CRISPR/Cas9 基因编辑技术在脑科学中的技术优化进展及在中医药领域应用

邓硕秋¹, 瞿水清^{1,2}, 张雨^{1,2}, 杨源民^{1,2}, 郑钟原^{1,2}, 刘拓^{1,2}, 陈利娜^{1,2*}, 李玉洁^{1*}

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 中国中医科学院青蒿素研究中心, 北京 100700)

[摘要] 成簇规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)/CRISPR 相关蛋白(CRISPR/Cas9)是在细菌和古细菌中发现的一种自身防御系统,根据其原理可实现定向基因编辑,因其普适、高效、简便的特点,已为多个领域的疾病病理机制、预防或治疗等提供了良好的技术支持。脑血管疾病和神经系统疾病严重危害人类健康,卒中由遗传、不良生活习惯、慢性疾病等因素相关。脑组织结构复杂,细胞类型多样,普适的基因编辑平台较难安全、特异和高效地对靶基因进行研究。学者们不断改进和优化基因编辑技术,发掘了基因编辑技术的潜力和研究方法,推动了脑科学的研究进程。该文在简介 CRISPR/Cas9 技术原理的基础上,主要从递送方式、腺相关病毒组装、纳米新材料等方面综述了其在脑和神经科学领域中的系统优化进展,从血管稳态、小胶质细胞稳态、血管形成、血脑屏障、药物筛选等方面总结了其在脑血管研究和中风等相关疾病中的应用,并对其在中医药领域的发展进行了展望,以期对相关研究设计提供参考。

[关键词] 成簇规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)/CRISPR 相关蛋白(CRISPR/Cas9); 基因编辑; 脑科学; 中药

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R284;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)01-0169-12

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221803

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220919.1448.001.html>

[网络出版日期] 2022-09-19 20:09

Optimized CRISPR/Cas9 System in Brain Science and Application Prospects in Field of Traditional Chinese Medicine

DENG Shuoqiu¹, QU Shuiqing^{1,2}, ZHANG Yu^{1,2}, YANG Yuanmin^{1,2}, ZHENG Zhongyuan^{1,2},
LIU Tuo^{1,2}, CHEN Lina^{1,2*}, LI Yujie^{1*}

(1. *Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China*; 2. *Artemisinin Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China*)

[Abstract] Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR associated nuclease 9 (CRISPR/Cas9) is a self-defense system found in bacteria and archaea that enables targeted gene editing based on the principle. Due to its universality, efficiency, and simplicity, CRISPR/Cas9 has been applied in the pathological mechanism and prevention and treatment of diseases in many fields. Cerebrovascular diseases and central nervous system diseases seriously endanger human health. Stroke is related to genetics, unhealthy living habits, chronic diseases, and other factors. The brain tissue structure is complex and the cell types are diverse. It is difficult for a universal gene editing platform to study target genes safely, specifically, and efficiently. Scholars have continuously improved and optimized gene editing technology, explored the

[收稿日期] 2022-06-27

[基金项目] 中国中医科学院科技创新项目(CI2021B015);中国中医科学院创新基金项目(CI2021A04611,CI2021A05106)

[第一作者] 邓硕秋,在读硕士,从事中药学、心血管药理学研究,E-mail:dengshuoqiu98@163.com

[通信作者] *李玉洁,研究员,从事中药学、心血管药理学研究,Tel:010-64097152,E-mail:yjli@icmm.ac.cn;

*陈利娜,助理研究员,从事青蒿素及其衍生物、脑型疟相关研究,E-mail:lnchen@icmm.ac.cn

potential and research methods of gene editing technology, and promoted the research process of brain science. After a brief introduction to the mechanism of CRISPR/Cas9, this paper mainly summarized the optimization of the system in the fields of cerebral science including delivery methods, adeno-associated virus assembly, and new nanomaterials. Its application in cerebrovascular research including vascular homeostasis, microglial homeostasis, angiogenesis, blood-brain barrier, and drug screening was also summarized. Finally, this paper prospected the development of CRISPR/Cas9 in traditional Chinese medicine, hoping to provide references for related research design.

[Keywords] clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR associated nuclease 9 (CRISPR/Cas9); gene editing; brain science; traditional Chinese medicine

近年来,基因编辑技术飞速发展,成簇规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)/CRISPR相关蛋白(CRISPR/Cas9)成为继一代基因编辑技术锌指核酸酶(ZFNs)和第二代基因编辑技术转录激活因子样效应物核酸酶(TALENs)^[1]后的第三代“基因组定点编辑技术”,曾列入《科学》杂志2013年年度十大科技进展。该技术迅速地崛起和发展,使科学家们得以简便、高效地对各种类型的细胞和生物的任何基因进行编辑,引发了生物医学研究的革命^[2]。借助CRISPR/Cas9系统可深入研究疾病的发病机制,对病理过程中的关键基因进行功能鉴定,建立动物模型,为药物筛选提供平台,为临床干预和治疗提供参考。

缺血性中风、阿尔兹海默症等严重的脑部疾病在我国拥有庞大的患病人群,脑部疾病发病率高、死亡率高、预后不良,对人类健康造成了极大的威胁。由于脑组织结构复杂,细胞多样,给研究带来了极大的挑战,在脑科学领域中,学者们不断地改进和优化基因编辑技术,发掘了基因编辑技术的潜力和研究方法,推动了脑科学的研究进程。

1 CRISPR/Cas9技术概述

1.1 CRISPR/Cas9系统的来源 学者在细菌和古细菌中发现一种抵御外源物质入侵的免疫防御系统,由CRISPR序列和Cas相关蛋白(Cas)组成,其中CRISPR序列最早于1987年在大肠埃希菌中被发现并于2002年正式命名^[3]。细菌和古细菌中的CRISPR/Cas系统主要有3种类型^[4],其中II型CRISPR系统以单个Cas蛋白靶向单一的DNA序列,组成较为简单,具有理想的基因编辑特性,目前已广泛应用于科学研究。

1.2 CRISPR/Cas9系统的组成 CRISPR/Cas9系统由成簇规律间隔的短回文重复序列核酸(crRNA)、反式激活crRNA(tracrRNA)及Cas9核酸内切酶3个基本部分发挥功能^[5]。tracrRNA与

crRNA碱基互补配对形成嵌合RNA(tracrRNA-crRNA),在不断的优化后,tracrRNA-crRNA目前已被简化为可以被相对简单地设计并合成的单链导向RNA(sgRNA)^[4],通过改变sgRNA序列即可实现对不同目的基因的编辑。因此,CRISPR/Cas9系统可简化为Cas9蛋白、sgRNA两个部分。

1.3 CRISPR/Cas9系统的工作原理 tracrRNA与Cas蛋白形成复合物并识别目的DNA上的NGG序列,即前间区序列邻近基序(PAM)位点,crRNA可与目的DNA序列碱基互补配对,tracrRNA引导Cas蛋白复合物结合到指定位点上切割使靶基因的双链DNA断裂(DSB),随后细胞通过非同源末端连接(NHEJ)或同源重组(HR)进行DNA修复。其中,真核细胞对断裂区域进行修复的主要方式是NHEJ,但在此过程中常形成随机的碱基插入或缺失(indel),发生错义、移码突变等严重突变,进而导致蛋白无法被翻译,从而实现基因敲除;HR过程是细胞中更为精准的修复方式,在提供外源DNA片段后,外源片段可与DSB处的末端结合并进行替换和修复,从而实现定点突变、基因敲入等^[6]。

2 脑和神经科学研究中CRISPR/Cas9技术体系的优化

在基因水平上认识疾病并注释关键基因的生物功能对脑与神经科学领域的发展具有重要意义,但由于脑部结构复杂精微,结构性遗传修饰经常发生,基因编辑通常是致命或无效的,且递送系统在生物体内的工作效率也有待商榷。因此,选择适宜的基因编辑时间、递送方法和递送体系可以实现基因编辑技术的高效进行,现已有多种优化体系,可供不同目的和思路的研究进行选择。

2.1 选择适宜的递送方式 将Cas9和sgRNA两种功能组分导入细胞内可实现基因编辑,由于细胞和生物体具有多层细胞膜和多道屏障系统,递送载体和递送方式的选择十分关键。

在脑和神经元研究中通常借助子宫内电穿孔^[7-8]、直接 Cas9 蛋白输注^[9]、病毒介导等递送技术,其中病毒介导的神经元转导应用较为广泛,通常应用于基因敲低或激活^[10],体内研究中,对干细胞或类器官^[11]和不同阶段的生命体进行基因编辑时常使用不同的递送载体和适当的递送方式^[12],

CRISPR/Cas9 技术在脑和神经科学领域常用的递送系统见表1。体外的基因编辑研究中靶细胞多选择人或大鼠、小鼠的原代细胞,借助电转或慢病毒进行转染,以研究神经保护等生物功能。研究中通常以体内实验为基础,通过体外 *in vivo* 或 *ex vivo* 实验验证并进行深入的机制研究。

表1 CRISPR/Cas9 技术在脑和神经科学领域常用的递送系统

Table 1 CRISPR/Cas9-based delivery systems commonly used in brain and neuroscience research

阶段	目标	系统	递送技术	成本	优势	不足	参考文献
受精卵	受精卵	Cas9-gRNA	显微注射	较高	“金标准”,广泛应用于动物模型研究	需大剂量 Cas9-gRNA 复合 [13] 物;技术要求高,通量低,胚胎存活率差	
	受精卵	Cas9/sgRNA RNP	电转	高	与微注射相比成本较低,编辑通量高;可避免注射引起的损伤,提高胚胎存活率	需要特殊设备;较为低效	[14-15]
胚胎	母鼠子宫内幼鼠的特定脑区	gRNA 和 Cas9 整合到同一个质粒表达系统	电转	低	准确、高效;可以用来编辑高级哺乳动物大脑基因组	可能存在免疫反应性	[16]
成年	特定脑区	AAV 分别单独包装 gRNA 和 Cas9	立体定位注射	低	快速高效低毒;系统可通过优化提高神经元特异性	递送体系装载能力较低	[20]
	靶向皮层和纹状体神经元	AAV-PHP.eB 和 AAV-PHP.S	静脉注射	较低	高效、非侵入性;可通过联合其他材料提高目的器官的靶向性;降低病毒引起不良反应的风险	目前暂无报道	[18]

2.2 优化腺相关病毒以扩大应用范围 体内编辑神经元基因组可研究哺乳动物大脑中基因的功能,传统上研究依赖于过表达载体^[19]、转基因动物模型^[20]和 RNA 干扰^[21]等敲除方法,但这些技术存在不足,如不能操纵内源基因位点,动物模型通常昂贵耗时,通常一次只能编辑一个目的基因。如果在整个生物体内敲除基因,通常会导致胚胎致死,因此亟需使用 CRISPR/Cas9 系统实现器官特异性基因敲除。由于大脑结构特殊、神经元具有区域特异性等特点,学者们对于脑和神经元研究的 CRISPR 系统进行了优化,如修改慢病毒兼容骨架、优化腺相关病毒载体、融合纳米材料构建新型递送载体等。慢病毒骨架已广泛应用于 CRISPR/Cas9 系统的体内外递送,但致癌风险大、装载容量小等不足限制了其在神经和脑科学中的应用,经过学者们的优化更好地用于脑科学中神经元靶向性研究和甲基化靶向编辑等方向。科研人员还通过对腺相关病毒进行优化,实现了在多种动物种属、多种细胞、特定神经元中进行特异性、高趋向性、可诱导的基因编辑。

2.2.1 扩大转基因动物体系 虽然转基因小鼠在生物医学科学中被广泛使用,但大鼠仍然是行为神经科学中的首选研究对象,以腺相关病毒为载体的

CRISPR 系统运用已于大鼠转基因研究,显著改善了其基因组修饰的局限性,已有大量研究成功构建了基因编辑大鼠^[22]。如 BÄCK 等^[23]基于野生型大鼠使用表达 Cas9 和 gRNA 的腺相关病毒(AAV)载体实现了酪氨酸羟化酶的敲除,随后将 CRISPR/Cas9 特异性靶向多巴胺能神经元,创建了用于 Cre (Cre-expressing) 依赖性 gRNA 表达的 AAV 载体以及 3 个新转基因大鼠系。另有报道在哺乳动物大脑中实现基因编辑^[24]。

2.2.2 提高神经元特异性和靶向性 同一脑区中的神经元集合在解剖学或功能上分为不同的亚群,因此需要在特定的神经元中进行稳定、高效的基因编辑。

SUN 等^[25]开发了 CRISPR-SaCas9 系统,并将其与顺行/逆行 AAV 载体和活性依赖性细胞标记技术相结合,在大鼠大脑中实现了功能特异性投射和基因编辑,该系统的高效性和特异性可广泛应用于神经回路研究。

HARRIS 等^[20]设计了一个双载体系统,即将 SpCas9 (AAV-SpCas9) 和 sgRNA 序列 (AAV-SpGuide) 包装在 2 个单独的 AAV 内,并在体内靶向成年小鼠大脑中的单个基因甲基化 CpG 结合蛋白 2 (Mecp2) 及多个基因 DNA 甲基转移酶 (Dnmt) 1。

使用生化、遗传、电生理和行为读数等技术检测了基因组修饰对有丝分裂后神经元功能的影响,结果表明,AAV介导的SpCas9基因组编辑可以实现大脑中基因功能的反向遗传研究。

ZHENG等^[10]提出一种基于dCas9的CRISPR干扰(CRISPRi)体系,显示出卓越的神经元靶向特异性,可以有效沉默神经递质相关基因,并没有检测到脱靶效应。针对突触结合蛋白1(Syt1)的CRISPRi技术改变了小鼠海马齿状回的兴奋性和抑制性平衡,发现齿状回在小鼠的学习和情感过程中具有独特的调节作用,表明CRISPRi作为一种有用的工具,可用于更有针对性地研究哺乳动物大脑中基因的功能。CRISPRi系统还可用于在诱导多能人类神经元干细胞(iPSC)的中进行遗传筛选^[26]。

MURLIDHARAN等^[27]以实验室衍生的AAV嵌合体(AAV2g9)为载体单次颅内注射编码靶向精神分裂症风险基因MIR137的gRNA实现大脑特异性基因敲除,证明了AAV2g9在中枢神经系统特异性基因治疗应用中的潜在可能,神经元趋向性、分布不再受限、脱靶率低,这种合成的AAV载体在大脑中表现出强大而广泛的神经元转导,减少了胶质细胞趋向性,可成为基因沉默或编辑方式治疗神经系统疾病的平台。

有丝分裂后神经元中转基因表达困难推迟了CRISPR系统在中枢神经系统(CNS)中的应用,SAVELL等^[28]提出了一个神经元优化的CRISPR/dCas9激活(CRISPRah)系统,以涉及突触可塑性、学习和记忆的脑源性神经营养因子(BDNF)中的单个转录启动子为靶基因,在成年大鼠大脑的前额叶皮层(PFC)、海马和伏隔核中进行的体内实验验证了该系统的可行性。这种神经元优化的CRISPRah系统将强大的转录激活剂与dCas9融合,通过多个sgRNA的共转导实现神经元中稳定、模块化、可控的单基因调控以及多个基因的协同调控,且适用于多个主要啮齿动物神经元培养系统。这种分子工具能够提高我们编辑脑中基因表达谱的能力,实现特异性和大规模的基因编辑,有助于阐明功能基因在神经元功能和神经精神疾病中的作用。

ZHOU等^[29]报道了一种靶向RNA的CRISPR系统—CasRx,通过病毒递送至体内后高效下调了聚嘧啶束结合蛋白1(Ptbp1),并在纹状体中诱导多巴胺能神经元形成,改善帕金森病小鼠模型的运动功能缺陷。因此,通过CasRx敲低Ptbp1加快胶质细胞转化为神经元成为一种很有前途的体内遗传

疗法,有望用于神经元丢失所致各种疾病治疗。

2.2.3 实现可诱导的基因编辑 此外,为了更好地控制基因编辑活动,并实现更高的精确度和减少诸如脱靶事件等不良结果,新兴的小分子调节剂^[30]、药物诱导型^[31]、光诱导型^[32-33]CRISPR/Cas9系统出现,主要从转录水平和翻译后水平进行时间控制和可逆性后编辑,目前已在脑部基因编辑研究中有所应用。PLOSKI团队在2016年报告了一种药物诱导型gRNA(gRNAi) AAV载体^[34],可以利用强力霉素(Dox)进行诱导,以依赖Dox的方式调节gRNAi的表达,以Dox依赖性方式在体内编辑小鼠大脑内神经元的基因组,体外和体内都可递送至细胞,通过为动物提供含有Dox的食物,可在体内诱导基因组编辑。该团队又在2018年报道了基于此诱导方法的CRISPR化脓性链球菌(Sp) Cas9系统^[35],在体内外神经元中实现了可诱导的基因组编辑。此外,该可诱导的基因编辑系统还应用于小鼠胚胎干细胞^[36],提示可用于高通量的基因筛选。另有学者提出在人类诱导的多功能干细胞(iPSC)中进行可诱导的基因编辑可研究iPSC或分化细胞中的基因功能,可以作为疾病建模研究中的通用工具^[37]。

2.2.4 实现表观遗传基因修饰的靶向编辑 表观遗传修饰的改变已在多种脑部疾病中得到证实,包括神经发育和神经退行性疾病,表观基因组编辑工具的开发能够对改变的表观遗传变化与疾病结果之间的联系进行功能剖析,研究特定甲基化事件的功能具有挑战性^[38]。

LIU等^[39]为了实现甲基化DNA的靶向编辑,将dCas9与甲基化/去甲基化途径中的酶融合,可对小鼠甲基化的DNA进行编辑,证明了10-11异位突变(Tet1)或DNA甲基转移酶(Dnmt3a)与催化失活Cas9(dCas9)的融合能够实现靶向甲基化DNA的编辑,该技术在表观遗传调控的功能研究中具有广泛的用途。并在将其应用在小鼠大脑神经元中,逆转了脆性X综合征(FXS)疾病中基因的高甲基化^[40],提示这是一种潜在治疗策略。另有KOENNING等^[41]报道通过CRISPR/Cas9纠正致病性结构域突变从而改善小鼠焦虑表现。

2.3 融合纳米材料构建新型CRISPR载体 目前,纳米粒子的引入有效提高了CRISPR/Cas9在脑组织中的特异性和高效性^[42]。LEE等^[43]提出CRISPR-Gold系统,研制了一种金纳米粒子组成的非病毒Cas9递送载体,体内递送后有效纠正了引起杜氏肌营养不良症的突变基因,且在使用剂量条件

下未检测到生物毒性。另报道基于CRISPR-Gold系统设计了针对靶向代谢型谷氨酸受体5(mGluR5)基因的体系,FXS小鼠颅内注射后纹状体中mGluR5的水平有效降低,动物过度重复行为减少^[44]。CRISPR-Gold可实现直接在体内大脑神经元、星形胶质细胞和小胶质细胞等多种主要细胞类型的递送,是一种较为理想的脑部递送载体,加速了大脑靶向疗法的开发进程,使脑靶向的基因敲除动物模型的建立进一步成为可能。由于该平台可通过Cas9核糖核蛋白的非病毒递送方式编辑成人大脑中的基因,因此该平台可以快速开发用于临床前研究的局灶性脑敲除模型。

成人大脑有丝分裂后神经元的体内基因编辑可能是治疗神经系统疾病的有效策略。PARK等^[45]开发了CRISPR/Cas9纳米复合物,并证明他们在成年小鼠大脑中有效,脱靶效应最小。在两种阿尔茨海默病小鼠模型中,使用该系统靶向 β 分泌酶1(Bace1)能够抑制 β 淀粉样蛋白(A β)相关病理和认知缺陷。这些结果拓宽了CRISPR/Cas9系统在神经退行性疾病中的潜在应用。

3 基于CRISPR/Cas9探索脑血管病理过程和药物干预机制

缺血性中风是临床常见的神经系统受损所致的急性脑血管疾病,由于血流动力学影响着血管稳态,暴露于动脉分支和分叉部位的血流紊乱会导致血管内皮的组成性激活,从而导致动脉粥样硬化^[46],继而可能诱发缺血性中风(IS)等疾病。疾病主要因脑部血液循环障碍、缺血缺氧导致的局限性脑组织缺血性坏死或软化^[47],重度致残者约占40%,认知障碍等继发病理反应成为降低中老年群体和有基础疾病患者生活能力、质量的重要不利因素,同时严重加重了家庭和社会的负担,属于威胁人类健康的三大疾病之一^[48]。最新全球疾病负担研究显示,我国总体卒中终生发病风险为39.9%,位居全球首位,缺血性卒中发病率逐年增加,其中低收入群体快速增多,性别和地域差异明显,且有年轻化趋势^[49]。在脑科学领域中,通过学者们不断地改进和优化,基因编辑技术的潜力和研究方法逐渐被发掘,基因编辑的难度和复杂程度逐渐降低,基于CRISPR/Cas9技术可更好地对缺血性脑卒中等脑血管疾病的疾病过程、基因功能鉴定等进行深入研究,还可构建基因缺陷模型以提供研究平台,见表2。

3.1 血管稳态和机械信号转导研究 生物力学

信号动态控制着主要的细胞过程,机械刺激调节主要的细胞功能并在多种人类疾病的发病中发挥关键作用,但人类遗传变异参与细胞感知和响应生物力学线索的过程仍不清楚。KRAUSE等^[50]使用遗传学方法和基于CRISPR/Cas9的基因组编辑技术,通过全基因组关联研究表明,rs17114036是一种涉及冠状动脉疾病和缺血性中风的常见多态性非编码,位于动态调节的内皮增强子中,通过转录激活重要的非编码DNA区域(增强因子)动态调节内皮细胞对动脉粥样硬化相关异常血流动力学的反应性。该结果从分子层面提供了将疾病相关基因变异与细胞力学生物学相联系的有力证据。

3.2 小胶质细胞稳态、免疫和信号传导研究

小胶质细胞可通过吞噬清除蛋白质聚集体和细胞碎片,是一种中枢神经系统中常驻的免疫细胞,在维持脑部稳态中起着举足轻重的作用^[51]。随着年龄的增长、衰老和神经退行性疾病的发生,小胶质细胞的吞噬功能降低,从而引起认知能力下降,遗传研究已将其与大脑衰老和疾病的发病机制联系起来^[52]。

PLUVINAGE等^[53]将CRISPR/Cas9与RNA测序结合以探究年龄与小胶质细胞吞噬作用的相关遗传修饰物,将一种在老化的小胶质细胞内上调的典型的B细胞受体CD22鉴定为吞噬作用的负调节因子,向中枢神经系统长期递送阻断CD22功能的抗体可使小胶质细胞重新进入稳态转录状态,老年小鼠的认知功能得以改善,阐明了小胶质细胞依赖于年龄而损伤的机制以及其在衰老大脑中恢复稳态的策略。

MARSCHALLINGER等^[54]报告了衰老的小鼠和人类脑部小胶质细胞脂滴积累并成为脂滴累积小胶质细胞(LDAM)后吞噬作用出现不同程度的缺陷,并分泌大量活性氧和促炎细胞因子。通过CRISPR/Cas9技术鉴定了脂滴形成的遗传修饰物,并开发了一种光照射选择策略,根据细胞形成脂滴的能力进行分离,筛选识别出与神经变性相关的基因作为脂滴形成的遗传调节剂,阐明了人类神经退行性疾病常染色体显性遗传形式的产生原因,从而提出LDAM有助于年龄相关和遗传形式的神经变异性。

HU等^[55]构建细胞因子信号传导抑制因子1(SOCS1)过表达质粒,并利用CRISPR/CAS9系统生成SOCS1缺陷细胞的BV-2小胶质细胞,建立氧糖剥夺/复氧(OGD/R)模型和脂多糖(LPS)诱导的炎症刺激模型,说明SOCS1在炎症条件下通过调节

表2 基于CRISPR/Cas9探索脑血管病病理过程

Table 2 Exploring pathological process of cerebrovascular disease based on CRISPR/Cas9

疾病	生物过程	目的基因	研究水平	结论	参考文献
动脉粥样硬化	内皮细胞对血流动力学的反应	rs17114036	体外:人主动脉内皮细胞(HAECs)	人类单倍型和相关顺式调节元件在细胞机械传感机制中提供了以前未被重视的调节控制层	[50]
衰老和神经退行性疾病	中枢神经系统内稳态	CD22	体外:小胶质细胞	阐明了与年龄相关的小胶质细胞损伤机制,提出了一种恢复衰老大脑内稳态的策略	[53]
中枢神经系 统内稳态	脂滴积累	6个具有导致常染色体显性神经变性形式的变异基因: SLC33A1、SNX17、VPS35、CLN3、NPC2、GRN	体外:小胶质细胞系 BV-2 细胞	发现了人类神经退行性疾病的常染色体显性遗传形式,发现脂质在小胶质细胞中的堆积会导致与年龄相关的和遗传形式的神经退化	[54]
缺血性脑卒中	炎症	细胞因子信号传导抑制因子(SOCS) 1	体外:小胶质细胞系 BV-2 细胞	SOCS1可能是缓解缺血性卒中后炎症的潜在治疗靶点	[55]
急性缺血性 脑卒中(AIS)	AIS早期应力颗粒的形成	methyltransferase-like (METTL) enzymes	体内:大鼠MCAO脑缺血模型;体内:PC12细胞	METTL3介导的m6A甲基化促进miR-335的成熟,促进应激颗粒(SG)的形成,减少受损神经元和细胞的凋亡,为AIS提供了一种潜在的治疗策略	[56]
脑缺血/再 灌注损伤	神经保护	瞬时受体电位通道(TRPC)6	体内:大鼠MCAO脑缺血/再灌注模型	TRPC6过表达的骨髓间充质干细胞可能是一种有前景的缺血性脑卒中治疗药物	[57]
AIS	细胞凋亡与神经保护	RNA结合蛋白基序3(RBM3)	体外:大鼠原代皮层神经元细胞和PC12细胞	RBM3可能是缓解细胞缺血再灌注损伤的新靶点	[58]
CNS	血脑屏障(BBB)损伤	A受体I型(ACVR1)	少突胶质细胞(OPCs)	靶向纤维蛋白原可能是促进中枢神经系统祖细胞再生潜力的一种上游治疗策略	[59]
缺血性脑卒中	BBB损伤	脑信号蛋白4D(Sema4D)	体内:大鼠MCAO脑缺血模型;体内:周皮细胞	Sema4D可能成为脑卒中急性期治疗的新靶点	[60]

活性氧(ROS)和Toll样受体4(TLR4)在OGD/R或LPS处理的细胞中发挥保护作用,表明SOCS1可作为减轻缺血性中风后炎症的潜在治疗靶点。

3.3 神经元的保护和形成研究 SI等^[56]通过质粒转染和CRISPR/Cas9技术在PC12细胞的氧糖剥夺(OGD)中实现了大鼠肾上腺髓质嗜铬瘤(PC12)细胞中甲基转移酶3(METTL3)基因敲低和过表达,发现METTL3介导的m6A甲基化增加了微小核糖核酸335(miR-335)的成熟,促进了早期应激颗粒(SG)的形成,降低了损伤神经元和细胞的凋亡水平,为急性缺血性卒中提供了潜在的治疗策略。

骨髓基质细胞(BMSCs)是一种具有增殖和多向分化潜能的细胞,可分泌一系列营养和生长因子,可在脑缺血/再灌注(I/R)后保护神经元。LI等^[57]发现基于CRISPR/Cas9的协同激活介质在BMSCs中过度表达瞬时受体电位通道(TRPC)蛋白后,I/R模型的大鼠脑损伤程度降低,表明过表达TRPC6亚家族可以保护神经元免受I/R损伤,TRPC6过表达的BMSCs可能是缺血性中风的一种有前途的治疗剂。

RNA结合蛋白基序3(RBM3)是一种敏感的冷

休克蛋白,在脑损伤条件下表现出神经保护功能,但RBM3如何通过影响应力颗粒(SGs)参与AIS尚不清楚。SI等^[58]在大鼠原代皮质神经元和PC12细胞中建立了OGD/R模型,以探讨急性I/R条件下RBM3与SG之间的潜在机制。结果显示RBM3可与GTPase激活蛋白结合蛋白1(G3BP1)结合,导致大鼠原代皮质神经元和PC12细胞在损伤6h后应激颗粒产生增加,减少细胞凋亡,此研究可能为减轻细胞I/R损伤提供一个新的目标。

缺血性卒中发生后大脑微环境的组成改变,血液来源的分子是否充当髓鞘再生的外在抑制剂尚不清楚。PETERSEN等^[59]使用CRISPR/Cas9在少突胶质祖细胞(OPC)中敲除骨形态形成蛋白(BMP)I型受体可逆转纤维蛋白原效应,纤维蛋白原的治疗性消耗会降低BMP信号传导并增强体内髓鞘再生,在体外促进星形胶质细胞的生长。提示靶向纤维蛋白原可能是一种治疗策略,可促进中枢神经系统祖细胞在髓鞘再生障碍疾病中的再生潜力。

3.4 血脑屏障完整性研究 中风继发的炎症过程是血脑屏障(BBB)破坏的主要因素,先前的研究表

明,轴突导向分子轴突导向因子4D(Sema4D)启动小胶质细胞炎性激活并破坏中枢神经系统中的内皮功能。ZHOU等^[60]建立I/R造模,并基于CRISPR/Cas9技术靶向注射慢病毒以敲除丛状蛋白B1(PlexinB1),结果发现Sema4D在脑卒中后随BBB通透性同步增加,并在血管周围区域积聚。此外,体外实验发现Sema4D诱导周细胞获得CD11b阳性表型并表达促炎细胞因子,表明Sema4D在短暂大脑中动脉闭塞后通过与周细胞中的PlexinB1结合起来破坏BBB的完整性并促进炎症反应,Sema4D可能是治疗中风急性期的新治疗靶点。

3.5 基于CRISPR/Cas9为药物筛选提供平台 缺血性中风后,神经元的凋亡是决定预后的主要因素,只有5%的患者在中风后接受重组组织纤溶酶原激活剂,极少的比例进行机械取栓,尚无促进中风患者神经元存活的神保护剂上市。Wnt3a是一种天然存在于体内的糖脂蛋白,可穿过BBB,已被证明对脑外伤具有保护作用,在神经生成、抗细胞凋亡和抗炎等生物过程中有所研究。MATEI等^[61]为了探索潜在的神经保护剂Wnt3a的下游信号传导,脑区注射FRZ1(Frizzled1) siRNA、PIWI样蛋白1a(PIWI1a) siRNA进行干预,并基于CRISPR/Cas9激活大脑中的PIWI1a表达,发现MCAO后1h鼻内施用Wnt3a后可减少神经元凋亡,改善神经功能缺损和行为学异常,在敲低FRZ1后恢复PIWI1a增加了FOXMI蛋白并降低了裂解的胱天蛋白酶-3(Caspase-3)水平,表明wnt3a可能成为一种减少中风后细胞凋亡的新型鼻内给药制剂。

4 CRISPR/Cas9技术应用于中医药领域的思考

CRISPR/Cas9为中医理论和中药研究提供了发展契机,可加快中医药复杂问题的阐明并加速现代化发展。

4.1 CRISPR/Cas9技术助力中医理论研究 其一,可用于体质学的研究。中医对体质的论述始于西汉时期的《黄帝内经》,目前分为气虚质、阳虚质、阴虚质、痰湿质、瘀血质、气郁质等9种基本类型^[62],不同体质类型在生理特征、病理反应状态、发病倾向等方面各有特点。由于其遗传特征,结合中医理论中的“三辨理论”一辨体、辨病、辨证诊疗模式,基于CRISPR/Cas9技术可以对关键基因进行功能鉴定,从而有的放矢地从基因层面对中医体征进行科学阐述,推动传统中医理论的现代化发展。

其二,可用于中医证候理论的科学阐释。中医证候问题是中医药理论的核心,但证候系统的复杂

特性一定程度上限制了科学研究和临床应用,已有研究表明基因及其表型与证候密切相关^[63],借助CRISPR/Cas9技术,中医信息学挖掘疾病突变位点、寻找早期表型标记和预测疾病发展等提供助力,证候问题的科学内涵有望得到阐明。

4.2 CRISPR/Cas9技术推动中药现代化发展 中药研究已逐步进入基因组时代,2010年,陈士林研究团队提出“本草基因组计划”,已有丹参^[64]、铁皮石斛^[65]、黄牛角^[66]等多个中药完成了基因测序,这为基因编辑技术的应用提供了极佳的发展契机。

一方面,借助CRISPR/Cas9技术可对药用植物进行基因改造,如过表达抗病虫害的基因,结合现代育种和栽培技术,在保证药物“道地”的基础上,进一步研发抗病、高产、优质的品种,一定程度上缓解中药资源的紧缺和质量问题。另一方面可对中药的功能基因组学进行深入、定向研究,开创中药基因功能研究新模式,如对特定基因进行功能鉴定或促进有效成分高表达,为揭示中草药有效成分生物合成途径、品种差异等关键问题的分子机制提供新方法。

4.3 CRISPR/Cas9技术在脑卒中等复杂疾病的应用 以中医理论为基础,基于CRISPR/Cas9技术在基因水平研究缺血性脑卒中等复杂疾病。中医理论中缺血性中风多以内伤立论,认为多由气血亏虚引起,脑为真气汇聚之地,脑为元神之脏,脑为髓之海,五脏虚损、阴阳偏胜、心火暴亢、肝阳化风致气血逆乱,挟痰挟瘀横窜经络、上蒙清窍,急性期常表现出“风、火、痰、瘀”等不同的特点^[67]。研究表明脑卒中具有遗传性^[68-69],是基因和环境等复杂因素相互作用引起的综合征,这个特点为CRISPR/Cas9的应用提供了依据,已有针对卒中患者基因水平的研究^[70-71]。此外,长期不良的生活、饮食习惯可能引起动脉粥样硬化、高血压、糖尿病等慢性疾病,进而增加卒中风险,虽然脑卒中发病急,但却是长期多因素累积的结果。中医理论在研究慢性疾病上具有优势,在基于临床患者基因图谱的关键基因干预基础上,密切结合中医理论,构建病证结合卒中相关基因敲除模型,以期更加贴近临床病患的发病过程,可为卒中治疗药物特别是中药筛选提供新的可能。

5 总结与展望

2013年以来,CRISPR/Cas9广受推崇并迅速发展,是目前较为便利的基因编辑方法,凭借高效、普适的优势应用于多个疾病学科领域的疾病发生

发展的关键基因功能鉴定和模型建立等^[72],加快了人类对单基因突变疾病、遗传性疾病和多种复杂疾病的认识。目前以临床前研究为主,大部分基于CRISPR/Cas9开发的治疗方法^[73-74]处于临床试验 I / II 期,临床试验一直集中在人类基因组编辑的安全性和有效性上^[75],另有报道 CRISPR/Cas9 作为一种实验性核酸传感工具发展为一种临床相关的诊断技术^[76, 42]。神经元中基因编辑的低效率是神经科学研究和人类治疗研究中的限制因素,随着新材料和新型递送系统的发现,低效和脱靶等突出问题正在逐步被解决^[77]。

临床前研究的疾病模型建立方面,基因敲除构建的载脂蛋白 E 敲除(ApoE^{-/-})小鼠^[78]已成为研究动脉粥样硬化等疾病的理想动物模型,此外已有报道建立如成年心脏特异性肌球蛋白重链蛋白 6(Myh6)基因敲除小鼠心衰模型^[79]等心血管系统模型^[80]和神经退行性疾病模型^[81-82],基因编辑技术为神经病理学发展奠定了基础,加速人类对大脑功能及疾病的理解^[83-85]。分析目前研究文献发现,缺血性脑卒中的体内基因编辑模型多用于研究疾病的预后,如神经修复和再生、血脑屏障恢复过程,而不是疾病的发生,暂未检索到基因编辑的啮齿类动物卒中模型。随着疾病负担不断加大,卒中发生与特定基因的关系亟需深入研究和发现。理论上,基因编辑最佳的候选疾病是单基因突变疾病,在治疗遗传性神经系统疾病中通过 CRISPR/Cas9 基因编辑疗法永久沉默致病基因^[43]表现出了巨大的潜力,而临床中的缺血性脑卒中大多是多因素引发的实质性血管病变和缺血缺氧,是由环境因素和遗传因素共同作用的结果,且脑组织结构复杂,病程演化迅速且多变,仍有许多关键问题需要突破,基础研究向临床实践转化过程中仍有大量问题需要解决且存在争议。通过大数据分析患者基因特征或建立转录组数据库等方法寻找缺血性卒中发生和病理发展过程中的关键基因,结合中医理论加入体征评价和干预因素,进一步借助基因编辑技术鉴定功能并建立模型,为病理研究、药物筛选和临床治疗提供有效的中西医结合手段可能是未来研究的方向。

在技术快速发展和研究不断深入的过程中,安全性、医学伦理问题也不容忽视。细菌来源的蛋白质 Cas9 由于存在某些可以作为主要组织相容性复合物(MHC)结合表位的肽^[86],本身已被证明会引发体液免疫反应,在动物体内中具有固有的免疫原性作用^[87],在神经元中的连续表达引起的毒性经常导

致神经元表型的变化,sgRNA 的长时间表达也会引起的基因组损伤^[88]。此外,成年动物大脑中基因编辑的主要递送载体是病毒,病毒也存在免疫原性,递送安全性有待商榷。同时,基因编辑是一把“双刃剑”,在开展研究中恪守医学伦理学底线是基本的前提,“基因编辑婴儿”的出生严重有悖于国际相关伦理标准^[89],2019年7月24日我国已出台《国家科技伦理委员会组建方案》,科学伦理在法律层面被有效地维护和保障^[90-91]。

综上所述,极具发展潜力的新型基因编辑工具 CRISPR/Cas9 为各个研究领域提供了更多可能,推动了神经、肿瘤、遗传性疾病等多个方向的研究,也为中医药理论的现代化科学阐释带来新思路 and 可能,正如 2021 年习近平总书记在河南省南阳市考察调研时讲话指出“我们要发展中医药,注重用现代科学解读中医药学原理,走中西医结合的道路”。随着更多新兴技术的发展,基础研究和临床应用不断革新,CRISPR/Cas9 技术在中医药研究中的合理应用与拓展,可能在健康领域催生原创性的重大突破。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] GONZÁLEZ CASTRO N, BJELIC J, MALHOTRA G, et al. Comparison of the feasibility, efficiency, and safety of genome editing technologies [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(19):10355.
- [2] RUI Y, WILSON D R, GREEN J J. Non-viral delivery to enable genome editing [J]. *Trends Biotechnol*, 2019, 37(3):281-293.
- [3] SHIVRAM H, CRESS B F, KNOTT G J, et al. Controlling and enhancing CRISPR systems [J]. *Nat Chem Biol*, 2021, 17(1):10-19.
- [4] SAYED N, ALLAWADHI P, KHURANA A, et al. Gene therapy: Comprehensive overview and therapeutic applications [J]. *Life Sci*, 2022, 294: 120375.
- [5] ADLI M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):1911.
- [6] PAWLUK A, DAVIDSON A R, MAXWELL K L. Anti-CRISPR: Discovery, mechanism and function [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2018, 16(1):12-17.
- [7] FANG H, BYGRAVE A M, ROTH R H, et al. An optimized CRISPR/Cas9 approach for precise genome editing in neurons [J]. *Elife*, 2021, 10:e65202.
- [8] SHINMYO Y, KAWASAKI H. CRISPR/Cas9-

- mediated gene knockout in the mouse brain using in utero electroporation [J]. *Curr Protoc Neurosci*, 2017, doi:10.1002/cpns.26.
- [9] STAAHL B T, BENEKAREDDY M, COULON-BAINIER C, et al. Efficient genome editing in the mouse brain by local delivery of engineered Cas9 ribonucleoprotein complexes [J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(5):431-434.
- [10] ZHENG Y, SHEN W, ZHANG J, et al. CRISPR interference-based specific and efficient gene inactivation in the brain [J]. *Nat Neurosci*, 2018, 21(3):447-454.
- [11] HENDRIKS D, CLEVERS H, ARTEGIANI B. CRISPR-cas tools and their application in genetic engineering of human stem cells and organoids [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 27(5):705-731.
- [12] WILBIE D, WALTHER J, MASTROBATTISTA E. Delivery aspects of CRISPR/Cas for *in vivo* genome editing [J]. *Acc Chem Res*, 2019, 52(6):1555-1564.
- [13] ABE T, INOUE K I, FURUTA Y, et al. Pronuclear microinjection during S-phase increases the efficiency of CRISPR-Cas9-assisted knockin of large DNA donors in mouse zygotes [J]. *Cell Rep*, 2020, 31(7):107653.
- [14] LIN J C, VAN EENENNAAM A L. Electroporation-mediated genome editing of livestock zygotes [J]. *Front Genet*, 2021, 12:648482.
- [15] CHEN S, SUN S, MOONEN D, et al. CRISPR-READI: Efficient generation of knockin mice by CRISPR RNP electroporation and AAV donor infection [J]. *Cell Rep*, 2019, 27(13):3780-3789.
- [16] WAKE Y, KANEKO T. Production of genome-edited mice by visualization of nucleases introduced into the embryos using electroporation [J]. *J Reprod Dev*, 2020, 66(5):469-473.
- [17] SWIECH L, HEIDENREICH M, BANERJEE A, et al. *In vivo* interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9 [J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(1):102-106.
- [18] CHAN K Y, JANG M J, YOO B B, et al. Engineered AAVs for efficient noninvasive gene delivery to the central and peripheral nervous systems [J]. *Nat Neurosci*, 2017, 20(8):1172-1179.
- [19] HEIDE M, HAFFNER C, MURAYAMA A, et al. Human-specific ARHGAP11B increases size and folding of primate neocortex in the fetal marmoset [J]. *Science*, 2020, 369(6503):546-550.
- [20] HARRIS J C. Animal models of neurodevelopmental disorders with behavioral phenotypes [J]. *Curr Opin Psychiatry*, 2021, 34(2):87-93.
- [21] GRAFALS-RUIZ N, RIOS-VICIL C I, LOZADA-DELGADO E L, et al. Brain targeted gold liposomes improve RNAi delivery for glioblastoma [J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15:2809-2828.
- [22] SATO M, NAKAMURA S, INADA E, et al. Recent advances in the production of genome-edited rats [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(5)
- [23] BÄCK S, NECARSULMER J, WHITAKER L R, et al. Neuron-specific genome modification in the adult rat brain using CRISPR-Cas9 transgenic rats [J]. *Neuron*, 2019, 102(1):105-119.
- [24] SUN H, ZHENG J, YI M, et al. Conditional genome editing in the mammalian brain using CRISPR-Cas9 [J]. *Neurosci Bull*, 2021, 37(3):423-426.
- [25] SUN H, FU S, CUI S, et al. Development of a CRISPR-SaCas9 system for projection- and function-specific gene editing in the rat brain [J]. *Sci Adv*, 2020, 6(12):eaay6687.
- [26] TIAN R, GACHECHILADZE M A, LUDWIG C H, et al. CRISPR interference-based platform for multimodal genetic screens in human iPSC-derived neurons [J]. *Neuron*, 2019, 104(2):239-255.
- [27] MURLIDHARAN G, SAKAMOTO K, RAO L, et al. CNS-restricted transduction and CRISPR/Cas9-mediated gene deletion with an engineered AAV vector [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2016, 5(7):e338.
- [28] SAVELL K E, BACH S V, ZIPPERLY M E, et al. A neuron-optimized CRISPR/dCas9 activation system for robust and specific gene regulation [J]. *eNeuro*, 2019, 6(1):143.
- [29] ZHOU H, SU J, HU X, et al. Glia-to-neuron conversion by CRISPR-CasRx alleviates symptoms of neurological disease in mice [J]. *Cell*, 2020, 181(3):590-603.
- [30] DENES C E, COLE A J, AKSOY Y A, et al. Approaches to enhance precise CRISPR/Cas9-mediated genome editing [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(16):8571.
- [31] ZHANG J, CHEN L, ZHANG J, et al. Drug Inducible CRISPR/Cas Systems [J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2019, 17:1171-1177.
- [32] WANG X, DONG K, KONG D, et al. A far-red light-inducible CRISPR-Cas12a platform for remote-controlled genome editing and gene activation [J]. *Sci Adv*, 2021, 7(50):eabh2358.
- [33] HOFFMANN M D, BUBECK F, NIOPEK D. Light-

- inducible CRISPR labeling [J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2173: 137-150.
- [34] DE SOLIS C A, HO A, HOLEHONNUR R, et al. The development of a viral mediated CRISPR/Cas9 system with doxycycline dependent gRNA expression for inducible *in vitro* and *in vivo* genome editing [J]. *Front Mol Neurosci*, 2016, 9: 70.
- [35] KUMAR N, STANFORD W, DE SOLIS C, et al. The development of an AAV-based CRISPR SaCas9 genome editing system that can be delivered to neurons *in vivo* and regulated via doxycycline and cre-recombinase [J]. *Front Mol Neurosci*, 2018, 11: 413.
- [36] DAI Z, LI R, HOU Y, et al. Inducible CRISPRa screen identifies putative enhancers [J]. *J Genet Genomics*, 2021, 48(10): 917-927.
- [37] THAMODARAN V, RANI S, VELAYUDHAN S R. Gene editing in human induced pluripotent stem cells using doxycycline-inducible CRISPR-Cas9 system [J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2454: 755-773.
- [38] LIU X S, JAENISCH R. Editing the epigenome to tackle brain disorders [J]. *Trends Neurosci*, 2019, 42(12): 861-870.
- [39] LIU X S, WU H, JI X, et al. Editing DNA methylation in the mammalian genome [J]. *Cell*, 2016, 167(1): 233-247.
- [40] LIU X S, WU H, KRZISCH M, et al. Rescue of fragile X syndrome neurons by DNA methylation editing of the FMR1 gene [J]. *Cell*, 2018, 172(5): 979-992.
- [41] KOENNING M, WANG X, KARKI M, et al. Neuronal SETD2 activity links microtubule methylation to an anxiety-like phenotype in mice [J]. *Brain*, 2021, 144(8): 2527-2540.
- [42] TANG H, ZHAO X, JIANG X. Synthetic multi-layer nanoparticles for CRISPR-Cas9 genome editing [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021, 168: 55-78.
- [43] LEE K, CONBOY M, PARK H M, 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.
- [44] LEE B, LEE K, PANDA S, et al. Nanoparticle delivery of CRISPR into the brain rescues a mouse model of fragile X syndrome from exaggerated repetitive behaviours [J]. *Nat Biomed Eng*, 2018, 2(7): 497-507.
- [45] 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.
- [46] BJÖRKEGREN J, LUSIS A J. Atherosclerosis: Recent developments [J]. *Cell*, 2022, 185(10): 1630-1645.
- [47] LYDEN P D. Cerebroprotection for acute ischemic stroke: Looking ahead [J]. *Stroke*, 2021, 52(9): 3033-3044.
- [48] KLEINDORFER D O, TOWFIGHI A, CHATURVEDI S, et al. 2021 guideline for the prevention of stroke in patients with stroke and transient ischemic attack: A guideline from the American heart association/American stroke association [J]. *Stroke*, 2021, 52(7): e364-e467.
- [49] AKOVA M, UNAL S. A randomized, double-blind, placebo-controlled phase III clinical trial to evaluate the efficacy and safety of SARS-CoV-2 vaccine (inactivated, Vero cell): A structured summary of a study protocol for a randomised controlled trial [J]. *Trials*, 2021, 22(1): 276.
- [50] KRAUSE M D, HUANG R T, WU D, et al. Genetic variant at coronary artery disease and ischemic stroke locus 1p32.2 regulates endothelial responses to hemodynamics [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(48): E11349-E11358.
- [51] VAR S R, SHETTY A V, GRANDE A W, et al. Microglia and macrophages in neuroprotection, neurogenesis, and emerging therapies for stroke [J]. *Cells*, 2021, 10(12): 156.
- [52] COSTA J, MARTINS S, FERREIRA P A, et al. The old guard: Age-related changes in microglia and their consequences [J]. *Mech Ageing Dev*, 2021, 197: 111512.
- [53] PLUVINAGE J V, HANEY M S, SMITH B, et al. CD22 blockade restores homeostatic microglial phagocytosis in ageing brains [J]. *Nature*, 2019, 568(7751): 187-192.
- [54] MARSCHALLINGER J, IRAM T, ZARDENETA M, et al. Lipid-droplet-accumulating microglia represent a dysfunctional and proinflammatory state in the aging brain [J]. *Nat Neurosci*, 2020, 23(2): 194-208.
- [55] HU J, WANG W, HAO Q, et al. Suppressors of cytokine signalling (SOCS) -1 inhibits neuroinflammation by regulating ROS and TLR4 in BV2 cells [J]. *Inflamm Res*, 2020, 69(1): 27-39.
- [56] SI W, LI Y, YE S, et al. Methyltransferase 3 mediated miRNA m6A methylation promotes stress granule formation in the early stage of acute ischemic stroke [J]. *Front Mol Neurosci*, 2020, 13: 103.
- [57] LI W, YANG F, GAO J, et al. Over-expression of TRPC6 via CRISPR based synergistic activation mediator in BMSCs ameliorates brain injury in a rat

- model of cerebral ischemia/reperfusion [J]. *Neuroscience*, 2019, 415:147-160.
- [58] SI W, LI Z, HUANG Z, et al. RNA binding protein Motif 3 inhibits oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced apoptosis through promoting stress granules formation in PC12 cells and rat primary cortical neurons [J]. *Front Cell Neurosci*, 2020, 14: 559384.
- [59] PETERSEN M A, RYU J K, CHANG K J, et al. Fibrinogen activates BMP signaling in oligodendrocyte progenitor cells and inhibits remyelination after vascular damage[J]. *Neuron*, 2017, 96(5):1003-1012.
- [60] ZHOU Y F, LI Y N, JIN H J, et al. Sema4D/PlexinB1 inhibition ameliorates blood-brain barrier damage and improves outcome after stroke in rats [J]. *FASEB J*, 2018, 32(4):2181-2196.
- [61] MATEI N, CAMARA J, MCBRIDE D, et al. Intranasal wnt3a attenuates neuronal apoptosis through Frz1/PIWIL1a/FOXM1 pathway in MCAO rats [J]. *J Neurosci*, 2018, 38(30):6787-6801.
- [62] HANKEY G J. Secondary stroke prevention [J]. *Lancet Neurol*, 2014, 13(2):178-194.
- [63] 左玲,陈建新,王伟,等. 中医信息学与表型组学:症状的遗传突变与证候的生物学基础初探[J]. *北京中医药大学学报*, 2022, 45(2):140-147.
- [64] XU H, SONG J, LUO H, et al. Analysis of the genome sequence of the medicinal plant *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Mol Plant*, 2016, 9(6):949-952.
- [65] ZHENG S G, HU Y D, ZHAO R X, et al. Genome-wide researches and applications on *Dendrobium* [J]. *Planta*, 2018, 248(4):769-784.
- [66] LIANG Q, LI H, LI S, et al. The genome assembly and annotation of yellowhorn (*Xanthoceras sorbifolium* Bunge) [J]. *Gigascience*, 2019, 8(6):gi2071.
- [67] 张亚男,邹忆怀,罗树云,等. 邹忆怀教授论治缺血性中风经验[J]. *陕西中医*, 2019, 40(12):1765-1767.
- [68] LIBBY P, BURING J E, BADIMON L, et al. Atherosclerosis [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5(1):56.
- [69] DICHGANS M, PULIT S L, ROSAND J. Stroke genetics: discovery, biology, and clinical applications [J]. *Lancet Neurol*, 2019, 18(6):587-599.
- [70] 陈浪欣,张桂莹,李其富,等. 染色体6p21.1区遗传变异与缺血性脑卒中易感性的研究进展[J]. *中华神经医学杂志*, 2021, 20(9):952-955.
- [71] 刘靖. 6,7和9号染色体基因多态性与汉族和哈萨克族脑梗塞的相关性研究[D]. 武汉:华中科技大学, 2017.
- [72] BEHR M, ZHOU J, XU B, et al. *In vivo* delivery of CRISPR-Cas9 therapeutics: Progress and challenges [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(8):2150-2171.
- [73] REES H A, MINELLA A C, BURNETT C A, et al. CRISPR-derived genome editing therapies: Progress from bench to bedside [J]. *Mol Ther*, 2021, 29(11): 3125-3139.
- [74] LI B, NIU Y, JI W, et al. Strategies for the CRISPR-based therapeutics [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2020, 41(1):55-65.
- [75] SHARMA G, SHARMA A R, BHATTACHARYA M, et al. CRISPR-Cas9: A preclinical and clinical perspective for the treatment of human diseases [J]. *Mol Ther*, 2021, 29(2):571-586.
- [76] KAMINSKI M M, ABUDAYYEH O O, GOOTENBERG J S, et al. CRISPR-based diagnostics [J]. *Nat Biomed Eng*, 2021, 5(7):643-656.
- [77] LI J, HONG S, CHEN W, et al. Advances in detecting and reducing off-target effects generated by CRISPR-mediated genome editing [J]. *J Genet Genomics*, 2019, 46(11):513-521.
- [78] LEVY Y, LEVY D. A friend and a Foe: 50 years of the apolipoprotein e research trail [J]. *Isr Med Assoc J*, 2021, 23(10):665-669.
- [79] CARROLL K J, MAKAREWICH C A, MCANALLY J, et al. A mouse model for adult cardiac-specific gene deletion with CRISPR/Cas9 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(2):338-343.
- [80] VERMERSCH E, JOUVE C, HULOT J S. CRISPR/Cas9 gene-editing strategies in cardiovascular cells [J]. *Cardiovasc Res*, 2020, 116(5):894-907.
- [81] KAMPMANN M. CRISPR-based functional genomics for neurological disease [J]. *Nat Rev Neurol*, 2020, 16(9):465-480.
- [82] ESPINO-SALDAÑA A E, RODRÍGUEZ-ORTIZ R, PEREIDA-JARAMILLO E, et al. Modeling neuronal diseases in zebrafish in the era of CRISPR [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2020, 18(2):136-152.
- [83] YAN S, TU Z, LI S, et al. Use of CRISPR/Cas9 to model brain diseases [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2018, 81:488-492.
- [84] NISHIYAMA J. Genome editing in the mammalian brain using the CRISPR-Cas system [J]. *Neurosci Res*, 2019, 141:4-12.
- [85] NISHIZONO H, YASUDA R, LAVIV T. Methodologies and challenges for CRISPR/Cas9 mediated genome editing of the mammalian brain [J]. *Front Genome Ed*, 2020, 2:602970.

- [86] LUTHER D C, LEE Y W, NAGARAJ H, et al. Delivery approaches for CRISPR/Cas9 therapeutics *in vivo*: Advances and challenges[J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2018, 15(9):905-913.
- [87] VERDERA H C, KURANDA K, MINGOZZI F. AAV vector immunogenicity in humans: A long journey to successful gene transfer[J]. *Mol Ther*, 2020, 28(3): 723-746.
- [88] WANG D, ZHANG F, GAO G. CRISPR-based therapeutic genome editing: Strategies and *in vivo* delivery by AAV vectors [J]. *Cell*, 2020, 181(1): 136-150.
- [89] TORRES-RUIZ R, RODRIGUEZ-PERALES S. CRISPR-Cas9 technology: Applications and human disease modelling[J]. *Brief Funct Genomics*, 2017, 16(1):4-12.
- [90] CHO S, SHIN J, CHO B K. Applications of CRISPR/Cas system to bacterial metabolic engineering[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(4):1089.
- [91] BROKOWSKI C, ADLI M. CRISPR ethics: Moral considerations for applications of a powerful tool[J]. *J Mol Biol*, 2019, 431(1):88-101.

[责任编辑 周冰冰]