

基于 CRISPR/Cas9 技术敲除 VEGFA 基因药物的制备及其在 ARPE-19 细胞中的作用

张文华¹, 许静璇², 曹可盈³, 王春梅¹, 宋宗明¹, 李晓丽¹

引用: 张文华, 许静璇, 曹可盈, 等. 基于 CRISPR/Cas9 技术敲除 VEGFA 基因药物的制备及其在 ARPE-19 细胞中的作用. 国际眼科杂志, 2026, 26(7): 1127-1132.

基金项目: 中原科技领军人才项目 (No. 224200510013); 河南省自然科学基金项目 (No. 252300421269); 河南省眼科研究所基础研究专项 (No. 20JJCZD001)

作者单位: ¹(450003) 中国河南省郑州市, 河南省人民医院 河南省立眼科医院 郑州大学人民医院 河南大学临床医学院; ²(054001) 中国河北省邢台市, 河北省眼科医院眼外伤科; ³(471023) 中国河南省洛阳市, 河南科技大学

作者简介: 张文华, 女, 硕士, 医师, 研究方向: 近视防控与高度近视眼底病变。

通讯作者: 宋宗明, 男, 博士, 主任医师, 研究方向: 眼底病. szmeyes@sina.com; 李晓丽, 女, 博士, 主治医师, 研究方向: 眼外伤及眼底病. psyche1990@yeah.net

收稿日期: 2025-11-13 修回日期: 2026-05-19

摘要

目的: 基于 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, 研发一种能够靶向敲除 VEGFA 基因的新型载基因药物, 实现对视网膜色素上皮 (RPE) 细胞系 VEGFA 表达的长效抑制, 为视网膜新生血管性疾病的基因治疗提供新策略。

方法: 设计靶向敲除人 VEGFA 基因的向导 RNA 并构建出重组质粒, 采用一种新型高分子聚合物 (PTEE) 对其进行包裹, 制备 PTEE loading anti-VEGFA plasmid (PLAP) 载基因药物。将浓度为 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 PTEE 材料与 ARPE-19 细胞共孵育, 通过 CCK-8 法评估 PTEE 的生物相容性。构建含有 GFP 蛋白的重组质粒, 将脂质体 Lipofectamine 3000 和 jetOPTIMUS[®] DNA 体外转染试剂作为对照组, PTEE 纳米材料作为实验组, 对质粒进行包裹。待细胞融合度达 80% 时, 将药物转染至 ARPE-19 细胞和 293T 细胞中, 通过光学显微镜观察 GFP 蛋白的表达情况并比较各组的转染效率。低氧诱导 ARPE-19 细胞, 将 PLAP 转染至细胞内, 利用 ELISA 检测 VEGFA 表达水平, 评价该新型基因药物的有效性。

结果: 不同浓度梯度的 PTEE 材料与 ARPE-19 细胞共孵育 24 h 和 48 h, 各组细胞活力均未受到明显影响。PLAP 在 ARPE-19 细胞中的转染效率高于 lipo3000 组与 jetOPTIMUS 组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。低氧 6 h 能显著诱导 ARPE-19 细胞中 VEGFA mRNA 的表达升高, 且低氧状态下, PTEE 组对 VEGFA 的表达有明显的抑制作用 ($P < 0.01$)。

结论: PLAP 在体外实验中显示出良好的生物相容性和显著的 VEGFA 抑制效果, 有潜力成为视网膜新生血管性疾

病基因治疗的候选药物。

关键词: VEGFA; CRISPR/Cas9; 视网膜新生血管; 基因敲除; 视网膜色素上皮 (RPE) 细胞

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2026.7.04

Construction of a CRISPR/Cas9-mediated VEGFA gene knockout vector and its effects on ARPE-19 cells

Zhang Wenhua¹, Xu Jingxuan², Cao Keying³, Wang Chunmei¹, Song Zongming¹, Li Xiaoli¹

Foundation items: Leading Talents of Zhongyuan Science and Technology (No. 224200510013); Natural Science Foundation of Henan Province (No. 252300421269); Basic Research Project of Henan Eye Institute (No. 20JJCZD001)

¹Henan Provincial People's Hospital; Henan Eye Hospital; People's Hospital of Zhengzhou University; School of Clinical Medicine Henan University, Zhengzhou 450003, Henan Province, China; ²Department of Ocular Trauma, Hebei Eye Hospital, Xingtai 054001, Hebei Province, China; ³Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, Henan Province, China

Correspondence to: Song Zongming. Henan Provincial People's Hospital; Henan Eye Hospital; People's Hospital of Zhengzhou University; School of Clinical Medicine Henan University, Zhengzhou 450003, Henan Province, China. szmeyes@sina.com; Li Xiaoli. Henan Provincial People's Hospital; Henan Eye Hospital; People's Hospital of Zhengzhou University; School of Clinical Medicine Henan University, Zhengzhou 450003, Henan Province, China. psyche1990@yeah.net

Received: 2025-11-13 Accepted: 2026-05-19

Abstract

• **AIM:** To develop a novel gene-delivery therapeutic based on CRISPR/Cas9 genome editing technology capable of specifically targeting and knocking out the VEGFA gene, thereby achieving sustained suppression of VEGFA expression in retinal pigment epithelial (RPE) cells and providing a new strategy for gene therapy in retinal neovascular diseases.

• **METHODS:** Single guide RNAs targeting the human VEGFA gene for knockout were designed, and corresponding recombinant plasmids were constructed. A novel polymer (PTEE) was used to encapsulate the plasmids to prepare a PTEE-loaded anti-VEGFA plasmid (PLAP) gene delivery system. PTEE materials at

concentrations of 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, and 1.6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ were co-incubated with ARPE-19 cells, and the biocompatibility of PTEE was evaluated using the cell counting kit-8 (CCK-8) assay. Recombinant plasmids expressing green fluorescent protein (GFP) were constructed. Lipofectamine 3000 and jetOPTIMUS[®] DNA transfection reagents were used as control groups, and PTEE nanomaterials were used as the experimental group to encapsulate the plasmids. When the cell confluence reached 80%, the formulations were transfected into ARPE-19 and 293T cells. GFP expression was observed under light microscopy, and the transfection efficiencies of each group were compared. ARPE-19 cells were induced under hypoxia, and PLAP was transfected into the cells. The expression level of VEGFA was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to evaluate the efficacy of this novel gene delivery system.

• **RESULTS:** After co-incubation of ARPE-19 cells with different concentrations of PTEE for 24 h and 48 h, no significant effect on cell viability was observed in any group. The transfection efficiency of PLAP in ARPE-19 cells was higher than that in the Lipo3000 and jetOPTIMUS groups, with statistically significant differences ($P < 0.01$). Hypoxia for 6 h significantly induced the upregulation of VEGFA mRNA expression in ARPE-19 cells, and under hypoxic conditions, the PTEE group exhibited a significant inhibitory effect on VEGFA expression ($P < 0.01$).

• **CONCLUSION:** PLAP exhibits favorable biocompatibility and prominent VEGFA inhibitory effects *in vitro*, making it a potential candidate drug for gene therapy of retinal neovascular diseases.

• **KEYWORDS:** VEGFA; CRISPR/Cas9; retinal neovascularization; gene knockout; retinal pigment epithelium (RPE) cells

Citation: Zhang WH, Xu JX, Cao KY, et al. Construction of a CRISPR/Cas9-mediated VEGFA gene knockout vector and its effects on ARPE-19 cells. Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci), 2026,26(7): 1127-1132.

0 引言

视网膜新生血管 (retinal neovascularization, RNV) 是多种致盲性眼底疾病的病理基础,一直是眼科领域的研究热点。增殖性糖尿病视网膜病变 (proliferative diabetic retinopathy, PDR) 是由于视网膜微血管系统长期处于高糖环境时出现慢性损伤,逐步引发视网膜缺血、缺氧而导致新生血管产生及纤维化改变。这些脆弱的新生血管易破裂出血并进入玻璃体腔,或形成瘢痕引起牵拉性视网膜脱离,导致视网膜结构破坏和视功能丧失^[1-3]。湿性年龄相关性黄斑变性 (wet age-related macular degeneration, wARMD) 会出现脉络膜新生血管且伴随视网膜下和 (或) 视网膜内渗出,直接损伤黄斑区感光细胞,严重影响患者的中心视力^[4]。早产儿视网膜病变 (retinopathy of prematurity, ROP) 主要发生于胎龄小于 28 wk 的极早产儿,但并不局限于此,其疾病特征是早产儿视网膜血管发育不成熟,在氧环境波动等刺激下,血管发育进程紊乱,从

正常血管增殖停滞转向异常新生血管形成^[5-6]。由此可见,新生血管性病变已成为各年龄段致盲的主要原因之一^[7]。

在上述疾病的发生发展过程中,血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA) 可促进内皮细胞增殖、迁移及新生血管形成,同时增加血管通透性^[8],是最关键的促血管生成因子。抗 VEGF 类药物通过与 VEGF 特异性结合,阻断 VEGF 及其受体的信号传递,阻止血管内皮细胞的增生、抑制新生血管的生成,从而减少活性物质的释放^[9-11]。然而,抗 VEGF 药物半衰期较短,药物在经过一段时间的代谢之后,可能复发新生血管,常需多次注射。反复眼内注射不仅增加了患者的经济和心理负担,也受到患者依从性差、疗效波动等问题的限制^[12-13]。因此,研究具有长期稳定疗效的靶向干预手段已成为迫切需求。相较于 siRNA 抑制或抗 VEGF 单抗等传统药物,基因编辑技术因其具备“持久性、靶向性及根本性”优势,正逐步成为眼底病治疗的重要方向^[14]。

CRISPR/Cas9 技术作为新兴的基因编辑工具,具有高效性和特异性,也可实现特定基因的靶向敲除,在疾病治疗领域显示出广阔前景^[15]。基于 CRISPR/Cas9 系统,构建出能够靶向敲除 VEGFA 基因的质粒,有望通过一次性玻璃体注药,在眼球局部实现持久、稳定的基因沉默,阻断新生血管形成,从而克服传统抗 VEGF 药物存在的反复注射、感染风险及耐药等问题。然而,选择药物的递送载体仍面临挑战。本团队在前期研究中^[16],构建出新型非病毒类载体 P[TA-(PEG+PEI)] (PTEE),这是一种兼具高转染效率与生物安全性的高分子聚合物,此次研究将 PTEE 作为药物载体,对有效质粒进行包裹,制备出 PTEE loading anti-VEGFA plasmid (PLAP) 新型基因药物。并在视网膜色素上皮 (RPE) 细胞中对该基因药物进行体外功能验证与安全性评估,为后续开发抗新生血管的基因治疗策略奠定理论与技术基础,为治疗新生血管性眼病提供新思路与新方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人 RPE 细胞系 (ARPE-19) 和人胚肾细胞 (293T) 均购自武汉普诺赛公司。

1.1.2 主要试剂 DMEM/F-12 1:1 (1X) 培养基 (HyClone); DMEM 高糖培养基 (HyClone); 胎牛血清 (北京索莱宝); BI 胎牛血清 (Biological Industries); 胰蛋白酶 (北京索莱宝); PBS 缓冲液 (北京索莱宝); 氨苄青霉素 (Sigma); Lipofectamine 3000 转染试剂盒 (Invitrogen); Opti-MEM 培养基 (Gibco); jetOPTIMUS[®] DNA 体外转染试剂 (法国 polyplus-transfection[®]); 无内毒素质粒小提中量试剂盒 (北京天根); 细胞基因组 DNA 提取试剂盒 (北京天根); PrimeSTAR Max Premix (2X) Taq 酶 (Takara); Trizol 溶液 (天津富宇化工); 氯仿 (天津富宇化工); CCK-8 试剂盒 (北京索莱宝); Human VEGF ELISA Kit (上海优宁维生物)。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建与基因药物构建 重组质粒包含能够同时表达 sgRNA、Cas9 和 eGFP 的 CRISPR 序列,可以靶向敲除人和兔 VEGFA 基因。设计 sgRNA 序列,安排引物合成。

将单链的引物退火成双链 oligo 序列, 连接入酶切线性化表达载体。菌落 PCR 筛选转化子, 筛选的阳性克隆进行测序验证。测序验证正确的克隆, 进行高纯度质粒抽提。将含有目的质粒的大肠杆菌接种于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C 摇床培养过夜, 采用离心柱法, 按试剂盒操作流程提取质粒并测定其浓度及纯度, 稀释后于 -80 °C 保存备用。

PTEE 合成方法类似于已有报道的 PTEB^[17], 以聚乙烯胺 (polyethylenimine, PEI) 作为骨架, 先利用亲水性材料聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 对其进行修饰, 再接枝硫辛酸 (thioctic acid, TA), PEG、PEI 和 TA 的摩尔比为 1:1:2, 从而制备出一种新型的高分子聚合物基因载体 P[TA-(PEG+PEI)], 命名为 PTEE。该基因载体在保留 PEI 高效转染特性的基础上, 显著提升了材料的生物相容性, 可促进所载基因药物在细胞内的释放过程, 进而有效增强其治疗效果。通过静电吸附作用, 将不同体积配比的质粒 (15 μg/μL) 与 PTEE (5 μg/μL) 共培养。以 Zetasizer Nano 粒径电位分析仪测定复合物的表面电位变化, 评估 N/P 比与复合物稳定性, 明确质粒/PTEE 复合物的最佳配比。

1.2.2 PTEE 的安全性评估 将生长状态稳定的 ARPE-19 贴壁细胞进行 96 孔板铺板, 接种密度为 8×10^3 个/孔, 添加 100 μL 新鲜培养基 (90% F-12+10% 胎牛血清), 将细胞置于 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱中持续培养 24 h。观察细胞贴壁状态和生长情况, 吸出旧培养基, 用 PBS 缓冲液对每孔细胞进行 2 次漂洗处理。

将细胞分为 24 h 共培养组和 48 h 共培养组, 两组均加入含有不同浓度 PTEE 的新鲜培养基 (每孔体积 100 μL), PTEE 浓度梯度设置为 0、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 μg/μL, 每个浓度梯度设为 1 个实验组, 每组包含 3 个复孔以保证数据重复性。待两组分别共培养 24 h 和 48 h 后, 向每孔加入 10 μL CCK-8 检测溶液, 在 37 °C 避光环境下继续孵育 2 h, 使用酶标仪测定各孔在 450 nm 波长处的吸光度值, 以分析细胞活性变化。通过光学显微镜观察 24 h 组的细胞形态。

1.2.3 细胞转染效率测定 细胞培养: ARPE-19 细胞培养液由 90% F-12 培养基、9% 胎牛血清和 1% 青霉素混合制备, 293T 细胞培养液由 90% DMEM 培养基和 10% BI 胎牛血清配制而成, 两种细胞均在 37 °C、5% CO₂ 的条件下培养。显微镜观察细胞形态与生长状况, 待细胞融合度达 70%–80% 进行传代, 选取第 3–6 代细胞进行质粒转染。

细胞铺板: 将生长状态良好的 ARPE-19 和 293T 贴壁细胞接种在 24 孔板中, 接种密度为 1.5×10^5 个/孔, 每孔加入 500 μL 新鲜培养基, 在 37 °C、5% CO₂ 条件下继续培养 24 h。

细胞转染: 待 24 孔板中的细胞融合度达 80% 左右时, 将两种细胞分为 Lipo 3000 组、jetOPTIMUS 组和 PTEE 组。Lipo 3000 组和 jetOPTIMUS 组根据转染试剂盒说明书, 分别制备出质粒/Lipo3000 复合物和质粒/jet 复合物。PTEE 组以质粒与 PTEE 的 N/P 值作为配比依据, 选取 500 μg PTEE 与 0.5 μg 质粒充分混匀, 混合体系置于室温下孵育 30 min, 制备出 PLAP 基因药物。吸出 24 孔板内的旧培养

基, 加入上述三种复合物, 每孔含 0.5 μg 质粒, 使用不含抗生素的新鲜培养基, 每孔溶液总体积为 500 μL。将 24 孔板置于 37 °C、5% CO₂ 条件下继续培养 24 h, 通过光学显微镜观察各组细胞转染情况。转染效率的定量计算严格遵循荧光蛋白标记法的国际通用标准, 采用 Image J 软件进行自动化细胞计数以减少人工偏差, 具体计算公式为: 转染效率 (%) = 同一视野下 GFP 阳性细胞数/同一视野下总细胞数 × 100%。

1.2.4 PLAP 基因药物的有效性分析 构建低氧模型, 将 ARPE-19 细胞在低氧和常氧的条件下进行培养, 低氧条件温度为 37 °C, O₂ 含量为 1%^[18], CO₂ 含量为 5%。利用 RT-PCR 方法测定 ARPE-19 细胞在不同氧环境下分别培养 6 h 和 12 h 后, 细胞培养液中 VEGFA mRNA 的表达水平, 以明确对细胞进行低氧处理的时间。

将质粒/Lipo3000 复合物、质粒/jet 复合物和 PLAP 药物转染至低氧处理的 ARPE-19 细胞中, 利用双抗体夹心酶联免疫吸附检测技术 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 测定细胞培养液中 VEGF 的表达量, 从而验证新型载基因药物 PLAP 在抑制 VEGF 方面的有效性。

统计学分析: 采用 SPSS 27.0 软件进行数据统计分析。符合正态分布的计量资料以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间比较采用配对样本 *t* 检验。P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 质粒/PTEE 复合物电位分析与粒径分布 阳离子材料 PTEE 与带有负电荷的质粒, 通过静电吸附作用相结合, 电位分析结果显示 PTEE 纳米材料与质粒体积配比在 2:1 至 4:1 时, 电位在 +4.98 至 +6.52 之间。双电层理论及静电相互作用等机制可证实, Zeta 电位值绝对值大于 5 mV 的稳定性更佳, 且偏正电位对转染效率具有促进作用, 因此选定 3:1 为 PTEE 纳米材料与质粒的最佳配比。PTEE 纳米材料粒径分布在 123–207 nm 之间, 且在 PTEE 纳米材料与质粒体积配比在 3:1 时, 粒径大小为 167.2 ± 2.5 nm。

2.2 PTEE 纳米材料的体外安全性评估 采用 CCK-8 法检测不同浓度 PTEE 材料与 ARPE-19 细胞共培养 24 h 及 48 h 后的细胞活力。细胞活力以空白对照组为 100% 计算, 浓度梯度为 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 μg/μL 的 PTEE 材料对细胞活性无显著抑制作用, 部分浓度组细胞活力甚至略高于空白对照组, 差异均无统计学意义 (均 P > 0.05), 见表 1, 图 1。通过光学显微镜观察 96 孔板中 24 h 组的细胞形态, 未见明显异常, 提示 PTEE 材料具有良好的体外生物安全性。

2.3 新型基因药物 PLAP 的细胞转染效率测定 将含 GFP 蛋白和目标基因的质粒分别以 Lipofectamine 3000、jetOPTIMUS[®] 及 PTEE 材料作为载体, 转染至 ARPE-19 细胞和 293T 细胞。转染 24 h 后观察 GFP 表达情况。结果显示, ARPE-19 和 293T 细胞中, PTEE 组 GFP 蛋白阳性表达率 (ARPE-19 细胞: $40.21\% \pm 3.17\%$; 293T 细胞: $53.75\% \pm 2.25\%$) 均高于 Lipofectamine 3000 组 (ARPE-19 细胞: $18.33\% \pm 2.16\%$; 293T 细胞: $22.31\% \pm 1.16\%$) 和 jetOPTIMUS[®] 组 (ARPE-19 细胞: $27.32\% \pm 2.42\%$; 293T 细胞: $31.17\% \pm 1.82\%$), 表明两种细胞中 PTEE 组的 GFP

蛋白阳性表达最为显著,转染效率最高,差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$),见图2。

2.4 新型基因药物 PLAP 抑制 VEGFA 表达的有效性研究

2.4.1 建立 ARPE-19 细胞低氧模型 ARPE-19 细胞分别在常氧和低氧条件下培养 6 h 和 12 h 后,通过 RT-PCR 检测其 VEGFA mRNA 表达水平,见表2。结果显示,低氧处理 6 h 后的细胞 VEGFA 表达量明显高于常氧 6 h ($P < 0.001$),且低氧 6 h 组的 VEGFA 高于低氧 12 h 组 ($P < 0.05$),因此将低氧培养 6 h 确定为后续低氧模型实验条件。

2.4.2 ELISA 检测 VEGFA 表达水平 ELISA 结果显示,常氧 6 h 对照组的 VEGFA 表达量为 224.7 ± 17.7 pg/mL,在低氧 6 h 条件下,低氧-对照组 VEGFA 表达量为 2394.2 ± 239.4 pg/mL,显著高于其他低氧组;低氧-Lipo3000 组 VEGFA 表达量为 801.8 ± 16.3 pg/mL,低氧-jet 组为 919.9 ± 56.9 pg/mL,低氧-PTEE 组 VEGFA 表达量最低,为 627.3 ± 94.5 pg/mL,与对照组差异显著 ($P < 0.01$),见图3。表明在常氧和低氧条件下,VEGFA 的表达量具有明显差异,三组药物均可对 VEGFA 的表达产生显著抑制,其中 PTEE 组抑制作用最强。证实了新型基因药物 PLAP 在低氧诱导的新生血管微环境中能有效抑制 VEGFA 表达。

2.4.3 VEGFA 基因敲除位点的验证 以 PTEE 作为基因载体,把质粒转染入 ARPE-19 细胞,转染后 24 h 提取细胞基因组 DNA,经过 PCR 对其 VEGFA 片段进行扩增,然后将扩增产物进行 DNA I 代测序,结果显示测序图出现明显的套峰,意味着质粒能够靶向敲除 VEGFA,见图4。

3 讨论

本研究制备了一种由高分子纳米聚合物 PTEE 包裹 CRISPR/Cas9 基因编辑系统的新型基因药物 PLAP,并在体外试验中对其安全性和有效性进行评估,该药物具有良好的生物相容性,能够靶向敲除 VEGFA 基因并产生长效抑制,为新生血管性疾病提供新的治疗思路。

表1 不同浓度 PTEE 纳米材料对 ARPE-19 细胞活力的影响

PTEE 浓度 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	$(\bar{x} \pm s, \%)$	
	24 h 细胞活力	48 h 细胞活力
0	100.00 \pm 8.04	100.00 \pm 0.47
0.1	101.09 \pm 2.98	96.90 \pm 0.56
0.2	107.31 \pm 1.79	94.88 \pm 2.53
0.4	111.85 \pm 1.24	97.26 \pm 1.47
0.8	116.92 \pm 1.36	93.69 \pm 2.31
1.6	114.51 \pm 4.26	97.38 \pm 1.22

表2 ARPE-19 细胞常氧及低氧状态下 VEGFA mRNA 表达量对比

组别	$\bar{x} \pm s$			
	培养 6 h	培养 12 h	<i>t</i>	<i>P</i>
低氧	3.01 \pm 0.75	1.67 \pm 0.03	3.082	0.037
常氧	1.03 \pm 0.08	1.16 \pm 0.16	1.300	0.263
<i>t</i>	4.555	5.501		
<i>P</i>	<0.001	<0.001		

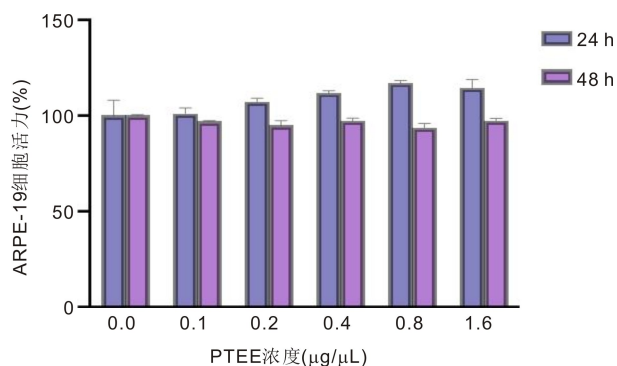


图1 PTEE 纳米材料的体外安全性评估 ARPE-19 细胞与不同浓度 PTEE 材料共孵育 24 h 和 48 h 后的 CCK-8 结果。

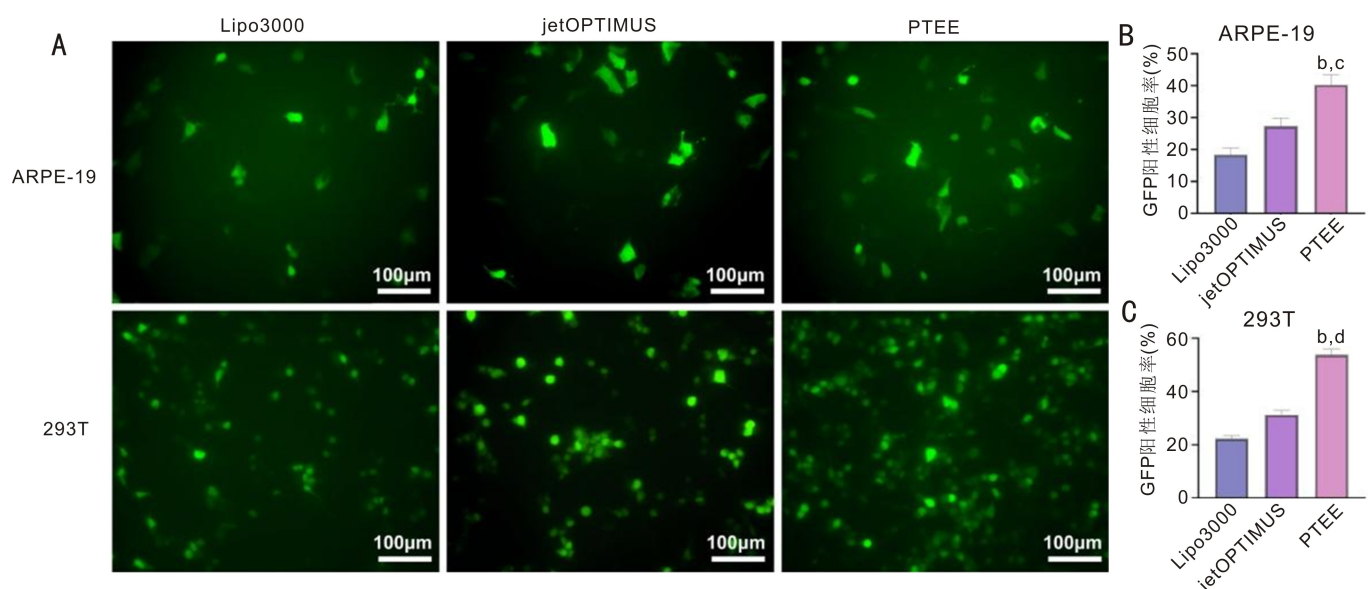


图2 ARPE-19 细胞和 293T 细胞以不同材料为载体的转染结果 A: 光学显微镜下观察利用 Lipofectamine 3000、jetOPTIMUS 和 PTEE 进行细胞转染的 ARPE-19 细胞和 293T 细胞,绿色荧光即表示质粒成功转入细胞基因组内,GFP 蛋白能够正常表达;B: 各实验组在 ARPE-19 细胞中 GFP 蛋白阳性表达率;C: 各实验组在 293T 细胞中 GFP 蛋白阳性表达率。^b $P < 0.01$ vs Lipo3000 组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs jetOPTIMUS 组。

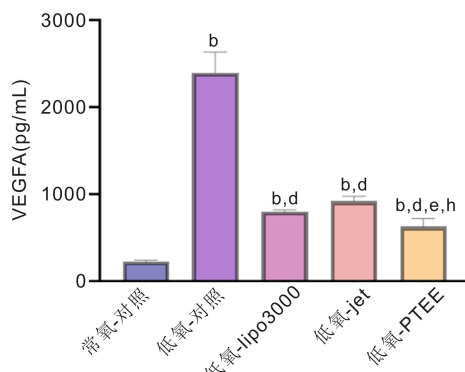


图3 体外实验细胞培养基中 VEGFA 浓度 ^b $P<0.01$ vs 常氧-对照组; ^d $P<0.01$ vs 低氧-对照组; ^c $P<0.05$ vs 低氧-lipo3000 组; ^h $P<0.01$ vs 低氧-jet 组。

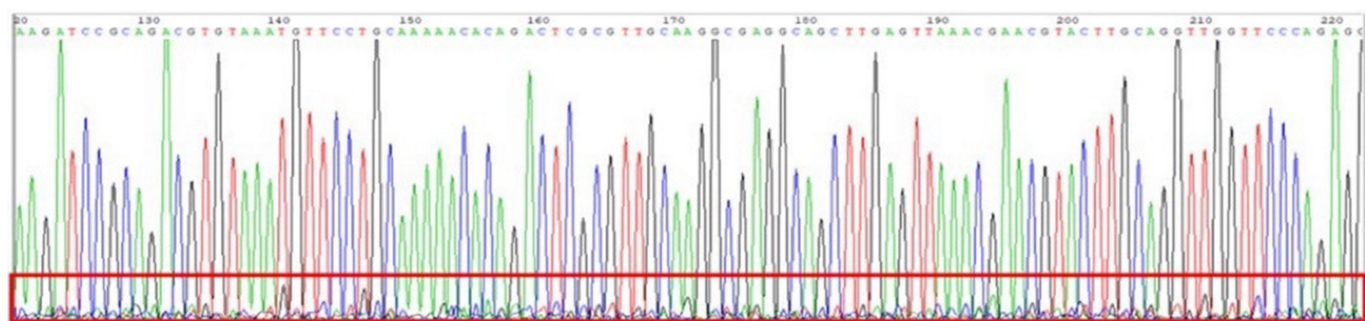


图4 DNA 二代测序。

基于 CRISPR/Cas9 的基因编辑技术已在多种眼部病变开展了临床研究,对于新生血管性眼底病,基因编辑主要靶向血管生成通路中的信号分子,如:VEGFA、VEGFR、低氧诱导因子-1 α 等^[19-20]。本研究的核心靶点 VEGFA 与当前新生血管性眼底病的基因治疗研究高度一致。同时有研究表明^[21],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,在治疗遗传性眼病方面有着巨大潜力。Wu 等^[22]开发了一种重组双腺相关病毒系统,用于传递 CRISPR/Cas9,并证明在氧诱导视网膜病变(OIR)的小鼠模型中,使用双 rAAV1 编辑视网膜中的磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)极大地减少了病理性视网膜血管生成。但靶点间接调控的效果弱于 VEGFA 直接敲除,且 AAV 载体的免疫原性风险会限制给药次数。Ling 等^[23]证明,在 VEGFA 诱导的 wARMED 小鼠模型中,通过慢病毒介导的 CRISPR/Cas9 系统,在单次视网膜下注射后,将脉络膜新生血管面积减少 63%。本研究的创新之处在于,以 PTEE 作为基因药物载体,在体外实验中 PLAP 表现出较高的递送效率,有望在体内实验中进一步提升基因编辑效率。

基因载体作为基因治疗的核心“转运工具”,其安全性、递送效率及可控性直接决定治疗效果与临床转化潜力,主要分为病毒类载体与非病毒类载体两大类。病毒载体虽然在细胞转导效率方面具有明显优势,但常伴随较高的免疫原性、潜在的基因组插入风险、包装基因大小的限制以及复杂的生产流程等问题,这些因素在一定程度上制约了其临床应用的广泛推广。相比之下,非病毒性基因载体近年来因其优越的安全性和可控性受到广泛关注^[24-25],非病毒载体具有低免疫反应、较大的载荷容量、可重复给药和易于规模化生产等优势,特别适合携带大分

子基因药物如质粒 DNA、siRNA 或 CRISPR 体系,展现出优异的临床转化潜力和设计灵活性^[26]。与传统 AAV 等病毒载体相比,本研究采用的 PTEE 递送系统不仅避免了携带能力有限、免疫原性强、细胞选择性差等问题,同时表现出显著的细胞亲和性与转染效率,其在 ARPE-19 细胞中的转染率,已明显优于多数非病毒系统(如 PEI、脂质体类等)在同类细胞中的报道水平^[27-28]。

本研究发现,PTEE 纳米材料在 ARPE-19 和 293T 细胞中的转染效率显著高于传统转染试剂 Lipofectamine 3000 和 jetOPTIMUS。这一结果可能与 PTEE 材料优异的阳离子特性及纳米级粒径有关,使其在细胞膜吸附和内吞过程中具有更高的效率。此外,PTEE 材料在 0.1-1.6 g/L 浓度范围内表现出良好的体外生物相容性,且未对 ARPE-19 细胞活力产生显著抑制作用,提示其作为基因递送载体的安全性和应用潜力。既往研究证实,在 1% O₂ 条件下,ARPE-19 细胞可形成稳定的低氧损伤模型,转录组分析显示 VEGFA 及 HIF-1 信号通路持续激活,提示 1% O₂ 能够有效模拟视网膜血管性疾病相关的缺氧微环境^[18]。为确定最佳低氧处理时间,本研究比较了低氧 6 h 与 12 h 条件下 VEGFA mRNA 表达水平的变化。结果显示,低氧 6 h 即可显著上调 VEGFA 表达,因此选择 6 h 作为后续实验的低氧处理时间,更有利于观察基因编辑干预对 VEGFA 表达的抑制效果。在模拟新生血管微环境的低氧条件下,PTEE 递送 CRISPR/Cas9 系统能有效下调 VEGFA 表达。ELISA 结果显示,PTEE 组细胞上清中的 VEGFA 浓度显著低于低氧对照组($P<0.01$)。上述结果表明,新型基因药物 PLAP 具备有效阻断促血管生成信号的能力,有望为新生血管性眼底病变提供低频且长效的治疗策略。

本研究为体外功能验证阶段,初步证实了 CRISPR/Cas9 系统对 *VEGFA* 基因的编辑效率及其在 ARPE-19 细胞中的功能影响,但仍存在一定的局限性。关于脱靶效应问题,在后续研究中计划对预测的高风险脱靶位点进行 PCR 扩增及 Sanger 测序验证。在条件允许的情况下,将进一步采用全外显子组测序或全基因组测序对潜在脱靶突变进行系统评估。此外,本研究团队已构建兔视网膜新生血管模型,用于后续体内疗效评估及安全性验证。

综上所述,本研究通过 PTEE 纳米材料包裹靶向敲除 *VEGFA* 基因的 CRISPR 序列,制备出新型基因药物 PLAP,成功实现了对 ARPE-19 细胞中 *VEGFA* 表达的高效抑制,为抗新生血管性眼底病变的基因治疗提供了新思路。后续工作将围绕其在体内模型中的递送效率、治疗效应及 PTEE 材料的长期安全性评估展开,以推动其向临床应用转化。

利益冲突声明: 本文不存在利益冲突。

作者贡献声明: 张文华论文选题,研究实施,数据分析,初稿撰写;许静璇补充部分实验,文献检索;曹可盈、王春梅文献检索,数据整理,论文格式校对;宋宗明、李晓丽选题指导,实验指导,数据分析,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] Chaudhary S, Zaveri J, Becker N. Proliferative diabetic retinopathy (PDR). *Disease-a-Month*, 2021,67(5):101140.
- [2] Pandit S, Ho AC, Yonekawa Y. Recent advances in the management of proliferative diabetic retinopathy. *Curr Opin Ophthalmol*, 2023,34(3):232-236.
- [3] Antonetti DA, Silva PS, Stitt AW. Current understanding of the molecular and cellular pathology of diabetic retinopathy. *Nat Rev Endocrinol*, 2021,17(4):195-206.
- [4] Fleckenstein M, Schmitz-Valckenberg S, Chakravarthy U. Age-related macular degeneration: a review. *Jama*, 2024,331(2):147.
- [5] Dammann O, Hartnett ME, Stahl A. Retinopathy of prematurity. *Develop Med Child Neuro*, 2023,65(5):625-631.
- [6] Hartnett ME, Wallace DK, Dean TW, et al. Plasma levels of bevacizumab and vascular endothelial growth factor after low-dose bevacizumab treatment for retinopathy of prematurity in infants. *JAMA Ophthalmol*, 2022,140(4):337.
- [7] Selvam S, Kumar T, Fruttiger M. Retinal vasculature development in health and disease. *Prog Retin Eye Res*, 2018,63:1-19.
- [8] 刘辰,方思尹,顾操,等.抗视网膜脉络膜新生血管性疾病治疗药物靶点的研究进展. *基础医学与临床*, 2022,42(2):325-329.
- [9] 穆晓颖,路博,戴馨,等.抗血管内皮生长因子药物治疗糖尿病视网膜病变的研究进展. *中国当代医药*, 2024,31(9):195-198.
- [10] Penn JS, Madan A, Caldwell RB, et al. Vascular endothelial

- growth factor in eye disease. *Prog Retin Eye Res*, 2008,27(4):331-371.
- [11] Li YF, Ren Q, Sun CH, et al. Efficacy and mechanism of anti-vascular endothelial growth factor drugs for diabetic macular edema patients. *World J Diabetes*, 2022,13(7):532-542.
- [12] Simons M, Gordon E, Claesson-Welsh L. Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016,17(10):611-625.
- [13] 谭英,冯卓蕾.抗 VEGF 治疗眼底新生血管性疾病的临床研究进展. *临床眼科杂志*, 2023,31(3):274-278.
- [14] Zong Y, Miyagaki M, Yang MM, et al. Ophthalmic use of targeted biologics in the management of intraocular diseases: current and emerging therapies. *Antibodies*, 2024,13(4):86.
- [15] 传植,乔伊·王,詹妮弗·杜德纳. CRISPR 十年:基因编辑技术初露锋芒. *世界科学*, 2023(5):4-13.
- [16] 张文华.基于 CRISPR/Cas9 技术敲除 *VEGFA* 载基因药物的制备及其在兔视网膜新生血管模型中的作用研究. 河南大学, 2022.
- [17] Guo ZH, Shi LQ, Feng HY, et al. Reduction-sensitive nanomicelles: Delivery celastrol for retinoblastoma cells effective apoptosis. *Chin Chem Lett*, 2021,32(3):1046-1050.
- [18] 卢聪,史平玲,杨琪翔,等.低氧诱导视网膜色素上皮细胞损伤的生物学机制转录组测序分析. *中华实验眼科杂志*, 2021,39(6):505-514.
- [19] 李仪扬,周执政,王淑菲,等. CRISPR/Cas9 基因编辑技术在疾病治疗中的应用与展望. *生物技术进展*, 2025,15(1):35-42.
- [20] Koo T, Park SW, Jo DH, et al. CRISPR-LbCpf1 prevents choroidal neovascularization in a mouse model of age-related macular degeneration. *Nat Commun*, 2018,9:1855.
- [21] 刘张愉,秦勋,黄嘉钰,等. CRISPR/Cas9 基因编辑技术在基因遗传性疾病中的应用进展. *国际眼科杂志*, 2025,25(6):912-917.
- [22] Wu WY, Ma GE, Qi H, et al. Genome editing of *Pik3cd* impedes abnormal retinal angiogenesis. *Hum Gene Ther*, 2023,34(1-2):30-41.
- [23] Ling SK, Yang SQ, Hu XD, et al. Lentiviral delivery of co-packaged Cas9 mRNA and a *Vegfa*-targeting guide RNA prevents wet age-related macular degeneration in mice. *Nat Biomed Eng*, 2021,5(2):144-156.
- [24] Khan M. Polymers as efficient non-viral gene delivery vectors: the role of the chemical and physical architecture of macromolecules. *Polymers*, 2024,16(18):2629.
- [25] Wang CF, Pan CL, Yong HY, et al. Emerging non-viral vectors for gene delivery. *J Nanobiotechnol*, 2023,21(1):272.
- [26] Zu H, Gao DC. Non-viral vectors in gene therapy: recent development, challenges, and prospects. *AAPS J*, 2021,23(4):78.
- [27] Dhungel BP, Winburn I, da Fonseca Pereira C, et al. Understanding AAV vector immunogenicity: from particle to patient. *Theranostics*, 2024,14(3):1260-1288.
- [28] Zhou X, Liu JZ, Xiao S, et al. Adeno-associated virus engineering and load strategy for tropism modification, immune evasion and enhanced transgene expression. *Int J Nanomed*, 2024,19:7691-7708.