

CRISPR/Cas13 递送系统优化策略及应用研究进展

贾茜然 康东周*

延边大学药学院, 吉林延吉, 133002;

摘要: 成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) / 成簇规律间隔短回文重复序列相关蛋白 (Cas) 13 技术是一种新兴的核糖核酸 (RNA) 编辑工具, 因其高特异性和灵活性, 在基因功能研究和疾病治疗领域展现出巨大潜力。然而, 递送问题仍是限制 CRISPR/Cas13 系统走向临床的主要障碍。本文全面综述了 CRISPR/Cas13 递送系统的现有优化策略, 涵盖病毒载体工程化改造、脂质体递送技术突破及新型非病毒递送体系开发。此外, 本文还讨论了其在遗传疾病治疗、抗病毒免疫增强等医学领域的应用潜力。最后, 本文展望了 CRISPR/Cas13 递送系统的未来发展方向和前景, 为开发新一代 CRISPR/Cas 递送系统提供理论支撑和参考。

关键词: 成簇规律间隔短回文重复序列; 成簇规律间隔短回文重复序列相关蛋白; 递送系统; 优化策略; 临床应用

DOI: 10. 69979/3029-2808. 25. 07. 052

成簇规律间隔短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR) / 成簇规律间隔短回文重复序列相关蛋白 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat-associated protein, Cas) 系统是原核生物特有的适应性免疫机制, 其核心功能单元由 CRISPR 基因座和 Cas 蛋白家族共同构成。CRISPR 基因座的特征性结构包含: 高度保守的重复序列与间隔序列^[1]交替排列阵列。当宿主遭遇外源入侵时, CRISPR/Cas 系统通过捕获外源脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 片段并将其整合至 CRISPR 阵列, 形成可遗传的分子记忆, 从而实现针对同源病原体的精准免疫防御^[2]。然而该技术在临床转化中仍面临三大挑战: (1) 递送载体的组织穿透效率不足导致靶向精度受限; (2) 脱靶效应可能引发非预期基因修饰; (3) 外源蛋白的持续表达可能激活宿主免疫应答。这些关键问题的突破将成为推动临床应用的核心研究方向。

相较于传统 DNA 编辑技术, CRISPR/Cas13 系统通过特异性识别并切割核糖核酸 (ribonucleic acid, RNA) 分子实现转录后调控, 该技术优势体现在: (1) 避免基因组永久性修饰, 显著降低脱靶风险; (2) 其可逆调控特性为 RNA 异常相关疾病提供更安全的解决方案。目前已在包括 RNA 病毒清除、降解乙型肝炎病毒转录产物、干预致癌非编码 RNA 抑制肿瘤进展等多个领域展现出广泛应用前景。

为实现 CRISPR/Cas13 技术的临床转化, 突破递送

系统在效率与特异性的双重限制已成为关键突破口。通过开发新型递送载体, 可同步实现在治疗效率、生物安全性与调控精准度三大维度的提升。该技术突破不仅纵向加速了从基础研究向临床转化的过程, 更横向推断了模块化递送平台建设以缩短新型疗法的研发周期, 为 RNA 靶向治疗开辟了新路径。本综述系统分析了递送系统优化的理论框架、体内递送策略及临床转化成果, 旨在为推进 CRISPR/Cas13 的临床应用提供关键理论支撑。

1 CRISPR/Cas13 的基本原理与功能特性

基因编辑技术的迅速发展使科学家能够实现 DNA 序列的精准修饰, 已在疾病机制解析与精准医疗领域等领域展现出极具潜力的发展前景。

CRISPR/Cas13 系统通过 Cas13 蛋白与向导 RNA (guide ribonucleic acid, gRNA) 的协同机制, 精准靶向 RNA。当 Cas13 蛋白特异性结合成簇规律间隔短回文重复序列 RNA (clustered regularly interspaced short palindromic repeats ribonucleic acid, crRNA) 中携带的间隔序列的信息后, 其 RNA 酶活性被激活, 从而特异性地剪切与之互补配对的 RNA 分子。这一机制不仅高效清除外源病毒 RNA (图 1), 更突破了传统 DNA 编辑工具的不可逆性限制。

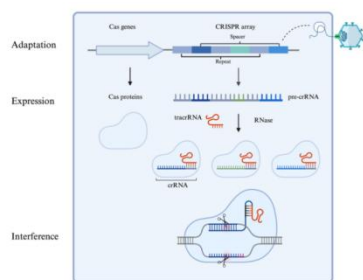


图 1. CRISPR/Cas13 的作用机制

2 CRISPR/Cas13 递送系统的优化策略

CRISPR/Cas13 作为一种 RNA 靶向型基因编辑工具，其疾病治疗方面的潜力正受到广泛关注。然而，递送系统的核心挑战，包括体内递送效率低、组织靶向精度不足、免疫原性干扰效应及作用周期短等问题，仍制约着其临床转化。以下将对目前常见的 CRISPR/Cas13 递送系统优化策略进行逐一分析。

2.1 病毒载体的优化

CRISPR/Cas 系统的病毒载体利用天然感染机制，能够实现靶向递送与精准编辑，在 CRISPR/Cas13 递送系统中占据主导地位。腺相关病毒（adeno-associated virus, AAV）和慢病毒（lentivirus, LV）因具备低整合风险及长效表达的优势，成为当前主流的病毒载体。

AAV 载体凭借其低免疫原性及长效基因表达特性，在 CRISPR/Cas 系统递送中凸显核心优势。其生命周期支持外源基因稳定整合宿主基因组中，实现 CRISPR/Cas 系统的持续表达。LV 载体具有更大的包装容量，使其更适配大尺寸 CRISPR/Cas 复合体的递送。在难转染细胞系及长期编辑需求场景中，LV 载体展现出独特价值。然而，其基因组随机整合特性可能导致插入突变风险或原癌基因激活。此外，包膜蛋白引发的免疫原性也是其临床应用首先的主要原因。未来研究需通过进一步整合位点分析与风险效益评估，深入探讨平衡编辑效能与安全性阈值。

为了提升基因编辑的精准度，研究者通过引入靶向肽或配体，使病毒载体能够更精准地靶向特定组织或细胞类型。Hamilton 等人^[3]开发的抗体标记 Cas9 包膜载体，通过识别细胞表面标志物实现多重靶向，实验显示靶细胞 β 2-微球蛋白基因（beta-2-microglobulin, B2M）基因敲除效率达 74%，证实该策略兼具精准性与普适性。

病毒载体的多维优化策略为 CRISPR/Cas13 系统的

精准递送奠定技术基础。通过衣壳蛋白工程改造以突破递送容量限制、基因组优化策略以增强编辑效能、靶向性升级以提升组织特异性以及安全性优化以降低免疫风险等措施，形成了一套系统化的技术突破路径。

2.2 脂质体递送系统的优化

脂质体凭借其磷脂双分子层结构特性，已成为 CRISPR/Cas13 递送体系的核心载体。该载体通过膜融合机制实现基因编辑工具的高效胞内递送，优异的生物相容性可显著降低免疫原性风险。

脂质体表面工程化修饰是实现精准递送和稳定性提升的核心策略。Barrera 等^[6]通过生物淘选获得 30 余种视网膜特异性序列，成功实现 mRNA 靶向递送至神经视网膜，为遗传性视网膜变性治疗提供了新方案。Musunuru 等^[4]研究显示，单次注射 CRISPR/Cas 脂质体可使灵长类动物的肝脏前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 降低 90%，血液低密度脂蛋白胆固醇降低 60%，疗效持续稳定 8 个月。

通过合理设计和功能优化，脂质体递送系统可突破组织靶向与长效表达瓶颈，为遗传病精准治疗提供技术范式。值得注意的是，脂质体的载药量和释放效率仍需进一步优化，以满足 CRISPR/Cas13 系统在不同应用场景中的需求。

3 CRISPR/Cas13 在生物医学中的应用

CRISPR/Cas13 系统作为 CRISPR 家族中靶向 RNA 的基因编辑工具，在生物医学领域展现出广阔的应用前景。在 crRNA 的引导下，Cas13 蛋白特异性识别靶标 RNA 序列，并通过其旁切活性实现信号放大。

3.1 在疾病治疗中的应用

CRISPR/Cas13 技术作为一种新兴的 RNA 编辑工具，正在基因治疗和抗病毒治疗领域开启一场革命性的变革。在基因治疗方面，CRISPR/Cas13 系统通过特异性识别并切割 RNA 分子，为治疗 RNA 异常引发的疾病开辟了新的路径。

在抗病毒治疗方面，CRISPR/Cas13 系统通过直接靶向病毒 RNA，展现出显著抗病毒潜力。Wu 等人^[5]设计了一种广谱靶向 IAV 保守区域的 CRISPR/Cas13d 系统，并通过模拟流感病毒血凝素功能的肽修饰脂质纳米颗粒，构建了唾液酸受体靶向递送体系。该药物使感染小鼠肺部病毒载量下降了 $2.37 \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，同时实现了 10

0%的存活率，证实了靶向递送系统在提升治疗效果中的关键作用。这些突破性进展表明，CRISPR/Cas13 系统正在推动抗病毒治疗向精准化、高效化方向实现跨越式发展。

CRISPR/Cas13 系统正加速突破基因治疗与抗病毒治疗的技术边界。随着递送载体与靶向策略的持续优化，该系统有望发展为兼具高效性与安全性的下一代精准治疗工具。未来，研究者可整合人工智能、合成生物学等多学科前沿技术，构建智能化递送平台，以突破临床转化的瓶颈^[4]。

3.2 在检测中的应用

在全球公共卫生领域，病毒感染的快速诊断仍然是一个重大挑战。传统聚合酶链式反应（polymerase chain reaction, PCR）与抗原检测技术存在检测周期长、依赖专业设备、和灵敏度不足等问题，难以满足突发疫情时的即时筛查需求。相比之下，基于 CRISPR/Cas13 系统的分子诊断工具，利用其 RNA 靶向识别与级联信号放大的双重优势，正推动诊断技术向高灵敏和便携化方向发展。该体系直接识别病毒 RNA 的特异性序列，在无复杂仪器的条件下实现快速检测。其单分子级灵敏度为早期感染筛查提供了一种突破性解决方案。

CRISPR/Cas13 系统在 RNA 病毒检测领域展现出巨大潜力，可特异性识别病毒 RNA 序列，实现快速精准检测。Freije 等人^[6]研究证实，CRISPR/Cas13 系统可高效切割多种病毒的 RNA 基因组，并构建出“检测-治疗”同步化技术平台，为病毒感染的快速筛查和靶向治疗提供了创新工具。为开发高灵敏度，强特异性和快速现场检测的病原体诊断工具提供了创新方案。

总之，CRISPR/Cas13 系统在疾病诊断领域展现出广阔应用前景，其基于 RNA 靶向识别的检测机制在病毒快速筛查与精准诊断中具有核心价值。通过整合靶向配体或响应性材料设计多功能递送系统，可显著提升靶向递送效率与系统稳定性，为临床转化提供关键技术支撑。下一步应融合多学科技术优势，开发新型递送体系及诊断平台，加速推动 CRISPR/Cas13 技术向临床诊断场景的高效转化。

4 结语

本文深入剖析了 CRISPR/Cas 系统的作用机制及其递送瓶颈，并系统总结了现有递送载体的工程化改造策略和临床应用进展，旨在为后续研究提供重要参考。未来研究应着重阐明递送系统的体内的代谢规律及长期毒性风险。开发可降解递送材料能够有效防止体内长期蓄积，从而降低潜在安全风险；同时，结合基因组工程技术开发具备自调控功能的递送系统，使其在完成编辑任务后能够自动失活，将进一步提升生物安全性。

参考文献

- [1]VAN DER OOST J, WESTRA E R, JACKSON R N, et al. Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2014, 12(7): 479-92.
- [2]JIANG F, DOUDNA J A. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms [J]. *Annu Rev Biophys*, 2017, 46: 505-29.
- [3]HAMILTON J R, CHEN E, PEREZ B S, et al. In vivo human T cell engineering with enveloped delivery vehicles [J]. *Nat Biotechnol*, 2024, 42(11): 1684-92.
- [4]MUSUNURU K, CHADWICK A C, MIZOGUCHI T, et al. In vivo CRISPR base editing of PCSK9 durably lowers cholesterol in primates [J]. *Nature*, 2021, 593(7859): 429-34.
- [5]WU Z, ZHAO C, AI H, et al. A Susceptible Cell-Selective Delivery (SCSD) of mRNA-Encoded Cas13d Against Influenza Infection [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2025, 12(9): e2414651.
- [6]FREIJE C A, MYHRVOLD C, BOEHM C K, et al. Programmable Inhibition and Detection of RNA Viruses Using Cas13 [J]. *Mol Cell*, 2019, 76(5): 826-37. e11.

作者简介：贾茜然，1999.09，女，汉族，中国吉林，硕士研究生，研究方向：基因编辑技术在抗病毒中的应用。