、病毒载体和非病毒载体。本文主要从 CRISPR 药物递送方法的原理、应用、优势及不足等方面进行阐述。

## 1 物理方法

递送 CRISPR 系统组分最为简单的方式就是通过物理方法, 主要包括微流控膜变形、电穿孔、高压注射等。这些方法主要通过细胞膜来递送质粒 DNA 编码的 Cas9-sgRNA 复合物 (图 2)。物理方法简单、高效, 提高了基因的表达, 在体外试验中应用广泛。

### 1.1 微流控膜变形法

微流控膜变形法是通过微流泵快速促进细胞机械变形, 产生瞬时细胞膜孔, 进而可以向细胞内递送生物材料, 包括在难以转化的淋巴瘤细胞和胚胎干细胞中实现高效递送, 同时细胞的活力也得到提

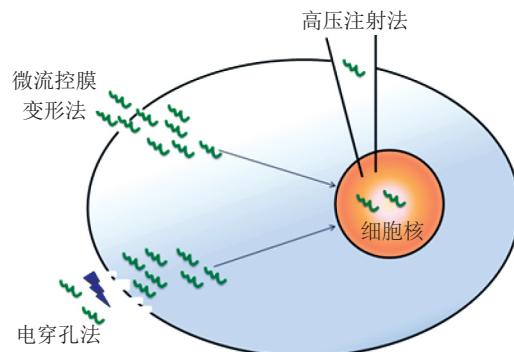


图 2 物理方法递送药物示意图  
Fig.2 Drugs Delivered by Physical Methods

升。Han 等优化了微流控膜变形法<sup>[17]</sup>, 将 sgRNA 和 Cas9 核酸酶递送至不同类型的细胞中, 并且成功地在 T 细胞中进行基因编辑, 敲除了编码 PD-1 的基因, 抑制了肿瘤生长。这一方法适用于不同类型的细胞中, 尤其是难以转化的细胞中, 可以达到高通量的灵活应用。

### 1.2 电穿孔技术

电穿孔技术是在脉冲电场作用下细胞膜暂时出

现微孔的物理过程，其结果是细胞内外分子交换显著增加，有利于细胞吸收各种药物、基因物质、蛋白质和其他大分子物质等。电场取消后微孔关闭，不会对细胞造成任何影响。这种瞬时可逆的膜渗透性大大促进了药物的跨膜运输<sup>[18]</sup>，因此电穿孔技术能够有效地传递DNA、RNA和蛋白质至细胞内，在临幊上更多地被用来递送信使RNA(mRNA)<sup>[19]</sup>。Hashimoto等采用电穿孔技术有效地将mRNA递送至小鼠的受精卵中<sup>[20]</sup>，并促进了基于CRISPR/Cas9的基因组编辑。Kaneko等利用电穿孔技术将核酸内切酶的mRNA递送至完整的小鼠胚胎中<sup>[21]</sup>，并且在特定的位点进行基因编辑，利用电穿孔技术的基因组编辑效率和胚胎存活率都比传统的微量注射要高。Latella等采用电穿孔技术将CRISPR/Cas9质粒表达的sgRNA递送至视紫红质(RHO)转基因小鼠中<sup>[22]</sup>，可以精准地进行基因编辑，显著地降低了突变RHO蛋白的表达。

### 1.3 高压注射递送技术

高压注射递送技术是一种简便、高效、安全的体内递送方法，药物可通过注射器快速地注射到静脉中，在体内发挥作用，从而达到治疗疾病的效果。Yin等利用高压注射技术递送CRISPR/Cas9系统的组分<sup>[23]</sup>，对人类遗传性酪氨酸血症的小鼠肝细胞模型的Fah突变基因进行校正，结果显示正确基因成功插入到小鼠肝细胞中，健康细胞最终可取代病变细胞，进而达到治愈疾病的效果。Xue等利用高压注射技术递送CRISPR系统表达Cas9核酸酶和

sgRNA的质粒DNA至小鼠肝脏中<sup>[24]</sup>，并且靶向肿瘤抑制基因Pten和p53，利用Cas9蛋白酶敲除Pten和p53基因片段，生成了肝肿瘤小鼠模型。该研究证实了使用CRISPR/Cas9技术作用于肿瘤抑制基因是可行的，为肝癌模型和功能性基因组学的快速发展提供了新的思路。

综上，虽然物理方法简便、快速，但是由于生理和病理条件的变化，物理方法更适用于体外传递，很难应用于体内递送试验中。通过注射的方法虽可应用于小鼠体内试验，但危险性较大，而且是否能够应用于大型动物尚且未知。因此，需要寻求能够实现CRISPR基因治疗药物体内递送的方法。

## 2 病毒载体

病毒载体常用于基因治疗过程中的药物递送。病毒型载体就是将野生型病毒加以改进，去除其致病性，同时使其携带遗传物质，并包装成病毒颗粒导入体内，感染宿主细胞，将递送的遗传物质在宿主细胞内表达，从而达到治疗疾病的目的。递送CRISPR系统组分的病毒性载体主要有腺病毒(adenoviral)、腺相关病毒(adeno-associated viral, AAV)和慢病毒(lentiviral)载体等，见图3。病毒性载体在基因传递与表达中因高效而广泛应用于体内外药物递送研究中<sup>[25]</sup>。

### 2.1 腺病毒载体

腺病毒是一种双链、无包膜的DNA病毒。腺病毒载体携带基因较大，可以用于瞬时表达。同时具有宿主范围广、可感染分裂和非分裂细胞、高滴

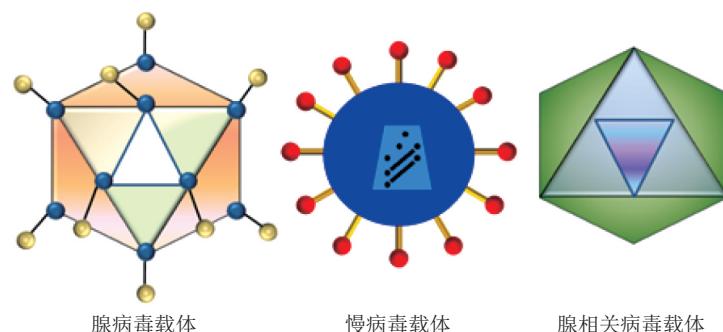


图3 腺病毒、慢病毒和腺相关病毒的结构

Fig.3 Structures of Adenovirus, Lentivirus and Adeno-associated Virus

度制备、易纯化、外源基因装载容量大等优点<sup>[26]</sup>，应用范围较广。

Cheng 等开发了一种基于体内基因编辑的腺病毒的 CRISPR/Cas9 系统<sup>[27]</sup>，在肝脏中，证实该系统可以达到组织特异性基因剔除的水平，从而导致表型的改变。Maggio 等研究了在人体不同细胞类型中腺病毒载体递送 CRISPR/Cas9 系统组分的适宜性<sup>[28]</sup>，结果证实腺病毒载体可以作为递送 CRISPR 系统组分的有利平台，有效地将核酸酶和 sgRNA 递送至人类体细胞中发挥基因编辑的作用。Wang 等以小鼠内 *Pten* 基因为目标，利用腺病毒载体来递送链球菌 Cas9 核酸酶<sup>[29]</sup>。*Pten* 基因与非酒精性脂肪肝炎密切相关，也与磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)-丝氨酸 / 苏氨酸激酶 (serine/threonine kinase, AKT) 信号通路 (该通路能够调节细胞迁移、生长、增殖及凋亡) 的负调节蛋白有关。结果表明，即使肝脏中有典型的腺病毒载体相关的免疫毒性，腺病毒载体仍然能够高效地调节 *Pten* 基因编辑。该研究结果可为人类肝脏疾病的治疗提供参考，在今后涉及到活体 CRISPR/Cas9 递送的转译研究中，也要考虑到 Cas9 核酸酶特异性免疫反应的重要性。

## 2.2 腺相关病毒载体

腺相关病毒是一种无包膜的单链线性 DNA 病毒。由于具有宿主范围广、病原性低和携带的治疗基因表达期长等优势，已成为目前最有前景的基因转移载体之一<sup>[30]</sup>。

Ran 等将金黄色葡萄球菌的 Cas9 核酸酶和 sgRNA 表达盒装载到腺相关病毒载体中<sup>[31]</sup>，以小鼠肝脏中胆固醇调节基因神经细胞凋亡调节转化酶-1 (即 Pcsk9) 为目标，注射 1 周后，小鼠总胆固醇下降 40%，血清中的 Pcsk9 蛋白含量和总胆固醇的水平明显下降。Yang 等利用腺相关病毒载体递送 CRISPR/Cas9 组分至亨廷顿舞蹈症模式小鼠大脑中<sup>[16]</sup>，敲除编码亨廷顿蛋白的部分基因，通过基因敲除，小鼠大脑中的蛋白聚集物明显减少，运动能力也得到改善。Kaulich 等研发出 CRISPR/Cas9 和腺相关病毒靶向基因重组的方法<sup>[32]</sup>，通过编辑

内源基因来研究基因的功能，适用于研究人类基因组中大多数的基因。*Nrl* 基因是靶向决定感光细胞前体是否发育成为视杆细胞的关键基因，Yu 等利用腺相关病毒将该基因的 sgRNA 和 Cas9 内切核酸酶递送至小鼠的视网膜上<sup>[33]</sup>，成功阻止了小鼠视网膜色素变性。视网膜变性是一种有遗传倾向，能够导致失明的疾病，研究结果证实该方法可以长期维持视网膜细胞基因表达的能力，可为治疗人类视网膜变性疾病提供参考。

## 2.3 慢病毒载体

慢病毒载体能够将外源基因整合到宿主细胞的染色体上，遗传物质在宿主细胞内表达，进而达到治疗疾病的效果。慢病毒载体转染效率较高，能够构建稳定的表达细胞系。该类载体是一类重组逆转录病毒载体，可以感染非分裂期细胞，可容纳的外源性目的基因的片段大，是一种重要的基因转移工具，应用于基因治疗和细胞分子生物学研究领域<sup>[34]</sup>。

Kabadi 等开发了一种慢病毒载体系统来递送 Cas9 蛋白酶和靶向不同位点的 sgRNA<sup>[35]</sup>，该系统中每 1 个 sgRNA 都可以有效表达，可以促进基因编辑进程，维持细胞的转录活化状态。这一递送系统可应用于不同的细胞类型中，能够有效地递送基于 CRISPR/Cas9 多基因编辑系统的组分。Heckl 等使用慢病毒载体递送 sgRNA 和 Cas9 核酸酶的组合体<sup>[36]</sup>，在小鼠的造血干细胞中修改基因，导致髓系恶性肿瘤，上述结果表明慢病毒载体递送的 sgRNA 和 Cas9 基因编辑有助于在小鼠体内建造一个广泛的肿瘤模型，以更好地反应人类疾病的复杂性。Wang 等将 CRISPR/Cas9 技术、慢病毒载体和高通量测序技术结合<sup>[37]</sup>，建立了一个集合的功能性基因筛选方法，构建了含有 7 114 个基因的突变细胞库。可以利用 sgRNA 库对哺乳动物进行基因分析，将 sgRNA 稳定地融入到基因组中，使得复杂的突变体能够被追踪，对于研究哺乳动物遗传学具有重要的价值。Wang 等成功应用整合酶缺陷的慢病毒载体检测 CRISPR/Cas9 和 TALEN 的脱靶效应<sup>[38]</sup>。通常，脱靶效应会使基因组不稳定，影响基因的功能，而通过慢病毒的检测，可以检测出低

至 1% 的脱靶频率，方法灵敏度高。该研究对优化 CRISPR/Cas9 和 TALEN 技术，减少脱靶效应，保证基因编辑的准确性提供了重要参考。

虽然病毒性载体在基因传递和表达中表现出高效性，但也存在致病性风险。目前，安全性问题是病毒载体在动物研究中面临的主要问题。另外，病毒载体的装载能力有限，可能是基因编辑系统递送的障碍。而且在受感染细胞类型上也有局限性，在病毒载体的应用中，大规模的载体生产也是需要考虑的问题<sup>[39]</sup>。

### 3 非病毒载体

非病毒载体更加安全，包装能力强且易于组装，因而成为 CRISPR 系统递送的热点。非病毒性载体具有低致免疫性，易于组装，并且在递送大型基因时具有很大的优越性。但是，非病毒性载体的递送效率较低。基于非病毒载体的优点及其发展趋势，新型的基于脂质、聚合物和无机纳米粒子等的递送系统，是 CRISPR 系统传递的有效载体<sup>[25]</sup>。

#### 3.1 脂质体

脂质体是由磷脂双分子定向排列而成的直径为几纳米至几微米的超细粒子，亲水性头部形成膜的内外表面，亲脂性的尾部位于膜的中间，双分子层内外分别包封脂溶性和水溶性药物。脂质体能够与细胞膜融合，进而将药物递送至生物体内。脂质体能使药物具有靶向性，提高和延长疗效，缓和药物毒性，避免耐药性，甚至改变给药途径<sup>[40]</sup>。目前，CRISPR 技术主要应用的脂质体有阳离子脂质体、两性离子脂质体以及类脂质体等。

##### 3.1.1 阳离子脂质体

在 CRISPR/Cas9 系统中，阳离子化的 Cas9 蛋白和高度阴离子化的 sgRNA 产生一个高度阴离子化的 RNP (ribonucleoprotein) 复合物。这一复合物可以被阳离子脂质体包裹，通过胞吞作用和巨胞饮作用递送至细胞内<sup>[41]</sup>。阳离子脂质体是一种自身带有正电荷的脂质囊泡，主要由阳离子脂质和中性辅助脂组成，阳离子脂质为整个脂质体提供正电荷。阳离子脂质利用静电相互作用，与带有负电荷的基因治疗药物相互作用，有效压缩基因治疗药物由伸

展结构成为体积较小的粒子，形成负载基因治疗药物的阳离子脂质体转染复合物<sup>[42]</sup>。阳离子脂质体主要有 3 个区域：阳离子的头基、疏水性的尾部和 2 个区域之间的连接域<sup>[43]</sup>。阳离子脂质的正电荷分子能够结合负电荷核酸形成脂质体。利用阳离子脂质来传送与高度负电荷分子结合的蛋白质，相比采用正电荷蛋白质或肽来传送蛋白质，其效率提高了近 1 000 倍<sup>[44]</sup>。由于制备简单，磷脂成分无毒和相对较低的免疫原性，阳离子脂质体已成为最具有吸引力的基因载体之一<sup>[25]</sup>。

外泌体是一种纳米尺寸的膜性囊泡，具有很好的组织、细胞靶向能力，能够稳定携带药物，但因其体积小，负载能力弱，在药物递送方面应用受限。Lin 等通过将阳离子脂质体 (Lipofectamine 2000) 与外泌体杂化形成杂化外泌体<sup>[45]</sup>，杂化外泌体既具有很好的靶向性和稳定性，又拥有脂质体负载能力强的优势，可高效地将 CRISPR 系统组分递送至间充质细胞。Jiang 等建立了一种新型阳离子脂质纳米颗粒系统<sup>[46]</sup>，可以包裹 Cas9 蛋白的 mRNA 和 sgRNA，并且在体内可以有效地输送至肝脏，对细胞中乙肝病毒基因组中的共价闭环 DNA 和内源性靶点 Pcsk9 的基因进行切割，降低乙肝病毒相关抗原的表达，该研究对 CRISPR/Cas9 系统的临床转化研究有重要意义。Zuris 等利用阳离子脂质体介导的递送系统<sup>[47]</sup>，将 Cre 重组酶，基于转录激活子样效应因子 (transcription activator-like effector, TALE) 和基于 Cas9 核酸酶的转录活化剂，以及 Cas9 蛋白酶与 sgRNA 核酸酶复合物递送至 10% 血清培养的人体细胞中，基因组的修改效率高达 80%。利用该递送体系将 Cre 重组酶和 Cas9 蛋白酶与 sgRNA 复合物递送至小鼠内耳，在毛细胞中实现了 90% 的 Cre 介导的重组和 20% 的 Cas9 介导的基因修饰。

##### 3.1.2 两性离子脂质体

Miller 等利用两性离子氨基脂质 (zwitterionic amino lipids, ZALs) 来递送 Cas9 核酸酶的 mRNA 和 sgRNA<sup>[48]</sup>。ZALs 包含 1 个两性离子硫代甜菜碱的头部基团，1 个多胺的连接域和疏水尾部。使用低 sgRNA 剂量的两性离子氨基脂质纳米颗粒

(zwitterionic amino lipid nanoparticle, ZNP) 即可减少细胞内 90% 的蛋白表达, 通过 ZNPs 来递送 sgRNA, 可以对 DNA 进行永久性的编辑, 并且蛋白表达量减少了 95%。ZAL 适用于长链核酸的传递, 通过 ZNP 可实现在细胞内永久地编辑 DNA, 这是非病毒载体首次成功应用于体内外 Cas9 的 mRNA 和 sgRNA 的共传递中。ZNPs 为合理设计长链 RNA 载体提供了指导, 同时有望提高基因编辑的安全性和利用率。

### 3.1.3 类脂质体

类脂质体也具有亲水、亲油性结构, 化学性质稳定, 能够包裹药物, 通过静电作用将药物递送至靶器官或靶细胞中。

研究利用一种类脂质纳米粒子<sup>[46]</sup>, 有效地将可以包裹 Cas9 核酸酶的 mRNA 以及 sgRNA 递送至小鼠的肝脏中。由于小鼠 Cas9 核酸酶的 mRNA 和 sgRNA 在 1 d 内就会分解, 这种递送方式提供了一种临时可控的体内基因编辑方法。类脂质体纳米粒子介导的 CRISPR/Cas9 递送系统有望用于治疗多种与肝相关的疾病。Wang 等利用生物还原性脂质纳米粒子高效地传递基因组编辑蛋白<sup>[49]</sup>。生物还原性脂质纳米粒子是一种类脂质的纳米粒子, 将生物还原性的纳米脂质粒子与负电荷的 Cre 重组酶或阴离子型的 Cas9-sgRNA 结合形成复合物, 使得纳米颗粒通过静电作用聚集, 进而有效地促进蛋白质递送和基因编辑, 基因重组和基因编辑的效率超过 70%。这些生物还原性脂质能够有效地将蛋白质递送至细胞内, 促进蛋白质从细胞核中逃逸, 以响应细胞内还原性环境。

一些阳离子脂质体, 如 (2,3- 二油氧基丙基)-三甲基氯化铵 (DOTAP)、*N*-[1-(2,3- 二油酰氯)-丙基]-*N,N,N-* 氯化三甲铵 (DOTMA)、精胺-5-羧基-氨基乙酸二十八烷基-酰胺 (DOGS) 等, 具有可自然降解的优点, 但其稳定性较低, 转染效率也较低, 可以通过羟乙基、胆固醇、丁二炔等基团进行修饰<sup>[50-51]</sup>, 来提高转染的效率。通过对各种载体材料进行改造, 更多的材料可用于 CRISPR 递送系统中。

## 3.2 聚合物

聚合物载体通过静电作用来递送药物至靶细胞, 达到治疗效果。聚合物载体易合成、安全、无免疫原性, 广泛应用于药物递送中。

Kang 等利用聚合物载体来递送 CRISPR/Cas9 基因组编辑材料<sup>[52]</sup>, 通过阳离子聚合物对蛋白质进行共价修饰, 以供后续与抗生素耐药性 sgRNA 络合, 诱导 DNA 双链裂解。CRISPR 纳米复合物以 *mecA* 基因为目标, 通过聚合物载体可以有效递送至耐甲氧西林金黄色葡萄球菌中, 并且对细菌基因进行编辑, 与传统的基于脂质体的递送方式相比, 该载体具有更高的效率。Sun 等构建了一种由 DNA 链聚合组成的纳米线团 (nanoclew)<sup>[53]</sup>。通过该纳米线团将复合物递送至人体细胞核中, 这样能在维持细胞活力的同时将靶基因破坏。纳米线团具有一定的生物相容性, 而且与其他合成性材料制成的药物运输系统相比, 对人体的毒性较低。这种新型技术可以携带药物并靶向作用于肿瘤细胞, 携带一定的抗肿瘤药物在细胞中释放并发挥作用, 可为肿瘤等疾病的治疗提供参考。

对于聚合物载体, 如聚乙烯亚胺 (polyethylenimine, PEI)、多聚赖氨酸 [poly(L-lysine), PLL]、甲基丙烯酸二甲氨基乙酯 (poly[2-(dimethylamino) ethyl methacrylate], PDMAEMA) 和聚酰胺 (polyamidoamine, PAMAM) (结构见图4), 容易被合成与改性, 在传统的基因治疗中也得到了广泛的应用。如 PEI, 有线型和分支型 2 种, 由于其电荷密度高, 与核酸具有很强的静电交互作用, 且具有“质子海绵”的性质, 所以转染效率高。但聚合物载体通常相对分子质量较大, 毒性也随之升高, 一般可以通过聚乙二醇或疏水基团的修饰来进行改良<sup>[54]</sup>。壳聚糖是一种生物可降解的高分子聚合物, 具有良好的生物相容性和生物降解能力, 且无毒性, 但其转染效率不高, 一般通过与 5β-胆汁酸、脱氧胆酸和硬脂酸结合, 来增加壳聚糖与细胞表面的交互作用, 进而提升其转染效率<sup>[55-57]</sup>。

### 3.3 无机纳米粒子

无机纳米粒子将药物或生物分子包裹在其中,

通过内吞作用穿过细胞膜，将药物递送至生物体中并释放，进而达到治疗疾病的目的<sup>[58]</sup>。无机纳米颗粒作为基因载体能包裹、浓缩、并保护核酸避免核酸酶的降解，几乎无毒性，制备简易，保存方便，比表面积大，具有良好的生物相容性和可降解性，且稳定性好，通过表面修饰不仅能够提高转染的效率，还能在很大程度上降低某些纳米粒子的毒性。无机纳米粒子作为载体具有广阔的应用前景<sup>[59]</sup>。

由于金纳米粒子的光学性质依赖于粒子的形状、尺寸等，表面的化学性质易于修饰，具有较大的比表面积，所以金纳米粒子是药物递送有效的平台<sup>[60]</sup>。Wang 等利用金纳米颗粒的光热性能<sup>[61]</sup>，设计了一种基于金纳米颗粒并结合脂质体的多功能载体，在激光辐照下，金纳米颗粒作为光热释放剂可释放出 CRISPR 质粒，敲除肿瘤靶向基因 *Plk-1*，达到抑制肿瘤的目的。Mout 等构建了基于金纳米粒子的 CRISPR 递送体系<sup>[62]</sup>。使用精氨酸金纳米颗粒将 Cas9 蛋白质和 sgRNA 设计成纳米聚合物，构建出特殊的递送体系，能够携带 Cas9 蛋白以及 sgRNA 同细胞膜接触并且融合，最终将 Cas9 和 sgRNA 直接释放到细胞质中。该方法的传递效率达

90%以上，编辑效率可达30%。

#### 4 展望

CRISPR 基因编辑技术作为一种生物技术工具在基因治疗中得到了广泛的应用，并且在临床应用上具有很大的潜力。但 CRISPR 技术的特异性还有待提升，由脱靶效应带来的问题也不容忽视。此外，迄今为止通过同源重组路径的完整基因的替换效率较低，离实际的临床应用还较远。但不管怎样，CRISPR 基因编辑技术在治疗先天性疾病和肿瘤方面的潜力不容小觑<sup>[63]</sup>。相信随着研究的不断深入，这项技术会在各类疾病中发挥出巨大的作用。

CRISPR 药物递送系统在 CRISPR 基因治疗中起着至关重要的作用，它有效地增强了 CRISPR 系统的稳定性、细胞靶向性和治疗效果。随着 CRISPR 药物递送系统的不断深入研究，现已取得很大的进展。物理方法虽然简单高效，但在体内递送时受限，更适用于体外递送；病毒载体转染效率高，但是具有安全性问题，且其装载能力有限，不适用于大规模的生产，可以去除载体中非必需的病毒基因来减轻细胞毒性，或者构建能够自我灭活的病毒载体来提高载体的安全性；非病毒载体的毒性

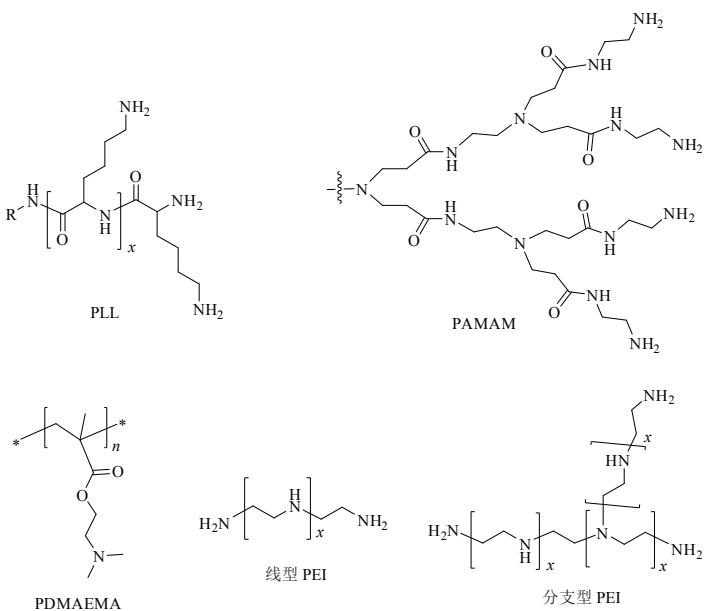


图 4 聚合物载体 PLL、PAMAM、PDMAEMA 和 PEI 的化学结构

Fig.4 Chemical Structures of Polymeric Vectors: PLL, PAMAM , PDMAEMA and PEI

低、具有低致免疫性，且易于组装，潜力最大，但递送效率较低，可以通过多肽、糖类等物质的修饰增强载体的靶向性，实现药物富集和提高药物递送效率的目的。这些递送方式优缺点兼具，可以通过设计一种结合病毒载体和非病毒载体的联合载体，兼具两类载体的优点。例如，Yin 等利用腺相关病毒载体递送 sgRNA<sup>[64]</sup>，利用脂质体材料递送 Cas9 蛋白酶的 RNA，这 2 种载体联合递送至肝损伤小鼠模型中，减轻了小鼠肝脏受损病症，而且 CRISPR 脱靶率也有所降低，表明病毒载体和非病毒载体联合使用是递送 CRISPR 系统组分的有效方式，利用这一思路可能开发出简便、高效的新型递送系统，成为未来 CRISPR 系统递送研究中的研究热点。

随着研究的不断深入，既可以通过不同的方法对各种载体进行修饰，增加载体的递送效率，减轻其毒性，也可以开发出更多的新型载体，如石墨烯、金属有机骨架材料 (metal-organic frameworks, MOFs) 等，用于 CRISPR 系统组分的递送研究中。石墨烯材料生物相容性好，易于修饰，载药率高，通过对石墨烯表面进行修饰，使其富含羟基、羧基等基团，具有特定的性能并应用于 Cas9 蛋白酶和 sgRNA 的递送中。MOFs 材料具有密度小、比表面积大、载药率高的优良性能，在药物载体上具有很大的潜力，可以通过基团的修饰降低载体毒性，达到药物缓释的效果。

## 参考文献：

- [1] 邓洪新, 田 聰, 魏于全. 基因治疗的发展现状、问题和展望 [J]. 生命科学, 2005, 17(3): 196-199.
- [2] WEI C, LIU J, YU Z, et al. TALEN or Cas9-rapid, efficient and specific choices for genome modifications [J]. *J Genet Genomics*, 2013, 40(6): 281-289.
- [3] 曾敏慧, 蒋满波, 蔡柳洪. ZFNs 和 TALENs 在基因修饰中的应用比较 [J]. 国际遗传学杂志, 2013, 36(6): 257-260.
- [4] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823.
- [5] MARRAFFINI L A, SONTHEIMER E J. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea [J]. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(3): 181-190.
- [6] HORVATH P, BARRANGOU R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea [J]. *Science*, 2010, 327(5962): 167-170.
- [7] HOU Z, ZHANG Y, PROPSON N E, et al. Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(39): 15644-15649.
- [8] 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.
- [9] CHO S W, KIM S, KIM J M, et al. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 230-232.
- [10] JINEK M, EAST A, CHENG A, et al. RNA-programmed genome editing in human cells [J]. *Elife*, 2013, 2: e00471.
- [11] DOUDNA J A, CHARPENTIER E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 [J]. *Science*, 2014, 346(6213): 1258096.
- [12] WILES M V, QIN W, CHENG A W, et al. CRISPR-Cas9-mediated genome editing and guide RNA design [J]. *Mamm Genome*, 2015, 26(9-10): 501-510.
- [13] CHEN Z H, YU Y P, ZUO Z H, et al. Targeting genomic rearrangements in tumor cells through Cas9-mediated insertion of a suicide gene [J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(6): 543-550.
- [14] YIN C, ZHANG T, QU X, et al. In vivo excision of HIV-1 provirus by saCas9 and multiplex single-guide RNAs in animal models [J]. *Mol Ther*, 2017, 25(5): 1168-1186.
- [15] BASU S, ADAMS L, GUHATHAKURTA S, et al. A novel tool for monitoring endogenous alpha-synuclein transcription by NanoLuciferase tag insertion at the 3'end using CRISPR-Cas9 genome editing technique [J]. *Sci Rep*, 2017, 8: 45883.
- [16] YANG S, CHANG R, YANG H, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing ameliorates neurotoxicity in mouse model of Huntington's disease [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(7): 2719-2724.
- [17] HAN X, LIU Z, JO M C, et al. CRISPR-Cas9 delivery to hard-to-transfect cells via membrane deformation [J]. *Sci Adv*, 2015, 1(7): e1500454.
- [18] 姚陈果, 孙才新, 米 彦, 等. 细胞膜电穿孔及其肿瘤治疗的研究 [J]. 高电压技术, 2004, 30(1): 45-47.

- [19] GORI J L, HSU P D, MAEDER M L, et al. Delivery and specificity of CRISPR-Cas9 genome editing technologies for human gene therapy [J]. *Hum Gene Ther*, 2015, **26**(7): 443-451.
- [20] HASHIMOTO M, TAKEMOTO T. Electroporation enables the efficient mRNA delivery into the mouse zygotes and facilitates CRISPR/Cas9-based genome editing [J]. *Sci Rep*, 2015, **5**: 11315.
- [21] KANEKO T, SAKUMA T, YAMAMOTO T, et al. Simple knockout by electroporation of engineered endonucleases into intact rat embryos [J]. *Sci Rep*, 2014, **4**(4): 6382.
- [22] LATTELLA M C, DI SALVO M T, COCCHIARELLA F, et al. *In vivo* editing of the human mutant rhodopsin gene by electroporation of plasmid-based CRISPR/Cas9 in the mouse retina [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2016, **5**(11): e389.
- [23] YIN H, XUE W, CHEN S, et al. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, **32**(6): 551-553.
- [24] XUE W, CHEN S, YIN H, et al. CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver [J]. *Nature*, 2014, **514**(7522): 380-384.
- [25] LI L, HE Z Y, WEI X W, et al. Challenges in CRISPR/CAS9 delivery: potential roles of nonviral vectors [J]. *Hum Gene Ther*, 2015, **26**(7): 452-462.
- [26] 刘阳. 腺病毒载体的研究进展[J]. 转化医学杂志, 2004, 8(4): 1282-1286.
- [27] CHENG R, PENG J, YAN Y, et al. Efficient gene editing in adult mouse livers via adenoviral delivery of CRISPR/Cas9 [J]. *FEBS Lett*, 2014, **588**(21): 3954-3958.
- [28] MAGGIO I, HOLKERS M, LIU J, et al. Adenoviral vector delivery of RNA-guided CRISPR/Cas9 nuclease complexes induces targeted mutagenesis in a diverse array of human cells [J]. *Sci Rep*, 2014, **4**(2): 5105.
- [29] 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.
- [30] 王毅刚, 黄芳, 蔡荣, 等. 腺相关病毒载体的靶向策略探讨[J]. 科学通报, 2007, **52**(10): 1107-1115.
- [31] RAN F A, CONG L, YAN W X, et al. *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9 [J]. *Nature*, 2015, **520**(7546): 186-191.
- [32] KAULICH M, LEE Y J, LÖNN P, et al. Efficient CRISPR- rAAV engineering of endogenous genes to study protein function by allele-specific RNAi [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, **43**(7): e45.
- [33] YU W, MOOKHERJEE S, CHAITANKAR V, et al. Nrl knockdown by AAV-delivered CRISPR/Cas9 prevents retinal degeneration in mice [J]. *Nat Commun*, 2017, **8**: 14716.
- [34] 王淑艳, 张愚. 慢病毒载体的设计及应用进展[J]. 中国生物工程杂志, 2006, **26**(11): 70-75.
- [35] KABADI A M, OUSTEROUT D G, HILTON I B, et al. Multiplex CRISPR/Cas9-based genome engineering from a single lentiviral vector [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, **42**(19): e147.
- [36] HECKL D, KOWALCZYK M S, YUDOVICH D, et al. Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, **32**(9): 941-946.
- [37] WANG T, WEI J J, SABATINI D M, et al. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system [J]. *Science*, 2014, **343**(6166): 80-84.
- [38] WANG X, WANG Y, WU X, et al. Unbiased detection of off-target cleavage by CRISPR-Cas9 and TALENs using integrase-defective lentiviral vectors [J]. *Nat Biotechnol*, 2015, **33**(2): 175-178.
- [39] SUN J Y, ANAND-JAWA V, CHATTERJEE S, et al. Immune responses to adeno-associated virus and its recombinant vectors [J]. *Gene Ther*, 2003, **10**(11): 964-976.
- [40] 高明, 国力, 敖越, 等. 脂质体载体的应用研究进展[J]. 沈阳农业大学学报, 2002, **33**(4): 315-318.
- [41] SONG M. The CRISPR/Cas9 system: their delivery, *in vivo* and *ex vivo* applications and clinical development by startups [J]. *Biotechnol Prog*, 2017, **33**(4): 1035-1045.
- [42] 李燕, 阳俊, 刘桂英, 等. 基因治疗药物输递系统的研究现状及发展趋势[J]. 生物化学与生物物理进展, 2013, **40**(10): 998-1007.
- [43] MINTZER M A, SIMANEK E E. Nonviral vectors for gene delivery [J]. *Chem Rev*, 2009, **109**(2): 259-302.
- [44] ZURIS J A, THOMPSON D B, SHU Y, et al. Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing *in vitro* and *in vivo* [J]. *Nat Biotechnol*, 2015, **33**(1): 73-80.
- [45] LIN Y, WU J, GU W, et al. Exosome-liposome hybrid nanoparticles deliver CRISPR/Cas9 system in MSCs [J].

- Adv Sci (Weinh)*, 2018, **5**(4): 1700611.
- [46] JIANG C, MEI M, LI B, et al. A non-viral CRISPR/Cas9 delivery system for therapeutic gene targeting HBV DNA and pesk9 *in vivo* [J]. *Cell Res*, 2017, **27**(3): 440-443.
- [47] ZURIS JA, THOMPSON D B, SHU Y, et al. Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing *in vitro* and *in vivo* [J]. *Nat Biotechnol*, 2015, **33**(1): 73-80.
- [48] MILLER J B, ZHANG S, KOS P, et al. Non-viral CRISPR/Cas gene editing *in vitro* and *in vivo* enabled by synthetic nanoparticle co-delivery of Cas9 mRNA and sgRNA [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2017, **56**(4): 1059-1063.
- [49] WANG M, ZURIS J A, MENG F, et al. Efficient delivery of genome-editing proteins using bioreducible lipid nanoparticles [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, **113**(11): 2868-2873.
- [50] YOSHIMURA T, HASEGAWA S, HIRASHIMA N, et al. Anchoring and bola cationic amphiphiles for nucleotide delivery. Effects of orientation and extension of hydrophobic regions [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2001, **11**(22): 2897-2901.
- [51] KISH P E, TSUME Y, KIJEK P, et al. Bile acid-oligopeptide conjugates interact with DNA and facilitate transfection [J]. *Mol Pharm*, 2007, **4**(1): 95-103.
- [52] KANG Y K, KWON K, RYU J S, et al. Nonviral genome editing based on a polymer-derivatized CRISPR nanocomplex for targeting bacterial pathogens and antibiotic resistance [J]. *Bioconjug Chem*, 2017, **28**(4): 957-967.
- [53] SUN W, JI W, HALL J M, 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.
- [54] NEU M, GERMERSHAUS O, BEHE M, et al. Bioreversibly crosslinked polyplexes of PEI and high molecular weight PEG show extended circulation times *in vivo* [J]. *J Control Release*, 2007, **124**(2): 69-80.
- [55] HU F Q, ZHAO M D, YUAN H, et al. A novel chitosan oligosaccharide-stearic acid micelles for gene delivery: properties and *in vitro* transfection studies [J]. *Int J Pharm*, 2006, **315**(1-2): 158-166.
- [56] KIM Y H, GIHM S H, PARK C R, et al. Structural characteristics of size-controlled self-aggregates of deoxycholic acid-modified chitosan and their application as a DNA delivery carrier [J]. *Bioconjug Chem*, 2001, **12**(6): 932-938.
- [57] LIU W G, ZHANG X, SUN S J, et al. N-alkylated chitosan as a potential nonviral vector for gene transfection [J]. *Bioconjug Chem*, 2003, **14**(4): 782-789.
- [58] CASTELLANA E T, CREMER P S. Solid supported lipid bilayers: from biophysical studies to sensor design [J]. *Surf Sci Rep*, 2007, **38**(14): 429-444.
- [59] 刘珊, 刘嘉茵, 崔毓桂. 无机纳米颗粒作为非病毒基因载体的研究[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2012, **31**(2): 84-88.
- [60] DUNCAN B, KIM C, ROTELLO V M. Gold nanoparticle platforms as drug and biomacromolecule delivery systems [J]. *J Control Release*, 2010, **148**(1): 122-127.
- [61] WANG P, ZHANG L, ZHENG W, et al. Thermo-triggered release of CRISPR-Cas9 system by lipid-encapsulated gold nanoparticles for tumor therapy [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2018, **57**(6): 1491-1496.
- [62] MOUT R, RAY M, YESILBAG TONGA G Y, et al. Direct cytosolic delivery of CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein for efficient gene editing [J]. *ACS Nano*, 2017, **11**(3): 2452-2458.
- [63] OUDE BLENKE E, EVERESEN M J, MASTROBATTISTA E, et al. CRISPR-Cas9 gene editing: delivery aspects and therapeutic potential [J]. *J Control Release*, 2016, **244**(Pt B): 139-148.
- [64] YIN H, SONG C Q, DORKIN J R, et al. Therapeutic genome editing by combined viral and non-viral delivery of CRISPR system components *in vivo* [J]. *Nat Biotechnol*, 2016, **34**(3): 328-333.

## Research Status and Trends of CRISPR Delivery Systems

SHEN Jie<sup>1,2</sup>, LI Yan<sup>1</sup>, LU Zhiguo<sup>1,2</sup>, ZHANG Tianlu<sup>1</sup>, ZHANG Xin<sup>1\*</sup>

(1. National Key Lab. of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

**ABSTRACT:** CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) has emerged as a new gene editing technique. It can be used to cure cancer, AIDS, and other diseases by modifying gene accurately. Some vaccines and drugs can be exploited by CRISPR. However, there were some problems existing in gene drugs, such as instability, easy degradability and poor membrane penetrability. These problems have limited the development of CRISPR applications. So it is important to find proper vectors, which can effectively deliver drugs to target cells, and improve the efficiency and specificity of CRISPR technology. This paper focuses and summarizes the current developments in gene delivery systems of CRISPR, including the advantages and disadvantages, the current states and the future trends of viral and non-viral vectors, providing some references for the application of drug delivery system in biomedical treatments.

**Key Words:** CRISPR; vector; therapy

