

CRISPR/Cas9 基因编辑技术在基因遗传性眼病中的应用进展

刘张愉, 秦 勋, 黄嘉钰, 蒋 沁

引用: 刘张愉, 秦勋, 黄嘉钰, 等. CRISPR/Cas9 基因编辑技术在基因遗传性眼病中的应用进展. 国际眼科杂志, 2025, 25(6): 912-917.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.82471111)

作者单位: (210029) 中国江苏省南京市, 南京医科大学眼科医院

作者简介: 刘张愉, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 眼底病。

通讯作者: 蒋沁, 男, 博士, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向: 白内障、眼底病、眼视光学. jqin710@vip.sina.com

收稿日期: 2024-11-19 修回日期: 2025-04-21

摘要

目前, 研究人员已发现多种遗传性眼病的突变基因, 但相应的治疗手段仍然匮乏。成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) 及 CRISPR 相关蛋白 (Cas) 的出现为这些疾病的治愈提供了可能, 该系统能够精确靶向并修改特定基因序列, 通过修复突变基因、敲除或替换致病基因来实现治疗效果。在眼科领域, CRISPR/Cas9 已应用于角膜营养不良、先天性白内障、青光眼、视网膜色素变性等诸多遗传性眼病中。同时, 研究人员利用 CRISPR/Cas9 构建眼部疾病模型的研究也取得了许多进展。因此, 该技术有望在基因遗传性眼病的临床应用中提供巨大帮助, 但仍面临递送效率、脱靶效应等挑战。文章对 CRISPR/Cas9 的作用机制、在遗传性眼病和构建疾病模型中的应用及现有挑战进行综述, 以期治疗眼科疾病提供新思路。

关键词: 成簇规律间隔短回文重复序列/CRISPR 相关蛋白 9 (CRISPR/Cas9); 基因编辑; 基因治疗; 遗传性眼病

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2025.6.07

Research progress of CRISPR/Cas9 in genetically inherited eye diseases

Liu Zhangyu, Qin Xun, Huang Jiayu, Jiang Qin

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No.82471111)

The Affiliated Eye Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Jiang Qin. The Affiliated Eye Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. jqin710@vip.sina.com

Received: 2024-11-19 Accepted: 2025-04-21

Abstract

• Currently, researchers have identified several mutated genes associated with hereditary eye diseases; however, effective therapeutic options remain scarce. The emergence of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) and its associated proteins (CRISPR-associated proteins, Cas) offers a promising approach for treating these diseases. CRISPR/Cas9 enables precise targeting and modification of specific genetic sequences, allowing for the correction of mutated genes, as well as knockout or replacement of pathogenic genes to achieve therapeutic effects. In ophthalmology, CRISPR/Cas9 has been applied to various hereditary eye disorders, including corneal dystrophy, congenital cataracts, glaucoma, and retinitis pigmentosa. Additionally, significant progress has been made to utilize CRISPR/Cas9 to develop disease models. Therefore, it has great potential for clinical applications. However, challenges such as delivery efficiency and off-target effects remain. This review summarizes the mechanism of CRISPR/Cas9, its applications in genetic eye diseases and disease models, as well as the existing challenges, aiming to provide new insights for treatment.

• KEYWORDS: clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated proteins (CRISPR/Cas9); gene editing; gene therapy; inherited eye diseases

Citation: Liu ZY, Qin X, Huang JY, et al. Research progress of CRISPR/Cas9 in genetically inherited eye diseases. Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci), 2025, 25(6): 912-917.

0 引言

遗传性眼病是一类由基因突变引起眼部结构和功能异常的疾病, 其特点为先天性、终身性及遗传性, 严重影响患者的视力健康。长久以来, 遗传性眼病难以被治愈, 但随着成簇规律间隔短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)/CRISPR 相关蛋白 9 (CRISPR associated proteins, Cas9) 基因编辑技术的发展, 这些疾病的患者逐渐看到了希望的曙光。CRISPR/Cas9 是原核生物免疫机制的组成部分^[1], 广泛分布于大多数细菌和古生菌中^[2]。当它们遭受病毒攻击时, 能够精确地提取病毒 DNA 的特定片段, 并将其整合至自身的基因组中^[3]。这种独特的防御机制使其在遭到相同病毒的再次入侵时, 能迅速识别之前存储的病毒信息, 切

断病毒 DNA 链使之失效,从而抵御其侵袭^[4-5]。相较于传统的基因编辑技术如 ZFN 和 TALEN, CRISPR/Cas9 具备如下优势^[6-8]:(1)精准编辑:精确靶向并修改特定基因序列;(2)多样化的应用:不仅可以用来修复突变基因,还适用于基因的敲除和替换;既可以在体外细胞模型中应用,也可以通过腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)等直接注射动物体内来实现;(3)高效性:基因编辑效率显著提高;(4)特异性:通过单链向导 RNA (single guide RNA, sgRNA)引导 Cas9 蛋白精确识别目标序列,降低脱靶率的同时减少了副作用和不良反应;(5)可编程性:可根据不同的基因进行特定的设计,具有较高的灵活性;(6)长期效应:直接对基因组进行修改,实现基因的永久性改变。目前,该技术已被应用于多种疾病的治疗中。

1 CRISPR/Cas9 的作用机制

CRISPR/Cas9 系统主要由 sgRNA 和具有核酸内切酶功能的 Cas 蛋白组成^[9],其作用机制可以分为几个关键步骤:(1)识别与结合:细菌在遭到外源的噬菌体或 DNA 入侵后,Cas 蛋白会对其扫描并识别出特定的 PAM 序列(通常由 NGG 三个碱基构成)^[10]。随后,Cas 蛋白切割 PAM 附近的 DNA 序列,并将其插入到细菌基因组 CRISPR 序列的前导区下游,形成新的间隔序列^[11]。(2)转录与加工:CRISPR 序列被转录生成 pre-crRNA,同时转录出与其重复序列互补的反式激活 crRNA (tracrRNA)^[12],两者结合后激活核糖核酸酶 III 并在其作用下进行加工,形成了 crRNA-tracrRNA 复合物。(3)目标结合与切割:成熟的 crRNA-tracrRNA 指导 Cas 蛋白识别并结合目标 DNA 序列。crRNA-tracrRNA-Cas 复合物定位到 PAM 序列后^[13],DNA 双链被解开,crRNA 将与互补链杂交,另一条链则保持游离状态。随后,Cas9 蛋白的 HNH 结构域切割与 crRNA 互补配对的 DNA 链^[14],RuvC 结构域切割另一条 DNA 链,最终导致目标 DNA 双链断裂。(4)DNA 修复:细胞启动自身修复机制。常见的修复途径包括非同源末端连接(NHEJ)和同源重组修复(HDR),其中 HDR 可以在提供修复模板时进行精准的基因修复^[15]。

2 CRISPR/Cas9 在遗传性眼病中的应用

CRISPR/Cas9 技术能够精确地修饰基因组,敲除患者 DNA 中的突变基因,或者抑制显性突变基因的表达,从根源上治疗疾病,在治疗遗传性眼病方面有着巨大潜力。以下将详细介绍近年来 CRISPR/Cas9 系统在遗传性眼病领域的研究进展和应用实例。

2.1 角膜疾病 角膜是眼球纤维膜最前部的透明、圆盘状薄层结构,为眼睛提供 2/3 的屈光力,具有重要的光学作用。基因遗传性角膜病主要包括角膜营养不良(corneal dystrophy, CD)和脆性角膜综合征(brittle cornea syndrome, BCS)等^[16]。

2.1.1 CD CD 是一种原发性进行性角膜疾病,与家族遗传密切相关^[17]。其特征是角膜异物的逐渐累积,最终导致角膜混浊、视力下降等症状^[18]。CD 通常由 TGFBI 基因突变引起,可有多种类型的病理改变,如颗粒状角膜营养不良(granular corneal dystrophy, GCD)和格子状角膜营养不良(lattice corneal dystrophy, LCD)^[19]。目前,除角膜移植外,尚无有效的治疗手段和药物^[20]。为深入探究角膜

营养不良的病理机制,Kitamoto 等^[21]使用 CRISPR/Cas9 技术靶向 TGFBI 基因第 124 位的精氨酸残基,将其转化为半胱氨酸,构建了一种新型小鼠模型。该小鼠角膜基质中嗜酸性粒细胞大量浸润,淀粉样蛋白沉积增加。在角膜擦伤 48 h 后,该模型的角膜上皮伤口延迟愈合,模拟了该病的疾病特征。近年来,CRISPR/Cas9 技术在该病的治疗研究中也取得了进展,Taketani 等^[22]通过 CRISPR/Cas9 技术在体外细胞中修复了 TGFBI 突变。该研究团队设计了针对 TGFBI 基因 R124H 突变的 sgRNA,通过向原代人角膜细胞中递送了 CRISPR 质粒和 HDR 供体模板,成功纠正了 2 型 GCD 患者的细胞中的 R124H 突变。基因校正效率高达 41.3%,并且没有检测到脱靶效应^[22]。该研究通过修复 TGFBI 基因突变,减少了异常蛋白的积累,部分恢复了角膜的透明度,有助于进一步理解角膜营养不良的致病机制以及探索潜在的治疗方法。

2.1.2 BCS BCS 是一种常染色体隐性遗传的角膜病,临床特征是角膜异常脆弱,易发生穿孔及其他并发症^[23]。该病通常由编码角膜结构蛋白的基因突变引起,如 ZNF469 等^[24]。由于 BCS 病理机制复杂,传统的治疗方法存在局限性^[25]。近年来,CRISPR/Cas9 技术在 BCS 的研究进展集中在构建疾病模型方面。Bao 等^[26]利用 CRISPR/Cas9 构建 znf469^{4del/4del}突变斑马鱼来模拟 BCS 的病理过程,电镜结果发现在受精后 72 h 的阶段,突变斑马鱼的角膜基质厚度减少约 67%。RNA 测序分析表明,胶原蛋白等细胞外基质成分的合成同样明显减少。此外,Stanton 等^[27]运用 CRISPR/Cas9 技术在小鼠中诱导了 ZNF469 基因突变,结果显示与正常小鼠相比,角膜厚度减少 30%,基质胶原纤维的直径减少 33%,角膜结构的完整性严重受损。而在细胞模型中,角膜基质的关键成分 Col1a1 和 Col1a2 表达量降低了 25%~50%。以上结果再现了 ZNF469 突变患者的眼部病理特征,为研究角膜基质功能和 BCS 的发病机制提供了新的研究模型。

2.2 晶状体疾病 晶状体是位于虹膜与玻璃体之间的透明结构,主要功能是调节光线的聚焦,帮助眼睛形成清晰的视觉图像。晶状体疾病通常会导致晶状体结构和透明度改变,部分疾病如先天性白内障(congenital cataract, CC)具有基因遗传性,对眼部健康构成严重威胁。

CC 是一种致盲性眼病,其特征是出现不同程度的晶状体混浊^[28],通常由基因突变引起,如:CRYGC、GJA8 等^[29-30]。尽管手术摘除混浊晶状体后植入人工晶状体是一种有效的治疗方式,但无法解决 CC 的根本病因且术后并发症复杂,术后患儿发生后囊下混浊(PCO)的概率几乎为 100%^[31],对 PCO 进行激光治疗后又易引发视网膜脱离等并发症。Wu 等^[32]将靶向突变基因 CRYGC 的 sgRNA 注射到小鼠的受精卵中,在胚胎期修复了基因突变,成功预防了白内障的形成。转化生长因子 β 受体 II (TGF- β R II)与晶状体上皮细胞(LEC)的上皮间质转化(EMT)相关,在临床研究中被证明参与 PCO 的形成^[33]。在另一项研究中,CRISPR/Cas9 被用于特异性敲除 LEC 中的 TGF- β R II。结果显示,敲除 TGF- β R II 能够抑制 LEC 增殖,显著降低了参与 EMT 的波形蛋白和钙粘蛋白的表达量,延缓了 PCO 进展^[34]。尽管 CRISPR/Cas9 在先

天性白内障的治疗中提供了有效靶点,但在临床应用上仍面临挑战,如何进一步提高 CRISPR/Cas9 在组织中的递送效率和准确性,将是目前的研究重点。

2.3 视神经疾病 视神经是连接眼球与大脑的重要神经,能够将来自眼睛的视觉信号传输至大脑。视神经病变的病因繁多,如:青光眼 (glaucoma)、视神经炎、视神经萎缩等,部分疾病可由基因突变引发^[35]。

青光眼是一种以视神经损伤为特征的眼病,疾病特点是神经节细胞 (RGC) 的凋亡和眼内压升高^[36],已成为全球范围内导致不可逆性失明的重要原因。MYOC 基因突变是导致原发性开角型青光眼的已知遗传原因之一^[37],其编码的髓磷脂寡聚糖主要在小梁网 (trabecular meshwork, TM) 和房角表达,基因突变会导致寡聚糖在内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 聚集,引发 ER 应激和 TM 细胞凋亡,阻碍房水流出而升高眼压^[38]。Patil 等^[39]构建了靶向 MYOC 的 sgRNA 并用慢病毒包装,感染突变的 TM 细胞,对突变基因进行敲除。结果显示,敲除效率高达 62%,与对照组相比,MYOC 积累和慢性 ER 应激均显著减少。他们还通过 AAV 载体介导 CRISPR/Cas9 至 MYOC 突变小鼠模型,减少了 TM 中肌纤蛋白的积聚,降低了高眼压。此外,SARM1 蛋白在轴突退变中发挥重要作用,在被激活时,它迅速消耗轴突内的 NAD⁺,引起轴突破坏^[40]。Liu 等^[41]在青光眼模型中利用 CRISPR/Cas9 特异性敲除 SARM1,还对比了两种针对 SARM1 的治疗策略——反义寡核苷酸和 CRISPR 的治疗效果。研究结果显示在青光眼模型中,两种方法对 RGC 具有相近的保护作用。因此,AAV 介导 CRISPR/Cas9 来特异性抑制 SARM1,是一种具有前景的神经保护疗法,有望转化为临床上针对青光眼和视神经病变的治疗手段。Car2 基因通过调节眼内液体的分泌与循环来调控眼内压^[42],可能是治疗青光眼的有效靶点。研究人员通过 CRISPR/Cas9 技术成功敲除青光眼模型中的 Car2 基因^[43],结果显示对基因组 DNA 的编辑效率达到 92.3%。敲除后小鼠的房水生成被抑制,眼压相较于对照组降低约 3 mmHg,视神经损伤得到缓解。在慢性高血压模型中,敲除 Car2 阻止了长期高血压引起的视网膜变薄,减轻了视网膜的结构损伤,延缓了疾病进展,且疗效优于碳酸酐酶抑制剂。以上研究为开发青光眼疾病的基因编辑疗法提供了新思路,而如何维持治疗的稳定和安全并将其应用于临床仍需进一步探索。

2.4 视网膜疾病 视网膜位于眼球壁的内层,负责接收光信号并将其转化为神经信号。视网膜疾病病症较多且分类复杂,可由多种因素引起,包括遗传、年龄、糖尿病等。常见的遗传性视网膜疾病包括遗传性黄斑病变 (hereditary macular diseases)、Leber 先天性黑矇病 (Leber's congenital amaurosis, LCA)、视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP) 等。

2.4.1 遗传性黄斑病变 遗传性黄斑病变是一种罕见的家族性遗传疾病,包括年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, ARMD)、黄斑裂孔、Stargardt 病等^[44]。ARMD 的发生与多个基因突变有关,如:CFH、HTRA1 等^[45]。Lim 等^[46]利用 CRISPR/Cas9 在视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞中敲除 CFH 突变基

因,恢复了正常的 RPE 细胞功能。Yin 等^[47]通过 CRISPR/Cas9 技术编辑小鼠视网膜的 VEGFA 基因,显著减少了病理性血管生成,同时降低了脉络膜新生血管的发生率。此外,CRISPR/Cas9 还被用于视网膜细胞再生研究。对于黄斑裂孔等导致视网膜中央损伤的疾病,Angelos 等^[48]通过 CRISPR/Cas9 将诱导多能干细胞 (iPSC) 分化为 RPE 细胞或视网膜神经细胞,并将其移植到病变区域替代受损细胞,恢复部分视力功能。Stargardt 病主要由 ABCA4 基因突变引起^[49],CRISPR/Cas9 已经被成功应用于该病的体外实验研究。De Angeli 等^[50]从患者体内提取 iPSC,再将这些细胞分化为 RPE 细胞或光感受器细胞,最后通过 CRISPR/Cas9 修复了 ABCA4 突变。上述结果说明,针对遗传性黄斑病变的多种病因,CRISPR/Cas9 在体内外实验均取得了一定成果,为其基础研究和临床治疗提供了重要支持。

2.4.2 RP RP 是一种遗传性视网膜退行性疾病,病理表现为光感受器的渐进性退化和凋亡^[51],通常与基因 (RHO、CPE290、PDE6B 等) 的功能丧失有关^[52]。Du 等^[53]通过 CRISPR/Cas9 来灭活 RHO 基因,同时增加正常视紫红质的表达。研究结果表明,突变小鼠的正常视紫红质的表达量增加了 60%,ERG 显示视力功能得到恢复;同时保护了 6-7 行感光细胞,视网膜的结构形态也明显改善。CEP290 基因编码的蛋白在纤毛的形成中起关键作用,该基因突变会导致光感受器细胞功能障碍,影响光信号传递从而导致视力丧失^[54]。在一项临床研究中,Pierce 等^[55]通过视网膜下注射成功递送了 EDIT-101 (一种基于 CRISPR/Cas9 的基因编辑药物) 来治疗由 CEP290 变异引起的遗传性 RP 患者。EDIT-101 通过两种 gRNA 引导 Cas9 进行精准基因编辑,从而恢复 CEP290 表达和感光细胞的功能。治疗 3 mo 后,14 例患者中有 11 例视力改善,但其安全性仍需进一步评估。此外,CRISPR/Cas9 在构建该病的动物模型上也有进展。传统的 RP 小鼠模型 (RD1) 存在 PDE6B 基因的无义突变,表现出与常隐 RP 患者相似的表现。Chirinskaite 等^[56]通过 CRISPR/Cas9 技术靶向敲除 PDE6B,生成了一种新的 RP 模型,并与 RD1 小鼠进行对比,以深入了解 RP 的病理过程。结果发现,与传统模型相比,PDE6B-KO 小鼠表现出更高的光响应幅度,而 RD1 小鼠光感受器数量的下降速度更快。这两种模型虽然在病程发展上存在差异,但病理机制有一定的相似性。尽管目前仍处于初期探索阶段,但成功构建的 PDE6B-KO 模型为 RP 提供了新的研究工具。

2.4.3 LCA LCA 是一组由多种基因突变引起的遗传性视网膜疾病,最常见的致病基因包括 RPE65、KCNJ13 等^[57]。基因突变会导致光感受器的功能异常,从而造成患者在出生或婴儿期即表现出严重的视力丧失^[58]。RPE65 基因在 3 号外显子的第 130 位上发生的 C-T 的无义突变 (c.130C>T, p.R44X),阻断了 RPE 细胞对外界光刺激的反应,被认为是导致 LCA 的主要原因之一^[57]。Rd12 小鼠模型存在 RPE65 基因的 p.R44X 突变,而 R44X 突变也在人类中存在,两者表现出相似的特征。Jo 等^[59]通过构建包含腺嘌呤碱基编辑器 (ABEs) 的双 AAV 载体,成功在 Rd12 小鼠的 RPE 细胞中诱导了 A-G 碱基转变,恢复了视

网膜中 RPE65 蛋白的表达以及视觉阈值,有效地纠正了 Rd12 小鼠的致病性变异,改善了视觉功能。另外, KCNJ13 基因编码的是一种主要在 RPE 细胞中表达的钾通道蛋白,也和 LCA 的发生发展密切相关^[60]。Kabra 等^[61]通过二氧化硅纳米胶囊来递送碱基编辑器 8e mRNA 和 sgRNA 至小鼠视网膜,成功纠正了 KCNJ13 基因的突变,ERG 电图显示小鼠视功能得到了改善。此外,他们在患者来源的成纤维细胞中检测到了 52.3% 的编辑效率,而在 iPSC 衍生的 RPE 细胞中,编辑效率也达到了 18% 以上,同时脱靶效应极小。这些研究结果证明了 CRISPR/Cas9 在校正基因突变方面的精确性和高效率,为治疗 LCA 提供了新希望。

3 目前挑战与未来前景

CRISPR/Cas9 技术在遗传性眼病中的应用前景广泛,但也面临许多挑战和需要优化的问题:(1)递送效率:CRISPR/Cas9 的递送需要载体系统,但传统的递送方式存在局限性,如低递送效率、局部毒性等^[62]。有研究人员利用 CRISPR/Cas9 靶向敲低 VEGFA 基因,成功抑制角膜新生血管的形成^[63],但转导效率和潜在毒性仍需进一步改进和验证。随着纳米技术和递送载体的发展,未来可能会开发出更高效安全的递送方式。例如,使用改进的病毒载体和纳米材料等可以提高递送效率^[64]。针对眼部的特异性递送系统,也可以通过局部注射等方式更有效地实现精准治疗^[65]。(2)脱靶效应:CRISPR/Cas9 的脱靶效应是其临床应用中的隐患,可能会导致不必要的基因突变^[66],影响细胞或组织的正常功能。目前,新一代的 Cas9 变体(如 SpCas9-HF1、eSpCas9 等)已被开发,这些变体具有更高的特异性,能大幅减少脱靶效应^[67-68]。此外,结合人工智能和计算生物学来预测并避免脱靶位点,也可能成为降低脱靶率的手段之一。(3)基因编辑方式:X 连锁 RP 等疾病涉及多个突变位点^[69],单一基因编辑可能无法达到理想的治疗效果。同时,对于显性遗传病,基因敲除可能无法阻止疾病发展,需要更精准的基因调控。而部分疾病的治疗需要靶向特定的细胞类型,这进一步提高了对编辑方式的要求,如何选择与开发合适的基因编辑方式仍需探索。(4)长期安全性:CRISPR/Cas9 在基因编辑后的短期效果明显,但长期的基因改造可能带来未知的副作用。例如,过度的基因敲除或激活可能影响细胞的正常功能;在长期治疗过程中还可能引发细胞的异常增殖,增加患肿瘤的风险^[70]。此外,安全性涉及伦理道德和社会层面。在遗传病的治疗中,基因编辑可能影响生殖细胞,使修饰后的基因遗传至后代,带来未知风险。因此,长期的安全监控来确保治疗的持续性和稳定性是验证 CRISPR/Cas9 疗法的必要步骤。

4 小结

综上,本文主要综述了近年来 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在治疗遗传性眼病方面的研究进展与分析。CRISPR/Cas9 在遗传性眼病治疗中的应用日益突出,效率和多样性也逐步提高。目前常用的 Cas12a 蛋白^[71],对单链 DNA 的识别和剪切不依赖 PAM 序列,省去了 tracrRNA 的加工步骤,提升了切割效率和安全性^[72]。因此,随着 sgRNA 设计的改进和 Cas 蛋白的持续优化,CRISPR/Cas9

有望继续扩展其应用范围。尽管 CRISPR/Cas9 为遗传性眼病的治疗提供了新思路,但其在临床应用中尚存的挑战不容忽视。因此,未来的研究需要进一步优化技术,提高精准性和可控性,并通过临床试验验证安全性与疗效。随着技术的不断发展和完善,CRISPR/Cas9 有望推动眼科领域的革命性进展,为患者提供更加有效的治疗选择。

利益冲突声明: 本文不存在利益冲突。

作者贡献声明: 刘张愉论文选题与修改,初稿撰写;秦勋、黄嘉钰文献检索,数据分析;蒋沁逸题指导,论文修改及审阅。所有作者阅读并同意最终的文本。

参考文献

- [1] 刘婧, 郑积敏. CRISPR-Cas9 基因编辑技术的应用与展望. 化学教育(中英文), 2025,46(4):1-8.
- [2] Wang JY, Doudna JA. CRISPR technology: a decade of genome editing is only the beginning. *Science*, 2023,379(6629):eadd8643.
- [3] Villiger L, Joung J, Koblan L, et al. CRISPR technologies for genome, epigenome and transcriptome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2024,25(6):464-487.
- [4] Shi MM, Zhang HT, Fleming J, et al. EspB and HtpG interact with the type III-a CRISPR/Cas system of *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Mol Biosci*, 2023,10:1261613.
- [5] Yang ZJ, Huang SY, Zhou YF, et al. Knockout of TMEM206 in mice associated with a loss of corneal transparency. *Int J Ophthalmol*, 2024,17(11):1967-1972.
- [6] Kantor A, McClements ME, MacLaren RE. CRISPR-Cas9 DNA base-editing and prime-editing. *Int J Mol Sci*, 2020,21(17):6240.
- [7] Shamshirgaran Y, Liu J, Sumer H, et al. Tools for efficient genome editing; ZFN, TALEN, and CRISPR. *Methods Mol Biol*, 2022,2495:29-46.
- [8] Katti A, Diaz BJ, Caragine CM, et al. CRISPR in cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer*, 2022,22(5):259-279.
- [9] Huang L, Wang D, Chen H, et al. Corrigendum to "CRISPR-detector: fast and accurate detection, visualization, and annotation of genome-wide mutations induced by genome editing events" [*Journal of Genetics and Genomics* (2023) 563-572]. *J Genet Genomics*, 2023,50(10):813.
- [10] Hung JE, Brewer RA, Elbakr L, et al. Precise template-free correction restores gene function in Tay-Sachs disease while reframing is ineffective. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2025,36(1):102401.
- [11] Peng YQ, Tang LS, Yoshida S, et al. Applications of CRISPR/Cas9 in retinal degenerative diseases. *Int J Ophthalmol*, 2017,10(4):646-651.
- [12] Salem AR, Bryant WB, Doja J, et al. Prime editing in mice with an engineered pegRNA. *Vascul Pharmacol*, 2024,154:107269.
- [13] Dekkers JF, Whittle JR, Vaillant F, et al. Modeling breast cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human breast organoids. *J Natl Cancer Inst*, 2020,112(5):540-544.
- [14] Chien Y, Hsiao YJ, Chou SJ, et al. Nanoparticles-mediated CRISPR-Cas9 gene therapy in inherited retinal diseases: applications, challenges, and emerging opportunities. *J Nanobiotechnology*, 2022,20(1):511.
- [15] Banan M. Recent advances in CRISPR/Cas9-mediated knock-ins in mammalian cells. *J Biotechnol*, 2020,308:1-9.

- [16] Ong Tone S, Kocaba V, Böhm M, et al. Fuchs endothelial corneal dystrophy: The vicious cycle of Fuchs pathogenesis. *Prog Retin Eye Res*, 2021,80:100863.
- [17] Weiss JS, Willoughby CE, Abad-Morales V, et al. Update on the corneal dystrophies—genetic testing and therapy. *Cornea*, 2022,41(11):1337–1344.
- [18] Singh S, Das S, Kannabiran C, et al. Macular corneal dystrophy: an updated review. *Curr Eye Res*, 2021,46(6):765–770.
- [19] Aggarwal S, Peck T, Golen J, et al. Macular corneal dystrophy: a review. *Surv Ophthalmol*, 2018,63(5):609–617.
- [20] Srinivasan S. Evolution and revolution in corneal transplant surgery. *J Cataract Refract Surg*, 2021,47(7):837–838.
- [21] Kitamoto K, Taketani Y, Fujii W, et al. Generation of mouse model of TGFBI – R124C corneal dystrophy using CRISPR/Cas9 – mediated homology-directed repair. *Sci Rep*, 2020,10(1):2000.
- [22] Taketani Y, Kitamoto K, Sakisaka T, et al. Repair of the TGFBI gene in human corneal keratocytes derived from a granular corneal dystrophy patient *via* CRISPR/Cas9-induced homology-directed repair. *Sci Rep*, 2017,7(1):16713.
- [23] Walkden A, Burkitt-Wright E, Au L. Brittle Cornea syndrome: current perspectives. *Clin Ophthalmol*, 2019,13:1511–1516.
- [24] García de Oteya G, Fernández Engroba J, Charoenrook V. New ZNF469 mutations in Spanish siblings with brittle Cornea syndrome. *Cornea*, 2023,42(7):894–898.
- [25] Moore P, Wolf A, Sathyamoorthy M. An eye into the aorta: the role of extracellular matrix regulatory genes ZNF469 and PRDM5, from their previous association with brittle Cornea syndrome to their novel association with aortic and arterial aneurysmal diseases. *Int J Mol Sci*, 2024,25(11):5848.
- [26] Bao J, Yu XN, Ping XY, et al. Znf469 plays a critical role in regulating synthesis of ECM: a zebrafish model of brittle Cornea syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2023,64(5):29.
- [27] Stanton CM, Findlay AS, Drake C, et al. A mouse model of brittle Cornea syndrome caused by mutation in Zfp469. *Dis Model Mech*, 2021,14(9):dmm049175.
- [28] Bell SJ, Oluonye N, Harding P, et al. Congenital cataract: a guide to genetic and clinical management. *Ther Adv Rare Dis*, 2020,1:2633004020938061.
- [29] Delas F, Koller S, Feil S, et al. Novel CRYGC mutation in conserved ultraviolet-protective tryptophan (p.Trp131Arg) is linked to autosomal dominant congenital cataract. *Int J Mol Sci*, 2023,24(23):16594.
- [30] Dong SQ, Zou TD, Zhen FY, et al. Association of variants in GJA8 with familial acroa – microphthalmia – cataract syndrome. *Eur J Hum Genet*, 2024,32(4):413–420.
- [31] Liu X, Li JL, Liu SY, et al. Fabrication of a 3D bioprinting model for posterior capsule opacification using GelMA and PLMA hydrogel-coated resin. *Regen Biomater*, 2024,11:rbae020.
- [32] Wu YX, Liang D, Wang YH, et al. Correction of a genetic disease in mouse *via* use of CRISPR – Cas9. *Cell Stem Cell*, 2013,13(6):659–662.
- [33] Jiang FY, Yang YF, Ni Y, et al. Smurf1 modulates smad signaling pathway in fibrotic cataract formation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2024,65(2):18.
- [34] Wang JD, Zhang JS, Li XX, et al. Knockout of TGF- β receptor II by CRISPR/Cas9 delays mesenchymal transition of Lens epithelium and posterior capsule opacification. *Int J Biol Macromol*, 2024,259:129290.
- [35] Chen BS, Yu-Wai-Man P, Newman NJ. Developments in the treatment of leber hereditary optic neuropathy. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2022,22(12):881–892.
- [36] Jayaram H, Kolko M, Friedman DS, et al. Glaucoma: now and beyond. *Lancet*, 2023,402(10414):1788–1801.
- [37] Wiggs JL, Pasquale LR. Genetics of glaucoma. *Hum Mol Genet*, 2017,26(r1):R21–R27.
- [38] Sekimitsu S, Xiang D, Smith SL, et al. Deep ocular phenotyping across primary open-angle glaucoma genetic burden. *JAMA Ophthalmol*, 2023,141(9):891–899.
- [39] Patil SV, Kaipa BR, Ranshing S, et al. Lentiviral mediated delivery of CRISPR/Cas9 reduces intraocular pressure in a mouse model of myocilin glaucoma. *Sci Rep*, 2024,14(1):6958.
- [40] Chiarugi A. Glaucoma: neuroprotection with NAD – based therapeutic interventions. *Trends Pharmacol Sci*, 2023,44(12):869–879.
- [41] Liu PT, Chen W, Jiang HW, et al. Differential effects of SARM1 inhibition in traumatic glaucoma and EAE optic neuropathies. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2023,32:13–27.
- [42] Ghorai S, Pulya S, Ghosh K, et al. Structure-activity relationship of human carbonic anhydrase – II inhibitors: Detailed insight for future development as anti-glaucoma agents. *Bioorg Chem*, 2020,95:103557.
- [43] Jiang JX, Kong KJ, Fang XL, et al. CRISPR – Cas9 – mediated deletion of carbonic anhydrase 2 in the ciliary body to treat glaucoma. *Cell Rep Med*, 2024,5(5):101524.
- [44] Lyu YN, Tschulakow AV, Wang K, et al. Chemiexcitation and melanin in photoreceptor disc turnover and prevention of macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2023,120(20):e2216935120.
- [45] Guymer RH, Campbell TG. Age-related macular degeneration. *Lancet*, 2023,401(10386):1459–1472.
- [46] Lim RR, Shirali S, Rowlan J, et al. CFH haploinsufficiency and complement alterations in early-onset macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2024,65(4):43.
- [47] Yin JH, Fang KL, Gao YX, et al. Safeguarding genome integrity during gene-editing therapy in a mouse model of age-related macular degeneration. *Nat Commun*, 2022,13(1):7867.
- [48] Angelos MG, Kaufman DS. Pluripotent stem cell applications for regenerative medicine. *Curr Opin Organ Transplant*, 2015,20(6):663–670.
- [49] Molday RS, Garces FA, Scortecci JF, et al. Structure and function of ABCA4 and its role in the visual cycle and Stargardt macular degeneration. *Prog Retin Eye Res*, 2022,89:101036.
- [50] De Angeli P, Reuter P, Hauser S, et al. Effective splicing restoration of a deep-intronic abca4 variant in cone photoreceptor precursor cells by CRISPR/spCas9 approaches. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2022,29:511–524.
- [51] Liu WQ, Liu SS, Li P, et al. Retinitis pigmentosa: progress in molecular pathology and biotherapeutic strategies. *Int J Mol Sci*, 2022,23(9):4883.
- [52] Yan ZX, Yao YQ, Li LY, et al. Treatment of autosomal dominant retinitis pigmentosa caused by RHO-P23H mutation with high-fidelity Cas13X in mice. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2023,33:750–761.
- [53] Du W, Li JR, Tang X, et al. CRISPR/SaCas9-based gene editing rescues photoreceptor degeneration throughout a rhodopsin-associated autosomal dominant retinitis pigmentosa mouse model. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2023,248(20):1818–1828.

- [54] DiCarlo JE, Mahajan VB, Tsang SH. Gene therapy and genome surgery in the retina. *J Clin Invest*, 2018,128(6):2177–2188.
- [55] Pierce EA, Aleman TS, Jayasundera KT, et al. Gene editing for CEP290-associated retinal degeneration. *N Engl J Med*, 2024,390(21):1972–1984.
- [56] Chirinskaite AV, Rotov AY, Ermolaeva ME, et al. Does background matter? A comparative characterization of mouse models of autosomal retinitis pigmentosa rd1 and Pde6b-KO. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(24):17180.
- [57] Chiu W, Lin TY, Chang YC, et al. An update on gene therapy for inherited retinal dystrophy: experience in leber congenital amaurosis clinical trials. *Int J Mol Sci*, 2021,22(9):4534.
- [58] Huang CH, Yang CM, Yang CH, et al. Leber's congenital amaurosis: current concepts of genotype-phenotype correlations. *Genes (Basel)*, 2021,12(8):1261.
- [59] Jo DH, Jang HK, Cho CS, et al. Visual function restoration in a mouse model of Leber congenital amaurosis *via* therapeutic base editing. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2023,31:16–27.
- [60] Sergouniotis PI, Davidson AE, MacKay DS, et al. Recessive mutations in KCNJ13, encoding an inwardly rectifying potassium channel subunit, cause leber congenital amaurosis. *Am J Hum Genet*, 2011,89(1):183–190.
- [61] Kabra M, Shahi PK, Wang YY, et al. Nonviral base editing of KCNJ13 mutation preserves vision in a model of inherited retinal channelopathy. *J Clin Invest*, 2023,133(19):e171356.
- [62] Álvarez MM, Biayna J, Supek F. TP53-dependent toxicity of CRISPR/Cas9 cuts is differential across genomic loci and can confound genetic screening. *Nat Commun*, 2022,13(1):4520.
- [63] Zeng ZH, Li SH, Ye XH, et al. Genome editing VEGFA prevents corneal neovascularization *in vivo*. *Adv Sci (Weinh)*, 2024,11(25):e2401710.
- [64] Degagné É, Donohoue PD, Roy S, et al. High-specificity CRISPR-mediated genome engineering in anti-BCMA allogeneic CAR T cells suppresses allograft rejection in preclinical models. *Cancer Immunol Res*, 2024,12(4):462–477.
- [65] Fry LE, Major L, Salman A, et al. Comparison of CRISPR-Cas13b RNA base editing approaches for USH2A-associated inherited retinal degeneration. *Commun Biol*, 2025,8(1):200.
- [66] Benati D, Patrizi C, Recchia A. Gene editing prospects for treating inherited retinal diseases. *J Med Genet*, 2020,57(7):437–444.
- [67] Matsumoto D, Matsugi E, Kishi K, et al. SpCas9-HF1 enhances accuracy of cell cycle-dependent genome editing by increasing HDR efficiency, and by reducing off-target effects and indel rates. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2024,35(1):102124.
- [68] Allemailem KS, Almatroodi SA, Almatroodi A, et al. Recent advances in genome-editing technology with CRISPR/Cas9 variants and stimuli-responsive targeting approaches within tumor cells: a future perspective of cancer management. *Int J Mol Sci*, 2023,24(8):7052.
- [69] Zhang ZM, Dai HH, Wang L, et al. Novel mutations of RPGR in Chinese families with X-linked retinitis pigmentosa. *BMC Ophthalmol*, 2019,19(1):240.
- [70] Kosicki M, Tomberg K, Bradley A. Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nat Biotechnol*, 2018,36(8):765–771.
- [71] 刘晓婷, 李鹏, 左柯铭, 等. 基于 CRISPR-Cas12a 核酸检测研究进展. *动物医学进展*, 2024,45(8):94–98.
- [72] Paul B, Montoya G. CRISPR-Cas12a: Functional overview and applications. *Biomed J*, 2020,43(1):8–17.