

RAW264.7巨噬细胞基因修饰技术的应用与研究进展

朱丽菁¹ 易璿¹ 张礼科¹ 孙宁¹ 吴琼¹ 庄明珠² 伍国胜¹ 王光毅^{1*}

(¹海军军医大学第一附属医院烧伤科, 上海 200433; ²海军军医大学第三附属医院实验诊断科, 上海 200433)

摘要 RAW264.7巨噬细胞因其终末分化特性和溶酶体清除屏障作用, 长期存在基因递送效率低的技术瓶颈。该文综述了近年来在基因修饰技术领域的研究进展, 重点探讨了膜表面工程化、UTMD物理递送技术、腺相关病毒优化、AAV载体表观调控及碱基/RNA编辑工具等突破性技术。这些技术通过优化递送路径与编辑工具, 显著提升了基因修饰的效率和精准性, 为巨噬细胞功能重编程及疾病治疗研究提供了新范式。

关键词 RAW264.7巨噬细胞; 基因递送; CRISPR编辑; 膜表面工程化; 超声靶向微泡; RNA编辑

Research Progress in Gene Modification Techniques of RAW264.7 Macrophages

ZHU Lijing¹, YI Wei¹, ZHANG Like¹, SUN Ning¹, WU Qiong¹, ZHUANG Mingzhu², WU Guosheng¹, WANG Guangyi^{1*}

(¹Department of Burn Surgery, Changhai Hospital, Naval Medical University, Shanghai 200433, China;

²Department of Laboratory Medicine, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract Genetic modification of RAW264.7 macrophages remains a significant challenge due to their terminally differentiated characteristics and lysosomal clearance barriers. This review summarizes recent advances in genetic modification technologies, focusing on breakthrough approaches including membrane surface engineering, UTMD (ultrasound-targeted microbubble destruction)-mediated physical delivery, AAV (adeno-associated virus) optimization, epigenetic regulation of AAV vectors, and base/RNA editing tools. These technologies significantly enhance the efficiency and precision of genetic modifications by optimizing delivery pathways and editing tools, offering new paradigms for macrophage functional reprogramming and disease therapy research.

Keywords RAW264.7 macrophages; gene delivery; CRISPR editing; membrane surface engineering; ultrasound-targeted microbubble; RNA editing

RAW264.7细胞作为终末分化的非分裂巨噬细胞, 其基因递送效率受到固有生物学特性的多重制约。RAW264.7细胞通过其高表达的清道夫受体A(scavenger receptor A, SR-A), 经由网格蛋白介导的内吞途径, 将外源转染复合物捕获并转运至溶酶体降解, 导致绝大多数递送载体在进入细胞后即

被清除^[1]。当细胞极化为促炎性M1表型时, 核因子- κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)通路的持续性激活不仅加速转染复合物的清除, 还会引发活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平升高, 导致传统化学转染后细胞的低存活率^[2]。此外, RAW264.7细胞的核转运系统存在先天缺陷, 其Importin- α 核转运蛋

收稿日期: 2025-04-09 接受日期: 2025-07-18

上海市重中之重研究中心建设项目(批准号: 2023ZZ02013)、海军军医大学“启航”人才计划(批准号: 2023010128)和海军军医大学第一附属医院基础医学研究专项(批准号: 2023PY25)资助的课题

*通信作者。Tel: 021-31161828, E-mail: southeast000@163.com

Received: April 9, 2025

Accepted: July 18, 2025

This work was supported by the Shanghai Major Research Center Construction Project (Grant No.2023ZZ02013), the “Qihang” Talent Program of Naval Medical University (Grant No.2023010128), and the Basic Medical Research Program of the First Affiliated Hospital of Naval Medical University (Grant No.2023PY25)

*Corresponding author. Tel: +86-21-31161828, E-mail: southeast000@163.com

白的表达水平显著低于典型永生细胞系,导致外源质粒DNA难以有效穿过核膜屏障^[3]。这些固有屏障随细胞所处的生理或病理微环境发生动态调整,进一步增加基因递送的效率和靶向的困难性^[4]。尽管已经经过数十年的技术改良,传统转染方法仍难以突破效率与毒性的权衡困境。本文聚焦RAW264.7细胞的基因修饰技术进展,解析递送系统与编辑工具的协同优化机制,为靶向巨噬细胞的基因修饰提供理论参考。

1 基因递送屏障与应对策略

1.1 基于脂质体的递送策略优化

脂质体(liposome)作为经典药物递送系统,具有生物相容性好、可生物降解、封装效率高以及靶向释放等优势特性,已成为基因和药物递送领域的常用载体。然而,其在RAW264.7巨噬细胞系中的应用受到固有吞噬清除屏障和核膜穿透障碍的限制^[5]。针对这些限制,目前已发展出多种脂质体工程化改造策略。(1) 表面隐形修饰,采用聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)进行脂质体表面修饰(PEG化),通过PEG链的空间位阻效应(steric stabiliza-

tion)形成“水化壳”(PEG hydration shell)。该结构可有效减少血清蛋白吸附和网状内皮系统识别,显著延长脂质体的体内循环半衰期,提高靶组织蓄积效率^[6]。但PEG化策略可能引发的免疫原性和加速血液清除现象限制了其长期应用^[5-6]。(2) 靶向配体修饰,通过表面修饰特异性配体可增强脂质体对特定巨噬细胞亚群的选择性。例如叶酸(folate)修饰的脂质体(folate-modified liposomes, FA-Lips)可靶向高表达叶酸受体(folate receptor, FR)的活化巨噬细胞,在类风湿关节炎等炎症模型中,叶酸介导的内吞作用显著提高了药物在病灶部位巨噬细胞内的积累^[7]。类似地,半乳糖修饰的脂质体可特异性靶向表达甘露糖受体的M2型巨噬细胞^[8]。(3) 环境响应性设计,基于病理微环境的低pH、高酶浓度等特征设计的响应性脂质体,可在靶点触发载荷释放。pH响应型脂质体能够在内吞体/溶酶体的酸性微环境中发生构象变化,促进内容物胞质释放,有效规避溶酶体降解途径^[9]。(4) 仿生信号模拟,通过模拟细胞间天然信号分子可调控巨噬细胞吞噬行为。例如,模拟“别吃我”(Don't Eat Me)信号可抑制巨噬细胞吞噬作用,减少载体清除^[8];而结合模拟“

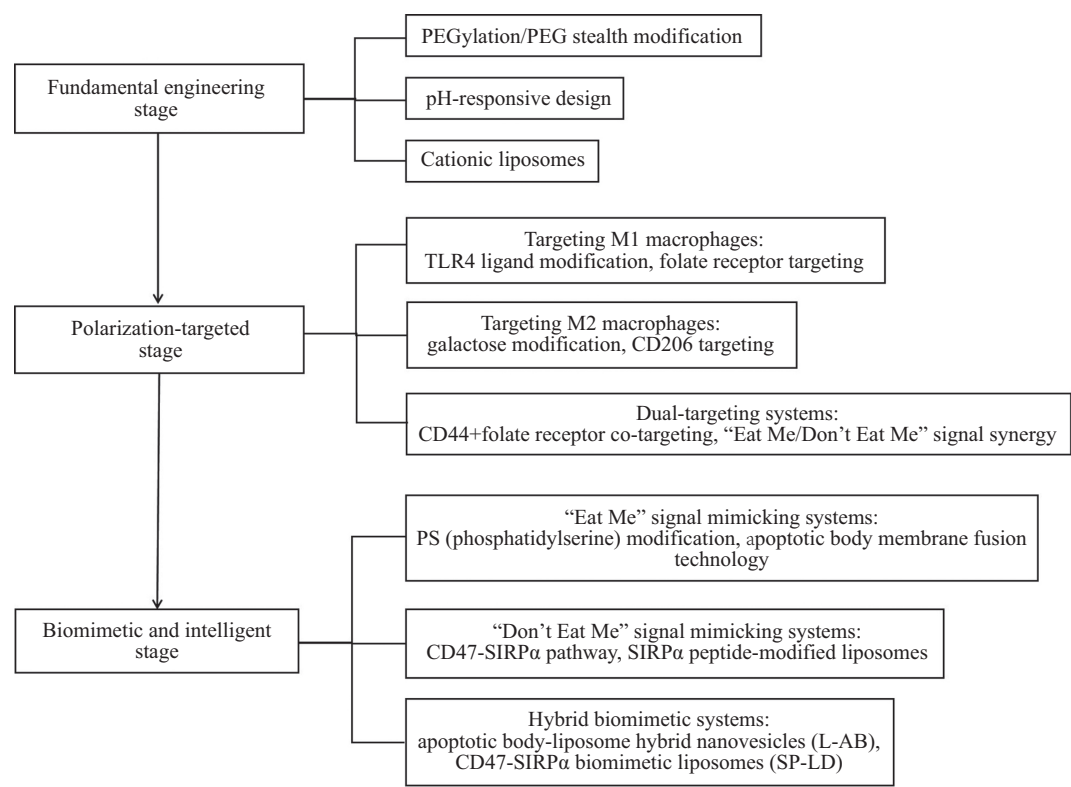


图1 脂质体基因递送优化策略的演进三阶段

Fig.1 The three-stage evolution of liposome-based gene delivery optimization strategies

吃我”(Eat Me)信号(如半乳糖)则可构建针对特定亚群的复杂靶向策略^[8]。通过这些优化策略,脂质体作为基因递送载体的性能得到了显著提升,能够更好地应对巨噬细胞的递送屏障。

1.2 巨噬细胞极化异质性的靶向策略

巨噬细胞具有显著的可塑性,可在不同微环境信号诱导下极化为功能迥异的亚型,如促炎的M1型和抑炎/促修复的M2型。这种极化状态的异质性不仅是许多疾病发生发展的重要因素,也为基因治疗提供了精细调控的靶点。不同的极化状态显著影响巨噬细胞对递送载体的摄取、胞内转运及降解过程。例如,甘露糖修饰的聚多巴胺纳米颗粒(mannosylated polydopamine nanoparticles, MPDA NPs)通过CD206受体靶向肺部M2巨噬细胞,并在体外显示出比原始聚多巴胺纳米颗粒更高的细胞摄取效率^[10];一种受生物启发的蛋白水解靶向嵌合体(proteolysis targeting chimera, PROTAC)递送载体MELT(macrophage-derived extracellular vesicle-like nanocarrier delivering PROTACs),通过用M2巨噬细胞膜包被构建,显示出对M1巨噬细胞的增强特异性,并具有酸响应性释放载荷的能力^[11]。因此,开发能够区分并靶向特定巨噬细胞亚群的递送策略至关重要,且需要充分考虑不同极化状态下细胞固有屏障以及其代谢状态和膜稳态的动态变化。

在巨噬细胞极化状态异质性的调控中,双靶向递送系统的设计以受体差异识别和代谢响应为核心,通过多层次策略实现精准基因修饰。JIA等^[9]基于CD44与叶酸受体的双靶向策略,开发了pH响应型纳米胶束(pH-responsive nanogel-based assemblies-nanoparticles, RBA-NPs)。该纳米胶束可通过炎症部位受体过表达特性实现载体富集^[9]。其酸性微环境响应释放机制可进一步拓展至基因递送领域,如设计pH敏感型载体包裹规律间隔成簇短回文重复序列/Cas9核酸酶(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9, CRISPR/Cas9)组件,靶向M1巨噬细胞的糖酵解关键基因[如缺氧诱导因子1 α (hypoxia-inducible factor 1- α , HIF-1 α)或葡萄糖转运蛋白1(glucose transporter 1, GLUT1)],从而通过代谢重编程诱导M2表型转化。这种结合受体靶向和环境响应的设计思路,为递送基因编辑工具以精准调控特定巨噬细胞亚群提供了范例。更进一步,将受体靶向模块与表观遗传调控元件及基因

编辑工具相结合的整合策略,或将对巨噬细胞功能更深层次的精准调控展现潜力^[12-13]。该策略旨在通过预先调控目标基因的染色质状态,为后续基因编辑创造更有利的条件。然而,这类复杂策略的实施面临显著挑战。首先,核心在于如何在RAW264.7这类高内吞活性的巨噬细胞中,高效递送包含靶向配体、表观遗传调控模块和基因编辑工具的多功能复合体,并克服胞内多重屏障;其次,需要确保表观遗传“预处理”与基因编辑在时空上的精确协同;最后,还需规避表观遗传修饰对细胞固有功能可能产生的非预期脱靶影响和不稳定性^[14]。而应对这些挑战的关键,在于开发能高效靶向并将有效功能组分递送至细胞核的先进系统,明确验证表观遗传调控与基因编辑间的协同增强效应,并进行全面的精确性与安全性评估^[4,13]。未来的突破方向可能包括先进递送系统的工程化创新、时空协同调控机制的精密设计以及提高编辑特异性与安全性的技术迭代等。

另一种精巧的策略是利用信号协同和动态屏蔽。TANG等^[8]构建的脂质体同时利用了靶向M2细胞的“Eat Me”信号(半乳糖)和抑制吞噬的“Don’t Eat Me”信号(CD47模拟肽)。通过在体循环中采用可降解的PEG修饰层遮蔽信号分子,当载体到达肿瘤微环境时,PEG层被特异性裂解,信号分子得以暴露,从而选择性地递送至M2型巨噬细胞,同时抑制M1型细胞的清除^[8]。该设计可适配小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)或信使RNA(messenger RNA, mRNA)递送以调控极化相关通路[(如信号转导和转录激活因子6/过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (STAT6/PPAR γ)通路],展示了如何通过动态调控载体与不同巨噬细胞亚群的相互作用来实现精准靶向。除了复杂的双靶向系统,针对特定极化亚群的单靶向策略也得到广泛研究。ZHOU等^[7]利用叶酸修饰脂质体(folate-modified liposomes, FA-Lips)靶向类风湿关节炎模型中关节滑膜区域富集的活化巨噬细胞。此外,针对巨噬细胞极化状态的异质性,极化响应型靶向系统应运而生。搭载Toll样受体4(toll-like receptor 4, TLR4)配体的脂质体可特异性靶向促炎性M1型巨噬细胞,而叶酸修饰的纳米颗粒则通过结合M2型细胞表面高表达的CD206⁺亚群实现精准递送^[15-16]。此类策略不仅提升了靶向效率,还显著降低了非特异性递送引发的细胞毒性。

2 递送技术创新

2.1 物理场-材料协同系统

物理场调控技术,特别是超声靶向微泡空化技术(ultrasound-targeted microbubble destruction, UTMD),通过超声空化效应产生的瞬态孔道精准调控细胞膜通透性,突破了传统递送方法在巨噬细胞中的局限性^[17]。其核心优势在于,UTMD是一种物理驱动的直接递送方式,通过“声孔效应”(sonoporation)在细胞膜上形成瞬时、可恢复的微孔,使得基因载荷能够直接进入细胞质。这一机制能够有效规避RAW264.7细胞由清道夫受体介导的高效内吞作用以及随后的溶酶体降解途径——这正是限制传统化学转染和纳米载体在巨噬细胞中应用的关键生物学屏障。LI等^[17]开发的半乳凝素-3(galectin-3, Gal-3)短发夹RNA(short hairpin RNA, shRNA)阳离子微泡系统,利用UTMD技术通过空化效应产生的瞬时膜孔道,实现了基因递送效率较常规脂质体法的显著提升,并通过局部机械应力调控降低了非特异性组织损伤。进一步的研究证实,智能超声参数的精细调节是拓展UTMD技术应用场景、在保障细胞存活率前提下实现高效递送的关键^[17]。在此基础上,智能响应材料的整合进一步推动了物理场调控递送技术向时空精准化方向发展。搭载微小RNA-27a*(microRNA-27a*, miR-27a*)的温敏型微泡系统通过超声触发相变释放机制,在肿瘤相关巨噬细胞中展现出特异性递送优势^[18]。LI等^[19]基于UTMD平台开发的新型响应系统叶酸-全氟戊烷纳米气泡(folate-modified perfluoropentane nanobubbles, FA-PFNB)更是一个典型代表。该系统通过四大功能模块协同作用实现突破:叶酸受体靶向模块特异性识别巨噬细胞表面标记物;全氟戊烷超声响应模块在低强度聚焦超声($1\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 2 min)下触发可控释放;二油酰基磷脂酰三甲胺(1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane, DOTAP)脂质体载体通过静电作用稳定核酸并促进溶酶体逃逸;四氧化三铁(Fe_3O_4)纳米颗粒通过磁靶向导航与M1极化调控增强治疗效能^[19]。其在M2型肿瘤相关巨噬细胞中可实现95%以上的基因转染效率,且通过时空可控的释放机制显著降低全身毒性,为多模态智能递送平台设计提供了关键技术范式^[19]。

2.2 病毒载体工程化

腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)作为

基因治疗载体的应用日益广泛。AAV之所以成为巨噬细胞基因递送的有力工具,主要得益于其能够有效克服RAW264.7细胞多重内在屏障的独特生物学特性。首先,AAV能够高效转导包括RAW264.7在内的非分裂终末分化细胞。其次,AAV病毒衣壳具备天然的内体逃逸能力,在细胞内吞后能主动破坏内体膜,避免被运输至溶酶体降解。最后,其衣壳蛋白含有核定位信号(nuclear localization signal, NLS),可主动介导病毒基因组进入细胞核,直接弥补了RAW264.7细胞核转运系统效率较低的先天缺陷。尽管具备这些天然优势,但其转基因表达的时空调控及效率问题仍待优化。通过化学表观遗传修饰剂(chemical epigenetic modifiers, CEMs)与合成锌指蛋白(zinc finger, ZF)阵列的协同作用,可实现对AAV载体转基因表达的智能调控。UMANA等^[20]的研究显示,将锌指蛋白-FK506结合蛋白(zinc finger-FK506 binding protein, ZF-FKBP)融合蛋白元件整合至AAV基因组中,并在其启动子上游插入特异性ZF结合序列,可定向招募内源性转录激活因子。当应用双功能分子CEM87时,其FK506结构域与ZF-FKBP结合,iBET762模块则通过溴结构域结合溴区结构蛋白4(bromodomain-containing protein 4, BRD4),形成“载体-表观修饰”复合体,显著增强启动子活性^[20]。通过在HEK293T细胞中施用CEM87,观察到荧光素酶或绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的表达水平呈现剂量依赖性显著上调,最大可达原始表达水平的5倍,且该增强效应在24小时内迅速达到最高峰^[20]。此外,该技术在不同AAV血清型(如AAV2和AAV8)及多种细胞系(HCT116、U2OS)中均表现出一致性,表明其广谱适用性^[20]。

为降低AAV载体的免疫原性,LI等^[21]探索了通过诱导线粒体自噬降解关键免疫信号分子的新机制。严重急性呼吸综合征冠状病毒2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)开放阅读框10(open reading frame 10, ORF10)蛋白通过结合线粒体自噬受体NIX(BCL2 interacting protein 3 like, BNIP3L)并招募微管相关蛋白轻链3B(microtubule-associated protein 1 light chain 3B, LC3B),触发线粒体特异性自噬,导致线粒体抗病毒信号蛋白(mitochondrial antiviral signaling protein, MAVS)的降解,从而阻断I型干扰素通路^[21]。这一发现为工程化AAV设计提供了重要启示:通过载体表

达类似ORF10的免疫调控元件,可靶向清除MAVS等免疫枢纽蛋白,抑制宿主对病毒载体的先天免疫识别。然而,将此类免疫调控元件安全应用于AAV载体,其核心挑战在于如何确保其表达水平和时机能够被精准控制,以避免潜在的免疫风险。实现这种精准控制,需要借鉴对基因表达多层面调控机制的深入理解,如利用细胞类型特异性的启动子和增强子来限定表达范围,考虑其表达受内源性转录因子和表观遗传状态的影响,甚至探索整合转录后调控元件或合成生物学构建的遗传回路以实现更精细的动态调控^[22-24]。因此,基于以上思路,未来的研究应在降低AAV免疫原性的同时,最大限度地规避因免疫调控元件表达失调可能引发的免疫功能紊乱或病理风险。

2.3 仿生递送平台开发

巨噬细胞的天然识别与吞噬机制为药物递送系统设计提供了独特的仿生策略。通过模拟生理性“Eat Me”或“Don't Eat Me”信号,可精准调控巨噬细胞对载体的内吞行为,实现高效靶向或免疫逃逸。

凋亡细胞表面暴露的磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)作为典型的“吃我”信号,可通过与巨噬细胞表面T细胞免疫球蛋白和黏液蛋白结构域分子4(T cell immunoglobulin and mucin domain containing 4, Tim-4)受体结合触发内吞作用^[25-26]。基于这一机制,LAN等^[27]开发了凋亡小体仿生杂合纳米囊泡(liposomal-apoptotic body, L-AB)。该载体通过融合M2型巨噬细胞来源的凋亡小体与人工脂质体,保留了凋亡小体表面63.4%的PS和46.0%的CD11b,显著增强了巨噬细胞的靶向摄取^[27]。体外实验显示,L-AB在3小时和5小时的巨噬细胞内吞效率分别比普通脂质体提高约1.5倍,且该过程依赖PS-MerTK信号通路^[27]。在脓毒症模型中,L-AB负载地塞米松(Dex@L-AB)通过抑制NF- κ B通路,将血清白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)和单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)水平分别降低至脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)组的35%和42%,并使小鼠生存率从0%提升至75%^[27]。

与利用“Eat Me”信号促进吞噬相反,另一种仿生策略是模拟“Don't Eat Me”信号来抑制或逃避巨噬细胞的清除。CD47分子是细胞表面广泛表达的一种跨膜蛋白,通过与其在巨噬细胞表面的受体——信号调节蛋白 α (signal regulatory protein

alpha, SIRP α)结合,传递“Don't Eat Me”信号,从而抑制吞噬作用^[28-29]。GHEIBIHAYAT^[5]等通过模拟CD47的功能表位,开发了SIRP α 肽修饰脂质体阿霉素(SIRP α -peptide modified liposomal doxorubicin, SP-LD)。药代动力学分析显示,与传统的PEG化脂质体阿霉素(pegylated liposomal doxorubicin, PLD)相比,SP-LD表现出显著的循环优势:使给药后6 h、24 h、48 h的血药浓度分别提高了28%、63%和75%,同时显著降低了药物在肝脏、脾脏、肾脏等主要清除器官中的蓄积量,这提示该策略有望通过减少非靶向清除来缓解药物的系统毒性^[5]。这些通过模拟内源性免疫检查点信号来调控载体命运的仿生策略为提高药物和基因递送载体在体内的持久性和靶向性开辟了新途径,未来研究可进一步聚焦其在不同疾病模型中的验证及临床转化潜力。

3 基因编辑工具与递送系统的协同优化

3.1 工具精准化升级

基因编辑工具的迭代升级为巨噬细胞功能重编程提供了强大动力,然而其在RAW264.7细胞中的应用效果,高度依赖于递送系统与编辑工具的精妙适配。不同编辑工具的分子构成、作用机制和递送形式决定了其对递送载体的差异化需求。例如,作为应用最广泛的CRISPR/Cas9系统,其递送策略面临着在瞬时高表达与稳定筛选之间进行权衡,以平衡编辑效率与Cas9蛋白潜在细胞毒性的核心挑战。因此,探讨如何通过递送策略与编辑工具本身的协同优化以提升编辑精准度与效率,是当前研究的焦点。

当前RAW264.7细胞的基因编辑效率存在显著的位点依赖性,不同基因靶位点的编辑效率波动较大^[30]。这种效率的不稳定性主要归因于三方面因素:首先,靶序列的内在特性,如鸟嘌呤-胞嘧啶(guanine-cytosine, GC)含量、染色质开放状态及二级结构等特性可能阻碍CRISPR复合物结合^[30];其次,传统CRISPR系统中Cas9蛋白的持续性表达可能导致明显的细胞毒性,进而影响蛋白表达水平的稳定^[31];最后,递送工具的瞬时表达特性也可能限制编辑窗口的持续性,不足以实现高效编辑^[32]。

针对这些瓶颈,近年研究已提出多种创新性解决方案。pCRISPR-EASY系统通过单质粒设计整合了单向导RNA(single guide RNA, sgRNA)与Cas9基

因,并采用电穿孔技术实现高效递送^[30]。该系统利用人延伸因子1 α (human elongation factor-1 α , *hEF1 α*)启动子驱动Cas9的稳定表达,相较于传统巨细胞病毒/鸡 β -肌动蛋白(cytomegalovirus/chicken β -actin, *CAG*)启动子显著提高了表达水平,同时通过枯草杆菌限制性内切酶BI(*Bacillus subtilis* restriction enzyme BI, *BsmBI*)酶切位点简化sgRNA克隆流程,使克隆效率接近100%^[30]。这一策略充分体现了递送系统与编辑工具的协同优化,即通过优化质粒载体并结合高效的物理递送方法,成功构建了能够稳定表达的细胞系,从而克服了瞬时转染效率不足的问题,有效延长了编辑窗口^[30]。高精度Cas9(high-fidelity Cas9, HypaCas9)等新型Cas9变体通过突变FokI结构域(D10A/H840A),在RAW264.7细胞中实现了脱靶率降低与靶向切割效率的平衡^[30]。此外,启动子设计的优化(如巨噬细胞特异性CD68启动子)可增强编辑工具在特定细胞类型中的靶向性^[33]。这些策略的结合不仅提高了编辑精准度,还通过递送系统的持续表达特性缓解了Cas9细胞毒性对编辑效率的影响^[30]。

进一步地,为解决Cas9持续表达所引发的细胞毒性问题,一个关键的优化方向在于调整递送策略,实现Cas9的按需或瞬时表达,以在编辑效率与细胞安全之间取得平衡。诱导型启动子系统允许在特定时间窗口开启和关闭Cas9表达,从而精确控制编辑时间和蛋白暴露量,显著降低长期表达带来的毒副作用^[34-36]。而更直接且广泛应用的策略,则是彻底改变递送内容的形态。直接递送预先组装的Cas9-gRNA核糖核蛋白(ribonucleoprotein, RNP)复合物,其在细胞内作用时间短暂,完成编辑后即被降解,无基因整合风险,被普遍认为是减少脱靶和细胞毒性的优选方案^[37-38]。同样,递送编码Cas9的mRNA也能实现Cas9的瞬时表达且无整合风险,避免了持续表达的困扰^[37]。这些策略通过最大限度地减少Cas9在细胞内的暴露时间和总量,为RAW264.7细胞及其他敏感细胞的基因修饰提供了更安全、更可控的选择。

除表达调控外,提高Cas9 RNP的核转运效率也是提升编辑效果的关键环节。针对这一挑战,SHUI等^[39]通过猴病毒40核定位信号(simian virus 40 nuclear localization signal, SV40 NLS)的串联融合设计(N0/C4构型),显著增强了RNP复合体的核靶向能力,使Cas9蛋白的核内积累量较单NLS构建体增加2

倍,从而在包括难转染细胞的多种细胞类型中实现最高45%~50%的基因组编辑效率。该研究揭示了递送优化的另一个层面:不仅要关注如何将载荷送入细胞,还要通过工程化改造编辑工具本身,提升其在胞内的转运效率,确保其精准抵达细胞核发挥作用。值得注意的是,SHUI等^[39]的研究并未直接比较不同NLS序列的效果,但结果显示最优的SV40 NLS拷贝数存在细胞类型依赖性,这强调了在RAW264.7细胞中应用时,需要通过实验确定最佳的多拷贝SV40 NLS设计以实现最高效率 and 安全性。这些多层面的策略的结合,共同提高了基因编辑的精准度和效率,并缓解了Cas9细胞毒性对编辑效果的影响。

3.2 碱基编辑适配

与依赖DNA双链断裂的CRISPR-Cas9不同,碱基编辑技术通过非断裂依赖的精准单碱基转换机制,为巨噬细胞基因组的靶向修饰提供了独特优势。然而,这种精密的编辑工具也对递送系统提出了新的挑战与适配要求。胞嘧啶碱基编辑器(cytosine base editor, CBE)和腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editor, ABE)可分别实现C $\rightarrow$ T和A $\rightarrow$ G的定点转换,其核心依赖于脱氨酶与DNA结合结构域的融合设计^[40-41]。从递送的角度看,这意味着需要递送一个比标准Cas9更大的融合蛋白,对递送载体的装载能力、稳定性和促进溶酶体逃逸的效率都提出了更高的技术要求,同时还需考虑其在巨噬细胞中潜在的免疫原性。WEI等^[42]研究表明,基于转录激活样效应因子(transcription activator-like effector, TALE)蛋白的DddA衍生胞嘧啶碱基编辑器(DddA-derived cytosine base editors, DdCBE)通过靶向线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)并招募分裂的脱氨酶,在人类胚胎中实现高达60%的C $\rightarrow$ T转换效率。该技术无需依赖CRISPR-Cas系统的RNA引导机制,而是通过TALE蛋白的序列特异性结合确保定位精确性,为巨噬细胞的线粒体基因组编辑提供了新策略^[42]。巨噬细胞因对DNA双链断裂(double-strand break, DSB)高度敏感,传统CRISPR-Cas9系统易引发细胞凋亡或炎症反应^[43]。碱基编辑技术通过避免DSB形成,显著降低基因组不稳定性风险。DdCBE在人类胚胎中即使高剂量应用亦未导致显著的形态异常或发育速率改变,提示其在巨噬细胞中可能具有更好的生物安全性^[42]。此外,巨噬细胞功能相关基因(如炎症因子编码基因或代谢调控基因)的致病

性突变常为单核苷酸变异, 碱基编辑可精准模拟或修复此类突变, 为研究其功能机制提供理想工具^[30]。

然而, 碱基编辑器的应用仍需进一步优化以提升巨噬细胞适配性。研究显示, 碱基编辑技术的编辑窗口存在“旁观者效应”(bystander effect), 靶位点附近的胞嘧啶可能被非特异性脱氨^[44]。在WEI等^[42]的研究中表现为DdCBE诱导的C→T转换具有5'-TC-3'序列偏好性, 这一特性可能限制其在核基因组中的特异性。此外, 尽管DdCBE在胚胎中未检测到显著的核基因组脱靶, 但在递送至巨噬细胞时必须考虑其免疫原性。巨噬细胞具有活跃的RNA感应通路(如黑色素瘤分化相关基因5/维甲酸诱导基因1, melanoma differentiation-associated protein 5/retinoic acid-inducible gene 1, MDA5/RIG-I), 需警惕编辑器mRNA或蛋白成分可能触发的非预期免疫应答^[45]。因此, 开发具有免疫“隐形”特性或靶向特定巨噬细胞亚群的递送系统, 对于碱基编辑技术的安全高效应用至关重要。

3.3 RNA编辑应用

作为一种新兴的转录后调控手段, 基于腺苷脱氨酶作用RNA(adenosine deaminase acting on RNA, ADAR)系统的RNA编辑技术, 实现了高精度、可逆的基因靶向修饰。该技术与递送系统的结合尤为紧密, 其临床转化潜力高度依赖于递送技术的突破。通过设计特异性向导RNA(guide RNA, gRNA)与靶标mRNA互补配对形成双链结构, 招募内源性ADAR酶催化腺苷(A)至肌苷(I)的脱氨基反应, 该技术在引入基因组永久性改变的前提下, 实现对基因表达的时空特异性调控^[46]。在血液系统研究中, ADAR1通过编辑造血干细胞(hematopoietic stem and progenitor cells, HSPCs)中抗毒素解除抑制因子1(antizyme inhibitor 1, *AZIN1*)的mRNA, 促进其与DEAD-box解旋酶1(DEAD-box helicase 1, Ddx1)的相互作用, 从而增强长期造血重建能力^[47]; 而在肝细胞中, ADAR1介导的乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV) RNA编辑可逃逸MDA5/RIG-I对病毒双链RNA的识别, 抑制I型干扰素通路激活, 揭示了RNA编辑在病原体-宿主互作中的双重调控作用^[48]。这种天然编辑机制的利用不仅能规避外源蛋白的免疫原性, 还可通过gRNA模块化设计灵活靶向不同基因位点, 为遗传性疾病的原位校正和功能基因组学研究开辟了新路径。

递送系统的创新是拓展RNA编辑应用场景的核心驱动力。DNA编码的环状gRNA通过病毒载体或非病毒纳米颗粒递送, 利用twister核酶的自我剪切特性形成稳定环状结构, 在小鼠肝脏模型中实现长达8周的持续编辑, 尤其适用于需要长期干预的遗传缺陷修复^[46]; 而化学修饰的反义寡核苷酸(anti-sense oligonucleotide, ASO)采用磷酸硫酰骨架、2'-O-甲基化及锁核酸(locked nucleic acid, LNA)等修饰增强核酸酶抗性, 结合N-乙酰半乳糖胺(N-acetylgalactosamine, GalNac)配体靶向肝细胞膜表面去唾液酸糖蛋白受体(asialoglycoprotein receptor, ASGPR), 在非人灵长类动物中实现了50%的瞬时编辑效率^[46]。尽管GalNac主要靶向肝细胞, 但其“配体-寡核苷酸偶联”的递送策略为靶向巨噬细胞提供了重要借鉴, 将甘露糖、叶酸等配体与gRNA或ASO偶联, 可以实现对特定巨噬细胞亚群的靶向递送。然而, 组织穿透性不足和细胞核定位效率低仍是限制ASO广泛应用的技术瓶颈, 新型纳米载体通过模拟病毒包膜结构增强胞吞效率, 或将可逆性核定位信号肽整合至gRNA设计, 成为当前优化方向^[49]。

为提高编辑特异性, 基于ADAR酶作用机制的gRNA理性设计策略不断革新。CLUSTER指导RNA(CLUSTER guide RNA)通过在gRNA中引入间断互补区域, 将脱靶编辑率降低至背景水平^[50]; 而“凹凸互补”(bump-hole)双组分系统则通过工程化ADAR突变体与含非天然碱基的gRNA结合, 实现正交性编辑^[51]。此外, LIN等^[52]的胶质瘤研究中, 女性高编辑水平与不良预后的相关发现揭示了RNA编辑性别二态性规律, 提示了整合X染色体连锁启动子或雌激素响应元件可增强性别特异性编辑精准性。单细胞测序技术解析的细胞类型特异性RNA结合蛋白为设计组织靶向gRNA提供了新思路, 通过模拟内源性RNA-蛋白互作网络可增强编辑系统的细胞选择性^[53]。随着表观转录组学与递送技术的融合, RNA编辑有望成为继基因组编辑后实现基因功能精准操控的新一代工具。

4 总结与展望

RAW264.7巨噬细胞因其独特的生物学特性, 如高效的吞噬清除能力、溶酶体降解屏障以及核转运缺陷等, 长期以来在基因递送和修饰方面面临挑战。近年来, 通过膜表面工程化、物理场-材料协同

系统、病毒载体优化以及仿生递送平台等创新途径,显著提升了基因递送效率和细胞内载体调控能力。同时,CRISPR基因组编辑工具的迭代升级和基于ADAR系统的RNA编辑技术的应用,为在RAW264.7细胞中实现精准、高效、可逆的基因功能调控提供了强大的工具。

基因修饰的RAW264.7巨噬细胞通过调控炎症反应、促进组织修复和增强免疫调节功能在多种疾病模型中展现治疗效果。在慢性肾病(chronic kidney disease, CKD)模型中,基因修饰的RAW264.7巨噬细胞通过下调Mincle信号通路,减少白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等促炎因子分泌,同时改善肠道屏障功能^[54]。类似地,组蛋白去乙酰化酶1~3(histone deacetylase 1-3, HDAC1-3)抑制剂MS-275通过增强白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)表达,抑制NF- κ B活性,缓解香烟烟雾诱导的肺部炎症^[55]。在关节炎模型中,靶向抗瓜氨酸化蛋白抗体(targeting anti-citrullinated protein antibody, tACPA)修饰的巨噬细胞通过抑制中性粒细胞胞外陷阱(neutrophil extracellular traps, NETs)的形成并促进其吞噬,减少关节组织损伤^[56]。而在阿尔茨海默症模型中,靶向NOD样受体家族热蛋白结构域成员3(nod-like receptor family pyrin domain containing 3, NLRP3)炎症小体的基因修饰可降低tau蛋白的病理累积,改善认知功能^[57]。谷氧还蛋白2(glutaredoxin 2, Grx2)修饰的巨噬细胞则通过抑制一氧化氮(nitric oxide, NO)释放和调节氧化还原平衡,减轻哮喘模型中的气道高反应性^[58]。这些不同研究的一致性在于巨噬细胞功能重编程的核心作用,但具体的调控靶点和作用路径因疾病类型而异。

尽管在RAW264.7巨噬细胞基因修饰技术及其在疾病模型中的初步应用探索取得了显著进展,但该领域距离实现广泛的临床转化仍面临多重关键挑战。(1) 体内递送效率与靶向特异性瓶颈,虽然体外转染效率已大幅提升,但将基因编辑工具或治疗载体高效、特异性地递送到体内特定组织或特定的巨噬细胞亚群(如肿瘤相关巨噬细胞、组织驻留巨噬细胞)仍然是巨大的挑战^[59-60]。系统给药后,载体极易被网状内皮系统非特异性清除,导致靶部位剂量受限^[61]。此外,如何有效克服复杂的组织微环境和细胞内屏障仍需深入研究和优化。(2) 安全性风险

和脱靶效应,基因编辑工具,特别是基于核酸酶的CRISPR系统,存在潜在的脱靶编辑风险,可能导致不可预测的基因组改变和细胞毒性^[62-63]。病毒载体效率虽高,但其免疫原性、插入突变风险以及长期表达的安全性仍是临床应用的主要顾虑^[64]。碱基编辑和RNA编辑降低了DNA双链断裂风险,但也存在“旁观者效应”或非特异性编辑问题,且长期影响尚不完全清楚^[65]。(3) 巨噬细胞极化状态的动态调控与异质性,巨噬细胞在体内微环境影响下极化状态是动态变化的,现有技术难以实现对这种动态过程的实时、精准调控^[66]。此外,不同组织、不同病理状态下的巨噬细胞亚群具有高度异质性,需要开发能够区分并靶向特定亚群的更精细策略,以避免非靶向细胞的损伤或不良反应^[67]。

为有效应对上述挑战,未来的研究应重点关注以下方向。首先,递送系统的智能化与多功能化是关键,需要结合仿生设计、环境响应性材料和物理场调控等手段,构建能够在体内复杂微环境中感知并响应特定信号(如低pH、高酶浓度、缺氧、超声/光照)的多功能纳米载体^[68-69]。这些系统应具备高载荷能力、优异的体内稳定性、高效的靶向性以及有效的胞内/核内递送能力,以实现精准递送和按需释放^[68]。同时,基因编辑工具的精准性与可控性仍需持续优化。这包括进一步开发和应用脱靶率更低的Cas变体、优化向导RNA设计原则,或探索基于抗体/适配体介导的Cas蛋白特异性递送^[68,70-71];对于碱基编辑和RNA编辑,需要深入研究其编辑偏好性和脱靶机制,开发更高特异性的编辑器和向导分子,并探索可诱导或瞬时表达的编辑系统,以实现更严格的时空控制,降低长期表达带来的风险^[72-73]。为了进一步提高基因修饰的效率和特异性,利用单细胞技术深入解析巨噬细胞异质性至关重要。结合单细胞RNA测序、单细胞表观遗传组学等技术,深入解析不同组织、不同疾病状态下巨噬细胞亚群的分子特征,将为设计亚群特异性的靶向配体、启动子或编辑工具提供数据基础,实现更精细的细胞亚群靶向修饰^[74-75]。此外,探索整合性治疗策略是提升疗效的重要途径。将基因修饰与现有疗法(如免疫检查点抑制剂、化疗、物理治疗)相结合,有望发挥协同效应,比如通过基因修饰将肿瘤微环境中的肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs)重编程为促进免疫的M1表型,以期增强肿瘤免疫治疗

效果。ZHAO等^[76]研发的X射线引导和触发的原位CRISPR/Cas9基因编辑纳米系统(x-ray-guided and triggered remote control of a CRISPR/Cas9 genome editing system, X-CC9)利用X射线的穿透性和局部可控性,实现对TAMs的精准基因编辑,为该思路提供了一个具体范例。

综上,RAW264.7巨噬细胞基因修饰技术正以前所未有的速度发展,为理解巨噬细胞功能和开发新型细胞疗法提供了强大支撑。通过持续的技术创新和多学科交叉研究,有望克服当前挑战,充分发挥基因修饰RAW264.7巨噬细胞在疾病治疗中的巨大潜力。

参考文献 (References)

- PERUN A, GEBICKA M, BIEDRON R, et al. The CD36 and SR-A/CD204 scavenger receptors fine-tune *Staphylococcus aureus*-stimulated cytokine production in mouse macrophages [J]. *Cell Immunol*, 2022, 372: 104483.
- XU J, ZHENG B, ZHANG S, et al. Copper sulfide nanoparticle-redirected macrophages for adoptive transfer therapy of melanoma [J]. *Adv Funct Mater*, 2021, 31(11): 2008022.
- KING C R, TESSIER T M, DODGE M J, et al. Inhibition of human Adenovirus replication by the importin α/β 1 nuclear import inhibitor ivermectin [J]. *J Virol*, 2020, 94(18): e00934-20.
- WANG C, CHANG C, TZENG T, et al. Gene-editing by CRISPR-Cas9 in combination with anthracycline therapy via tumor microenvironment-switchable, EGFR-targeted, and nucleus-directed nanoparticles for head and neck cancer suppression [J]. *Nanoscale Horiz*, 2021, 6(9): 729-43.
- GHEIBIHAYAT S M, JAAFARI M R, HATAMIPOUR M, et al. Improvement of the pharmacokinetic characteristics of liposomal doxorubicin using CD47 biomimicry [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2021, 73(2): 169-77.
- MOHAMED M, ABU LILA A S, SHIMIZU T, et al. PEGylated liposomes: immunological responses [J]. *Sci Technol Adv Mater*, 2019, 20(1): 710-24.
- ZHOU X, HUANG D, WANG R, et al. Targeted therapy of rheumatoid arthritis via macrophage repolarization [J]. *Drug Deliv*, 2021, 28(1): 2447-59.
- TANG Y, TANG Z, LI P, et al. Precise delivery of nanomedicines to M2 macrophages by combining "Eat Me/Don't Eat Me" signals and its anticancer application [J]. *ACS Nano*, 2021, 15(11): 18100-12.
- JIA N, GAO Y, LI M, et al. Metabolic reprogramming of pro-inflammatory macrophages by target delivered roburic acid effectively ameliorates rheumatoid arthritis symptoms [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 280.
- SHEN L, FU S, CHEN Y, et al. Mannosylated polydopamine nanoparticles alleviate radiation-induced pulmonary fibrosis by targeting M2 macrophages and inhibiting the TGF- β 1/Smad3 signaling pathway [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2023, 227: 113353.
- HUANG J, HUANG C, YU L, et al. Bioinspired PROTAC-induced macrophage fate determination alleviates atherosclerosis [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2023, 44(10): 1962-76.
- CHEN L, DICKERHOFF J, SAKAI S, et al. DNA G-quadruplex in human telomeres and oncogene promoters: structures, functions, and small molecule targeting [J]. *Acc Chem Res*, 2022, 55(18): 2628-46.
- YAO J, ATASHEVA S, WAGNER N, et al. Targeted, safe, and efficient gene delivery to human hematopoietic stem and progenitor cells in vivo using the engineered AVID adenovirus vector platform [J]. *Mol Ther*, 2024, 32(1): 103-23.
- ZOU Y, SUN X, YANG Q, et al. Blood-brain barrier-penetrating single CRISPR-Cas9 nanocapsules for effective and safe glioblastoma gene therapy [J]. *Sci Adv*, 2022, 8(16): eabm8011.
- GOKSEN S, VARAN G, BILENSOY E, et al. Folate receptor beta (FRbeta) expression on myeloid cells and the impact of reticuloendothelial system on folate-functionalized nanoparticles' biodistribution in cancer [J]. *Mol Pharm*, 2024, 21(9): 4688-99.
- GAO W Y, MA G L. Nanomedicine strategies for remodulating tumor-associated macrophages [J]. *Int J Biomed Eng*, 2023, 46(5): 384-9.
- LI W, JIN Q, ZHANG L, et al. Ultrasonic microbubble cavitation deliver Gal-3 shRNA to inhibit myocardial fibrosis after myocardial infarction [J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(3): 721.
- CHARI N S, CHEN C, RAMASAMY T, et al. Abstract PO-057: Systemic delivery of miR-27a using ultrasound-targeted microbubble cavitation causes tumor regression [J]. *Clin Cancer Res*, 2023, 29(18_Supplement): 57.
- LI M, LI Y, ZHENG J, et al. Ultrasound-responsive nanocarriers with siRNA and Fe(3)O(4) regulate macrophage polarization and phagocytosis for augmented non-small cell lung cancer immunotherapy [J]. *J Nanobiotechnology*, 2024, 22(1): 605.
- UMANA J D, WASSERMAN S R, SONG L, et al. Chemical epigenetic regulation of adeno-associated virus delivered transgenes [J]. *Hum Gene Ther*, 2023, 34(17/18): 947-57.
- LI X, HOU P, MA W, et al. SARS-CoV-2 ORF10 suppresses the antiviral innate immune response by degrading MAVS through mitophagy [J]. *Cell Mol Immunol*, 2022, 19(1): 67-78.
- YOU Y, GRASSO E, ALVERO A, et al. Twist1-IRF9 interaction is necessary for IFN-stimulated gene anti-Zika viral infection [J]. *J Immunol*, 2023, 210(12): 1899-912.
- CORCES M R, GRANJA J M, SHAMS S, et al. The chromatin accessibility landscape of primary human cancers [J]. *Science*, 2018, 362(6413): eaav1898.
- WANG C, CHANG C, WU S. Differential DNA methylation in allergen-specific immunotherapy of asthma [J]. *Cell Mol Immunol*, 2020, 17(9): 1017-8.
- AHMADI P, DOYLE D, MOJARAD N, et al. Effects of micro- and nanoplastic exposure on macrophages: a review of molecular and cellular mechanisms [J]. *Toxicol Mech Methods*, 2025, doi: 10.1080/15376516.2025.2500546.
- YANG Y, NAGAI S, KANG S, et al. Tolerogenic properties of CD206⁺ macrophages appeared in the sublingual mucosa after repeated antigen-painting [J]. *Int Immunol*, 2020, 32(8): 509-18.
- LAN H, ZHOU Z, HU Q, et al. Apoptotic body based biomimetic hybrid nanovesicles to attenuate cytokine storms for sepsis treatment [J]. *J Nanobiotechnology*, 2024, 22(1): 775.

- [28] ZHANG H, HUO Y, ZHENG W, et al. Silencing of SIRP α enhances the antitumor efficacy of CAR-M in solid tumors [J]. Cell Mol Immunol, 2024, 21(11): 1335-49.
- [29] JI X, QIAN X, LUO G, et al. Engineered macrophage nanoparticles enhance microwave ablation efficacy in osteosarcoma via targeting the CD47-SIRP α axis: a novel biomimetic immunotherapeutic approach [J]. Bioact Mater, 2025, 47: 248-65.
- [30] HOSSAIN M J, O'CONNOR T J. An efficient and cost-effective method for disrupting genes in RAW264.7 macrophages using CRISPR-Cas9 [J]. PLoS One, 2024, 19(3): e299513.
- [31] YUAN Q, ZENG H, DANIEL T C, et al. Orthogonal and multiplexable genetic perturbations with an engineered prime editor and a diverse RNA array [J]. Nat Commun, 2024, 15(1): 10812.
- [32] YEE K K L, MOROOKA N, SATO T. An *in vitro* modelling of resolving macrophage with Raw 264.7 macrophage cell line [J]. bioRxiv, 2024, doi: 10.1101/2024.09.12.612654.
- [33] PATHAK J L, FANG Y, CHEN Y, et al. Downregulation of macrophage-specific Act-1 intensifies periodontitis and alveolar bone loss possibly via TNF/NF-kappaB signaling [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 628139.
- [34] JIN Q, LIU X, ZHUANG Z, et al. Doxycycline-dependent Cas9-expressing pig resources for conditional *in vivo* gene nullification and activation [J]. Genome Biol, 2023, 24(1): 8.
- [35] KUBIAK A M, CLAESSEN L, ZHANG Y, et al. Refined control of CRISPR-Cas9 gene editing in *Clostridium sporogenes*: the creation of recombinant strains for therapeutic applications [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1241632.
- [36] LI Y, WANG H, ZHANG L, et al. Efficient genome editing in *Bacillus licheniformis* mediated by a conditional CRISPR/Cas9 system [J]. Microorganisms, 2020, 8(5): 754.
- [37] HAN J P, KIM M, CHOI B S, et al. *In vivo* delivery of CRISPR-Cas9 using lipid nanoparticles enables antithrombin gene editing for sustainable hemophilia A and B therapy [J]. Sci Adv, 2022, 8(3): eabj6901.
- [38] SAHEL D K, SALMAN M, AZHAR M, et al. Cationic lipopolymeric nanoplexes containing the CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein for genome surgery [J]. J Mater Chem B, 2022, 10(37): 7634-49.
- [39] SHUI S, WANG S, LIU J. Systematic investigation of the effects of multiple SV40 nuclear localization signal fusion on the genome editing activity of purified SpCas9 [J]. Bioengineering, 2022, 9(2): 83.
- [40] SHELAK E R M, PRAMANIK D, KIM J. Improved dual base editor systems (iACBEs) for simultaneous conversion of adenine and cytosine in the bacterium *Escherichia coli* [J]. mBio, 2023, 14(1): e229622.
- [41] NEUGEBAUER M E, HSU A, ARBAB M, et al. Evolution of an adenine base editor into a small, efficient cytosine base editor with low off-target activity [J]. Nat Biotechnol, 2023, 41(5): 673-85.
- [42] WEI Y, XU C, FENG H, et al. Human cleaving embryos enable efficient mitochondrial base-editing with DdCBE [J]. Cell Discov, 2022, 8(1): 7.
- [43] CHAN W, GOTTSCHALK R A, YAO Y, et al. Efficient immune cell genome engineering with enhanced CRISPR editing tools [J]. ImmunoHorizons, 2021, 5(2): 117-32.
- [44] PARK J, KIM K, JANG H, et al. Transition substitution of desired bases in human pluripotent stem cells with base editors: a step-by-step guide [J]. Int J Stem Cells, 2023, 16(2): 234-43.
- [45] MURPHY H, FLANNERY B, LY H. Beyond cancer: a new innate immune regulatory mechanism against virus infections [J]. J Med Virol, 2023, 95(4): e28760.
- [46] BOOTH B J, NOURREDDINE S, KATREKAR D, et al. RNA editing: expanding the potential of RNA therapeutics [J]. Mol Ther, 2023, 31(6): 1533-49.
- [47] PU S, CHENG T, CHENG H. Advances in RNA editing in hematopoiesis and associated malignancies [J]. Blood, 2025, doi: 10.1182/blood.2024027379.
- [48] WANG L, SUN Y, SONG X, et al. Hepatitis B virus evades immune recognition via RNA adenosine deaminase ADAR1-mediated viral RNA editing in hepatocytes [J]. Cell Mol Immunol, 2021, 18(8): 1871-82.
- [49] GAO B, WANG X, WANG M, et al. "Intercellular mass transport" mimic enables ASO entry completely into the cell nucleus for enhanced ischemia therapy [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2023, 15(10): 12777-86.
- [50] REAUTSCHNIG P, WAHN N, WETTENGEL J, et al. CLUSTER guide RNAs enable precise and efficient RNA editing with endogenous ADAR enzymes *in vivo* [J]. Nat Biotechnol, 2022, 40(5): 759-68.
- [51] JAUREGUI-MATOS V, JACOBS O, OUYE R, et al. Site-specific regulation of RNA editing with ribose-modified nucleoside analogs in ADAR guide strands [J]. Nucleic Acids Res, 2024, 52(12): 6733-47.
- [52] LIN S, CHEN S C. RNA editing in glioma as a sexually dimorphic prognostic factor that affects mRNA abundance in fatty acid metabolism and inflammation pathways [J]. Cells, 2022, 11(7): 1133.
- [53] BRANNAN K W, CHAIM I A, MARINA R J, et al. Robust single-cell discovery of RNA targets of RNA-binding proteins and ribosomes [J]. Nat Methods, 2021, 18(5): 507-19.
- [54] TAN R Z, DING H, LI J C, et al. Astragalus mongholicus Bunge and Panax Notoginseng Formula (A&P) combined with Bifidobacterium contribute a renoprotective effect in chronic kidney disease through inhibiting macrophage inflammatory response in kidney and intestine [J]. Front Physiol, 2020, 11: 583668.
- [55] LEUS N G J, VAN DEN BOSCH T, VAN DER WOUDE P E, et al. HDAC1-3 inhibitor MS-275 enhances IL10 expression in RAW264.7 macrophages and reduces cigarette smoke-induced airway inflammation in mice [J]. Sci Rep, 2017, 7: 45047.
- [56] CHIRIVI R G S, VAN ROSMALEN J W G, VAN DER LINDEN M, et al. Therapeutic ACPA inhibits NET formation: a potential therapy for neutrophil-mediated inflammatory diseases [J]. Cell Mol Immunol, 2021, 18(6): 1528-44.
- [57] ZHANG Y, DONG Z, SONG W. NLRP3 inflammasome as a novel therapeutic target for Alzheimer's disease [J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1): 37.
- [58] HANSCHMANN E, BERNDT C, HECKER C, et al. Glutaredoxin 2 reduces asthma-like acute airway inflammation in mice [J]. Front Immunol, 2020, 11: 561724.
- [59] SHEN T, YANG S, QU X, et al. A bionic "Trojan horse"-like gene delivery system hybridized with tumor and macrophage cell membrane for cancer therapy [J]. J Control Release, 2023, 358: 204-18.
- [60] MARTINEZ JUNIOR A M, LIMA A M F, MARTINS G O, et al.

- Impact of degree of ionization and PEGylation on the stability of nanoparticles of chitosan derivatives at physiological conditions [J]. *Mar Drugs*, 2022, 20(8): 505.
- [61] TABRIZI S J, ESTEVEZ-FRAGA C, VAN ROON-MOM W M C, et al. Potential disease-modifying therapies for Huntington's disease: lessons learned and future opportunities [J]. *Lancet Neurol*, 2022, 21(7): 645-58.
- [62] GLASER V, FLUGEL C, KATH J, et al. Combining different CRISPR nucleases for simultaneous knock-in and base editing prevents translocations in multiplex-edited CAR T cells [J]. *Genome Biol*, 2023, 24(1): 89.
- [63] LEE J, LIM K, KIM A, et al. Prime editing with genuine Cas9 nickases minimizes unwanted indels [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 1786.
- [64] EVANS C H. The vicissitudes of gene therapy [J]. *Bone Joint Res*, 2019, 8(10): 469-71.
- [65] AMISTADI S, MAULE G, CICIANI M, et al. Functional restoration of a CFTR splicing mutation through RNA delivery of CRISPR adenine base editor [J]. *Mol Ther*, 2023, 31(6): 1647-60.
- [66] HOU P, FANG J, LIU Z, et al. Macrophage polarization and metabolism in atherosclerosis [J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(10): 691.
- [67] HE X, TAN S, SHAO Z, et al. Latitudinal and longitudinal regulation of tissue macrophages in inflammatory diseases [J]. *Genes Dis*, 2022, 9(5): 1194-207.
- [68] ALLEMAILEM K S, ALMATROODI S A, ALMATROUDI 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 [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(8): 7421.
- [69] HE S, DU Y, TAO H, et al. Advances in aptamer-mediated targeted delivery system for cancer treatment [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 238: 124173.
- [70] HILLARY V E, CEASAR S A. A review on the mechanism and applications of CRISPR/Cas9/Cas12/Cas13/Cas14 proteins utilized for genome engineering [J]. *Mol Biotechnol*, 2023, 65(3): 311-25.
- [71] FENG S, WANG Z, LI A, et al. Strategies for high-efficiency mutation using the CRISPR/Cas system [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 803252.
- [72] ROSELLO M, SERAFINI M, CONCORDET J, et al. Precise mutagenesis in zebrafish using cytosine base editors [J]. *Nat Protoc*, 2023, 18(9): 2794-813.
- [73] NADAKUDUTI S S, ENCISO-RODRIGUEZ F. Advances in genome editing with CRISPR systems and transformation technologies for plant DNA manipulation [J]. *Front Plant Sci*, 2020, 11: 637159.
- [74] WANG Z, WU Z, WANG H, et al. An immune cell atlas reveals the dynamics of human macrophage specification during prenatal development [J]. *Cell*, 2023, 186(20): 4454-71.
- [75] BARREBY E, CHEN P, AOUDI M. Macrophage functional diversity in NAFLD-more than inflammation [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2022, 18(8): 461-72.
- [76] ZHAO C, CHENG Y, HUANG P, et al. X-ray-guided in situ genetic engineering of macrophages for sustained cancer immunotherapy [J]. *Adv Mater*, 2023, 35(14): e2208059.