



CRISPR/Cas9系统: 一种强大的在体基因治疗工具

张晓辉, 王立人, 刘明耀*, 李大力*

华东师范大学生命科学学院上海市调控生物重点实验室生命医学研究所, 上海 200241

* 联系人, E-mail: myliu@bio.ecnu.edu.cn; dlli@bio.ecnu.edu.cn

收稿日期: 2017-09-20; 接受日期: 2017-09-28; 网络版发表日期: 2017-11-16

摘要 CRISPR/Cas9作为一个通用的基因编辑工具, 已被广泛应用于原核和真核基因组的精确改造, 极大地推动了基础和应用研究的发展, 如何利用该技术进行疾病的治疗更是倍受关注. 最近, 大量研究表明, CRISPR/Cas9介导的基因编辑在基因治疗方面展现了极大的潜力. 本文综述了CRISPR/Cas9在动物模型中通过不同策略开展基因治疗研究的现状, 在此基础上讨论了未来发展前景及临床应用中面临的挑战.

关键词 CRISPR/Cas9, 基因治疗, 体内, 体外

CRISPR (clustered, regularly interspaced, palindromic repeats)/Cas系统是细菌或古细菌中以RNA导向核酸内切酶以清除外源DNA或RNA的一种获得性免疫防御体系. 经过改造的CRISPR/Cas系统被广泛用于原核及真核基因组DNA的精确改造^[1,2]. 其中, 来源于酿脓链球菌的CRISPR/Cas9 (*Streptococcus pyogenes*, SpCas9)系统通过一条与靶点DNA序列配对的单链导向RNA (sgRNA)与Cas9形成复合物, 精准地靶向特异DNA位点而产生双链断裂(double strand breaks, DSBs). DSBs一般通过非同源末端连接(non-homologous end-joining, NHEJ)进行易错修复或者在提供同源修复模板的情况下进行精确同源重组修复(homology-directed repair, HDR)^[3]. 对Cas9核酸内切酶的深入研究表明, 能在双链DNA中一条链上形成缺口的Cas9突变体(Cas9n)也可以用于增强同源重组. 而内切酶活性完全缺失的Cas9 (dCas9)仍能在sgRNA的作用下与特定DNA序列结合, 被广泛用于基因表达的沉默或者增强^[4,5]. 除此之外, Cas9家族另

一个成员——来源于金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)更短的saCas9 (1053 AA), 因其序列较短更容易被腺相关病毒(AAV)包装, 在基因治疗方面倍受青睐. 同时, saCas9与spCas9有不同的PAM (protospacer adjacent motif)识别位点, 更进一步拓展了其靶向空间^[6]. CRISPR/Cas9系统作为一个强大的基因编辑技术, 已被广泛地用于疾病模型、材料科学、新药研发和基因治疗等领域^[7-10].

基因治疗最初被定义为将遗传物质(包括DNA, RNA等)引入病人的细胞或组织中以缓解疾病进一步发展或者治愈相关疾病^[11,12]. 传统的基因治疗一般是通过不同的方法将功能cDNA递送到细胞或者组织中以替代功能缺陷的突变基因^[13]. 尽管有一些基因治疗药物已经被批准用于临床或者临床试验中且取得了令人欣慰的效果, 但其中两个主要困扰依然存在: (i) 由重组病毒载体介导的外源基因的随机插入可能会对机体造成致病的不确定性; (ii) 如何保证外源导入的基因在机体内的长效性^[11,12,14]. 除此之外, 一些由功能性

引用格式: 张晓辉, 王立人, 刘明耀, 等. CRISPR/Cas9系统: 一种强大的在体基因治疗工具. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 1151–1158, doi: 10.1360/N052017-00208

英文版见: Zhang X H, Wang L R, Liu M Y, et al. CRISPR/Cas9 system: a powerful technology for *in vivo* and *ex vivo* gene therapy. Sci China Life Sci, 2017, 60: 468–475, doi: 10.1007/s11427-017-9057-2

获得的突变造成的疾病很难利用转基因手段进行治疗. ZFNs (Zinc finger endonucleases), TALENs (transcription activator-like effectors endonucleases)和CRISPR/Cas9等基因编辑工具的发展使研究者们能够精确地敲除致病基因或者插入功能性基因以治疗基因缺陷引起的疾病. 尽管利用ZFNs和TALENs也能够达到对目的基因进行精确编辑, 但CRISPR/Cas9系统凭借其简单、高效和灵活的特性, 已经成为目前最有潜力的基因编辑工具.

最近研究表明, CRISPR/Cas9系统能够有效地编辑一些致病基因, 并在疾病模型的治疗中取得了良好的效果. 其中, Schwank等人^[15]利用了由囊性纤维化跨膜受体*Cftr*基因突变而引起的囊性纤维化病人中分离培养的小肠类器官作为研究模型, 将含有靶向*Cftr*突变位点的CRISPR/Cas9系统和带有修复模板的载体导入小肠类器官细胞中, 成功地培养出了基因校正后的类器官, 并具有正常的功能. 3D培养的小肠类器官已经被证明可在体外培养长达数月甚至数年, 并且具备遗传稳定性, 说明自体移植经过基因修正后的类器官在基因和细胞治疗方面的良好前景. 另外, 李劲松研究组^[16]利用了带有*Crygc*基因突变的白内障小鼠(*Mus musculus*)作为研究模型, 将含有靶向突变的*Crygc*基因的CRISPR/Cas9系统和修复模板导入受精卵中, 能够成功地产生一部分健康的小鼠. 其后, 该研究组^[17]利用CRISPR/Cas9精确修正了来源于白内障小鼠的精原干细胞的突变进而产生健康的后代. 其后, 类似的研究也证明了利用CRISPR/Cas9系统在杜氏肌营养不良小鼠模型(*mdx*)的受精卵内进行修正致病的点突变而治疗杜氏肌营养不良病变^[18]. 这些利用CRISPR/Cas9修正生殖细胞或者受精卵遗传突变造成的基因缺陷疾病由于伦理原因尚不能被用于临床以治疗人类疾病.

受此启示, 科学家们不断改进基因编辑技术, 在动物模型上开展在体的基因治疗(表1). 本文主要综述了近几年利用CRISPR/Cas9系统在动物模型上进行基因治疗的研究进展.

1 出生后动物基因治疗研究现状

目前, 体内和体外基因治疗已经被用于在体治疗动物疾病模型(表1). 体内基因治疗是通过系统或局部注射治疗载体(通常为腺相关病毒)到局部和多个器官

组织中进而产生治疗效果(图1A)^[3]. 体外基因治疗被定义为将病人细胞进行体外分离培养并以基因修饰用于自体移植. 其中, 经基因修饰的细胞必须能够在机体外培养扩增, 并能在移植回机体后进行增殖并发挥功能(图1B)^[3]. 尽管有些疾病已通过ZFNs介导的编辑技术达到了治疗效果, 但CRISPR/Cas9系统因其简单、高效和灵活, 已经尝试在不同疾病模型中采用不同的策略进行治疗.

1.1 通过CRISPR/Cas9系统介导的基因敲除进行基因治疗

相对于其他基因编辑技术, CRISPR/Cas9系统在目的基因上产生双链断裂更加高效. 第一个利用CRISPR/Cas9系统用于在体基因治疗研究的是通过靶向敲除*Pcsk9*基因以降低细胞中胆固醇含量, 被认为是治疗代谢综合征的潜在靶点. 据研究报道, *Pcsk9*功能性缺失可以降低病人患心脏病风险. 科学家们发现在基因失活的纯合子人群中, 其体内的低密度脂蛋白含量减少了80%, 并且该突变并未在临床上的显现出任何副作用^[35]. 研究表明, 通过眼球后注射包含靶向*Pcsk9*基因的CRISPR/Cas9系统的AAV病毒载体, 在小鼠肝脏细胞中产生了50%的*Pcsk9*突变, *Pcsk9*表达水平下降了90%, 同时细胞质中胆固醇含量也下降了35%~40%^[20]. 尽管并不清楚在人体中敲除*Pcsk9*基因是否会造成其他副作用, 但这是科学家第一次证明了利用CRISPR/Cas9系统介导的基因敲除进行基因治疗的可行性. 对于冠心病患者, 他们有许多可选的药物用于疾病治疗, 因此他们可能会由于不确定的副作用而不选择基因治疗的方式. 但是对于大部分患有遗传性疾病的病人, 可供选择的治疗方式十分有限. 与上述基因治疗策略类似, 老年性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)是一个在成年人中引起失明的主要病因之一, 它由*Vegfa*基因过表达引起^[29]. 靶向敲除小鼠视网膜色素上皮细胞(retinal pigment epithelium, RPE)中*Vegfa*可以降低VEGFA表达水平至发病的临界值以下. Kim研究组^[26]根据AMD的发病机理, 通过用Cas9蛋白复合物靶向敲除AMD小鼠模型的*Vegfa*可以有效地降低脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)中VEGFA蛋白的表达水平达58%±4%, 从而有效地治疗AMD.

除了在编码区和调控区的碱基缺失、插入或替换

表 1 利用 CRISPR/Cas9 进行体内和体外基因治疗的疾病模型^{a)}

疾病	物种	递送系统	递送方法	治疗效率	脱靶	参考文献
I 型酪氨酸血症	Fah ^{-/-} 小鼠	pX330 质粒, ssDNA oligo	尾静脉注射	0.4%	<0.3%	[19]
冠心病	小鼠	腺病毒(表达 Cas9 和一个 sgRNA)	尾静脉注射	35%~40%	无	[20]
I 型酪氨酸血症	Fah ^{-/-} 小鼠	纳米递送 Cas9mRNA; 腺相关病毒递送 sgRNA, 重组模板	系统注射	>6%	<0.3%	[21]
高血氨症	新生 spf ^{ash} 小鼠	腺相关病毒: 一个表达 SaCas9; 一个表达 sgRNA, 重组模板	静脉注射	10%	无	[22]
DMD	mdx 小鼠	腺相关病毒: 一个表达 SaCas9; 一个表达 sgRNA	肌肉注射	~2%	<1%	[23]
DMD	新生 mdx 小鼠	腺相关病毒: 一个表达 SpCas9; 一个表达 sgRNA	腹膜内注射; 肌肉注射; 眼眶注射	1.8%±1.2%, 25.5%±2.9%, 6.1%±3.2%	无	[24]
DMD	mdx 小鼠	腺相关病毒: 一个表达 SaCas9; 一个表达 sgRNA	肌肉注射	39%±1.8%	未检测	[25]
视网膜营养不良	转基因大鼠(<i>Rattus norvegicus</i>)	Px330 质粒	单侧视网膜下注射后进行电刺激	100%	无	[26]
B 型血友病	F9 突变小鼠	px458, 模板: ssODN 或质粒	尾静脉注射	0.56%	未检测	[27]
Prkag2 心脏综合征	H530R 转基因和基因敲入小鼠	腺相关病毒: 一个表达 SpCas9; 一个表达 sgRNA	尾静脉或心室内注射	20%~40%	0.09%~0.48%	[28]
AMD	AMD 小鼠	Cas9 蛋白与 sgRNA 的复合物	视网膜下注射	58%±4%	无	[29]
I 型酪氨酸血症	Fah ^{-/-} 小鼠	Px330	尾静脉注射	99%	<2.82	[30]
色素性视网膜炎	(RCS) rat	腺相关病毒: 一个表达 SpCas9; 一个表达 sgRNA 并带有 HITI 的模板	视网膜下注射	4.5%	无	[31]
A 型血友病	F8 缺陷的 A 型血友病小鼠	校正的 iPSc 并分化的内皮细胞	皮下注射到后肢	~30%	无	[32]
镰状细胞疾病	NSG 小鼠	CRISPR/Cas9 编辑的野生的 CD34 ⁺ 造血干细胞	异种移植	37%±21%	无	[33]
β-血红蛋白病	NSG 小鼠	CRISPR/Cas9 编辑的并带有 GFP ⁺ 或 tNGFR ⁺ 造血干细胞	异种移植	49% (GFP+HSCs); 84% (tNGFR+HSCs)	未检测	[34]

a) DMD: 杜氏肌营养不良; AMD: 老年性黄斑变性; NSG: NOD/SCID/IL-2rg^{null}; iPSc: 诱导多能干细胞; WT: wild type, 野生型; RCS: royal college of surgeons; HITI: homology-independent targeted integration, 非同源靶向整合

而造成的功能性缺失会损害基因功能, 功能获得性突变导致基因表达亢奋也会引起基因功能的紊乱. 相对于其他策略, 利用 CRISPR/Cas9 系统的敲除功能性获得性突变更加简单. 色素性视网膜炎(retinitis pigmentosa, RP)是一种由 *Rho* 基因上功能获得性突变造成的遗传性退行性眼部疾病. 最近, 通过电穿孔技术向带有 *Rho*

基因 S334ter-3 突变的 RP 大鼠模型的视网膜细胞中递送了 CRISPR/Cas9 质粒, 与对照组相比, 纠正了 36% 的突变基因, 提高了 35% 的视觉能力^[26]. 另一个研究中, 他们通过用腺相关病毒递送 CRISPR/Cas9 系统敲除带有 H530R 突变的 *Prkag2* 基因, 成功治疗了心脏综合征小鼠. 尽管在该位点仅产生了 6.2% 的突变, 但心脏综

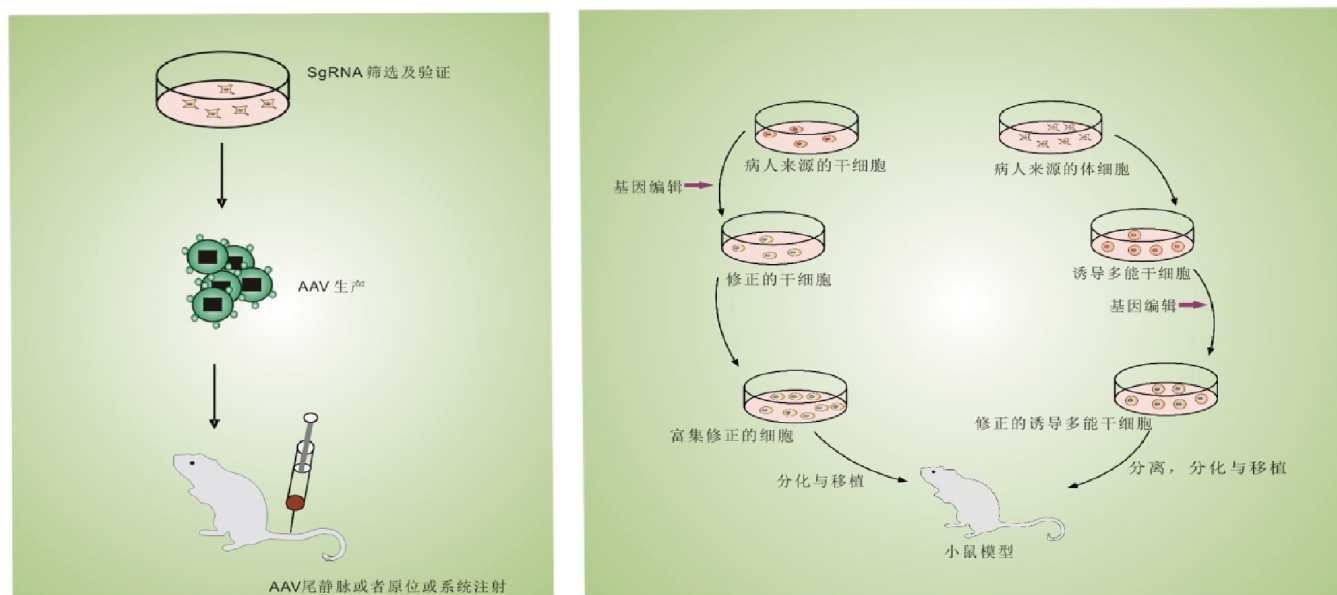


图1 当前利用CRISPR/Cas9基因治疗的策略原理图(网络版彩图)

A: 体内; B: 体外

合征小鼠心脏表型及功能均得到显著改善^[28]。值得注意的是, 以上两种疾病的突变位点附近存在一个活性的sgRNA, 从而使得CRISPR/Cas9系统能够有效地靶向突变基因而不影响野生型基因。

对于无义突变产生的疾病, 敲除提前出现的终止密码子使得被破坏的基因重新读通或者产生有部分氨基酸缺失但有功能的蛋白是治疗此类疾病的常用的治疗策略。在*mdx*小鼠中, 在抗肌肉萎缩蛋白基因的23号外显子上存在提前出现的终止密码子。抗肌萎缩蛋白在人类中是一个由3677个氨基酸构成的蛋白质, 其中一些氨基酸缺失对于它的功能发挥并不是很重要。在2015年, 3篇背靠背地发表在*Science*上的研究报告表明^[23-25], 通过递送AAV病毒装载的CRISPR/Cas9系统对突变的23号外显子进行敲除使得基因通读, 可以部分恢复基因功能。最近, Bengtsson等人^[36]做了类似的研究, 他们对比了一个(Δ exon53)或多个外显子敲除(Δ exon52,53)或同源重组介导的基因校正由53号外显子无义突变引起的杜氏肌营养不良症。通过原位和系统导入CRISPR/Cas9系统至杜氏肌营养不良症小鼠中, 小鼠抗萎缩蛋白得到广泛表达, 并显著改善了肌营养不良形态学和病理学表型。因此, 这些研究表明利用CRISPR/Cas9系统对致病基因进行敲除或校正提前出现的终止密码子在骨骼和心肌疾病的疾病模型

中有着显著的治疗效果, 充分展示了CRISPR/Cas9用于临床治疗杜氏肌营养不良病人的光明前景。

尽管上文提到的“敲除法”简单有效, 但它仍然存在局限性。首先, 只有少数基因上含有可以被安全敲除的不重要的外显子; 其次, 像上文提到的*Pcsk9*等这些可敲除的基因, 可能发挥着目前尚不清楚的功能, 它们在机体内的重要性仍然有待研究; 最后, 对于显性突变的疾病, 该疗法只对于杂合子突变的病人有效, 因为同时对两个等位基因都进行敲除可能会造成一些不确定的疾病。

1.2 通过CRISPR/Cas9系统介导的精准修复进行基因治疗

基因编辑技术, 除了能够对突变基因进行敲除, 也能通过插入野生型基因或完整的CDS (coding sequence) 至安全位点(如AAVS1)从而达到对致病基因的修复。第一个实例由Yin等人^[19]完成, 他们在I型酪氨酸血症的小鼠模型上对编码延胡索酰乙酰乙酸盐水解酶的*Fah*基因进行修复, 挽救了其疾病表型。通过尾静脉向小鼠注射含有CRISPR/Cas9系统和带有野生型基因的修复模板对*Fah*基因的点突变进行了修复。尽管最初只有0.4%的肝脏细胞基因组被正确修复, 被修复的细胞可

以在肝脏中发挥正常的功能^[19]。同时,本研究组^[27]在B型血友病小鼠模型上尝试利用CRISPR/Cas9系统对其进行治疗。该研究在人类B型血友病谱系中发现了存在于F9基因上编码的共凝因子IX (FIX)的Y371D新型突变。根据该突变构建了一个新的B型血友病小鼠模型,并通过尾静脉注射利用CRISPR/Cas9系统和模板对该突变进行修复。通过注射质粒DNA后,0.56%~1.55%的肝脏细胞得到了修复,很大程度地缓解了小鼠的病情。同时发现,通过腺病毒载体递送CRISPR/Cas9系统和模板,使得修复效率提高到5.53%,但是由于腺病毒较高的毒性,该方式对于小鼠的病情缓解并未起到显著的治疗效果^[27]。本研究表明,以基因编辑为基础的原位修复治疗是一个可行的策略,同时递送系统的选择对于某些疾病也是非常重要的一个方面^[37]。为了能够包装进腺相关病毒, Yang等人^[22]从金黄色葡萄球菌中发现的更小的Cas9蛋白(saCas9)作为基因编辑工具。saCas9和sgRNA分别包装进两个AAV病毒载体,通过尾静脉注射至高血氨症小鼠模型体内,该方法以高达10%的修正率修复了鸟氨酸氨甲酰基转移酶的点突变。最近Yin等人^[21]也优化了他们治疗HTI模型方案,通过尾静脉注射纳米脂质体包裹的Cas9 mRNA和AAV病毒包裹的sgRNA,基因修复率由原先的0.4%提高到了6%。由于Cas9介导的HDR在体内的效率较低,目前,只有少数的基因缺陷疾病病症能够被改善。通过利用CRISPR/Cas9直接敲除肝脏中*Hpd*基因改变小鼠体内的I型酪氨酸血症代谢通路,在高酪氨酸血症小鼠模型的治疗中起到了比之前直接校正致病基因更好的治疗效果^[30]。此项研究也为其他类似的疾病提供了一个摆脱同源重组效率低下的治疗策略,即通过使部分疾病相关信号通路失活或许是一种更加有效的治疗策略。除此之外,在一新的研究当中, Belmonte和他的同事们利用非同源的靶向整合(homology-independent targeted integration, HITI)方法进行在体治疗色素性视网膜炎大鼠模型。结果表明, HITI的方式比非注射组和HDR方式有更好的治疗效果^[31]。同时,他们通过系统注射对比了HITI和HDR在体的敲入效率,发现HITI要比HDR的基因敲入效率明显偏高,分别为在肝脏中为~2% vs. 0.5%和在心脏中为~2.8% vs. 0.8%^[31]。因此, HITI方式或许是体内靶向基因替代治疗的可选方案。除此之外,另一个选择是增加CRISPR/Cas9修复的细胞数量并最终实现自体的移植和扩增。

1.3 通过CRISPR/Cas9系统介导的间接体外基因治疗

与体内治疗相比,体外治疗由于能够允许研究者对于被编辑的细胞进行筛选、分离和扩增。利用合适的方法,研究者可以去除脱靶细胞并扩增被修正的细胞用于移植。2015年, Kim研究组^[32]第一次利用CRISPR/Cas9系统对A型血友病病人的诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs) FVIII基因上600 kb碱基倒置进行修复。在移植了由修正的iPSCs细胞并分化的内皮细胞后, A型血友病小鼠模型的病情得到显著改善并且存活时间也显著延长。最近,一项研究利用了病人来源的细胞诱导生成的iPSCs细胞对 β -地中海贫血症进行治疗。iPSCs细胞经过CRISPR/Cas9系统进行了基因修正并且被分化成造血干细胞。造血干细胞被移植至重度免疫缺陷型NSG (NOD-scid-IL2Rg^{-/-})小鼠体内并分化为了包括表达人类 β -珠蛋白的细胞系。除此之外,被移植的造血干细胞在移植10周后并未出现任何的肿瘤发生迹象。这项研究为利用CRISPR/Cas9系统对iPSCs细胞进行细胞基因修正并将修正后的细胞分化为造血干细胞用于体内细胞治疗这一疗法提供了可行的证据^[38]。除了iPSCs细胞的研究,造血干细胞(hematopoietic stem/progenitor cells, HSPCs)也被用于体外治疗的研究。野生型CD34⁺HSPCs细胞通过CRISPR/Cas9系统和模板进行基因修正,之后被注射至NSG小鼠体内,被修正的细胞在小鼠体内能够在4个月内在骨髓处检测到CD45⁺细胞^[33]。最近,另一项类似的研究由Dever等人^[34]开展,有趣的是他们通过GFP或一个临床相关的报告基因*tNGFR*对于被修正的HSPCs进行了富集并移植,49% GFP⁺人类HSPCs基因和84% *tNGFR*⁺ HSPCs基因分别在NSG小鼠体内被检测到,并且具备较高的红细胞分化潜能,这显示了该方法在临床上治疗 β -地中海贫血症的巨大潜力。目前,只有经改造的iPSCs细胞和HSPCs细胞在经过改造后并移植至小鼠模型后可以对血液疾病进行治疗,因此,其他更多类型的适合于体外治疗的细胞类型需要进一步探究。

2 目前的挑战和展望

尽管大量通过CRISPR/Cas9系统进行体内基因治

疗的研究已被报道,同时临床试验也正在开展^[39],但是目前的DNA递送效率和原位修正效率仍然远达不到临床治疗的要求. AAV病毒载体由于其低致病性和免疫原性已被广泛运用于CRISPR/Cas9系统的递送. 另外,不同血清型的AAV病毒也可以针对不同的细胞进行递送. 但是由于慢病毒和腺病毒等其他的病毒载体在某些组织或细胞中的独特优势,并不能完全放弃使用. 例如,慢病毒对于HSCs细胞的基因转导效率更高^[40];而腺病毒基因组末端连接的蛋白会使得病毒载体有较低的随机整合及致病性. 除了病毒载体外,纳米粒子等非病毒载体也展示了在基因转导方面的优良特性^[21]. Yin等人在纳米粒子上成功递送Cas9 mRNA用于基因治疗,展示了CRISPR/Cas9系统与其他学科(如材料)结合的巨大的发展潜力.

较低的HDR效率仍然是CRISPR/Cas9系统用于基因治疗的另一个阻碍. HITI为基础的基因治疗或许一定程度上可以绕过HDR效率低的劣势. 另外,在HTI小鼠模型中,被修正的细胞如果具有增殖优势,则可以在体内进行扩增. Nygaard等人^[41]通过敲低酪氨酸代谢中4-羟基苯丙酮酸双氧酶进而富集被修正的肝细胞. 他们的治疗方案永久改变宿主细胞的信号通路,因此,无法成为一个理想的基因治疗方法,但他们仍然为基因治疗研究提供了一些思路. 与体内基因治疗相比,间接体外治疗使得研究者可以通过抗生素抗性和荧光信号等方式对被改造的细胞进行筛选和扩增,多余的结构可以通过Cre重组酶和转座酶等基因工具进行删除. 另外,体外治疗更容易与其他技术相结合.

例如,类器官培养技术在自体器官移植方面的巨大的潜力;由于Cas9蛋白在细胞内降解很快,利用电穿孔技术对CRISPR蛋白复合体进行递送有很高的基因编辑效率和较低的脱靶效应^[42,43]. 除此之外,如SCR7^[44]和RS-1^[45]等一些化学小分子物质已被报道可以提高CRISPR/Cas9系统介导的体外HDR,而这些化合物能否用于临床治疗仍然有待进一步研究.

另外一个重要问题是利用CRISPR/Cas9在体及间接在体基因治疗存在潜在的脱靶效应,还有待进一步解决. 在全基因组范围内,CRISPR/Cas9导致的较高脱靶突变仍是其在生物医药和临床治疗上广泛应用的主要障碍之一^[46-49]. 然而,在现有运用CRISPR/Cas9进行基因治疗的研究中,脱靶效应则比较罕见(表1). 其可能的原因是脱靶检测的范围较小或者其运用的脱靶的检测方法不够客观准确. 因此,一个更加客观、灵敏的检测方法,如Digenome-seq^[50],GUIDE-seq^[51]等,有待被运用到临床转化前基因治疗的安全性评估以保证短期和长期的安全性.

总之,高效的CRISPR/Cas9系统在基因治疗中显示了巨大的潜力,正在给那些遭受无法治疗的疾病而受折磨的病人带来希望. 但同时也应该明白,每一个重大突破都是由一步步累积而来. 一个更高的HDR效率,一个更有效的递送系统,更低的脱靶效应都是不懈的追求. 一个好的解决方案是建立在各个技术相互交叉的基础上使得CRISPR/Cas9系统进一步优化. 一旦这些困难得到解决,相信这项技术将会被应用于病人的临床治疗.

参考文献

- 1 Mali P, Yang L, Esvelt K M, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339: 823–826
- 2 Cong L, Ran F A, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339: 819–823
- 3 Cox D B T, Platt R J, Zhang F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat Med*, 2015, 21: 121–131
- 4 Ran F A, Hsu P D, Lin C Y, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 2013, 154: 1380–1389
- 5 Ma H, Tu L C, Naseri A, et al. Multiplexed labeling of genomic loci with dCas9 and engineered sgRNAs using CRISPRainbow. *Nat Biotechnol*, 2016, 34: 528–530
- 6 Ran F A, Cong L, Yan W X, et al. *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*, 2015, 520: 186–191
- 7 Hsu P D, Lander E S, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 2014, 157: 1262–1278
- 8 Doudna J A, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 2014, 346: 1258096–1258096
- 9 Li D, Qiu Z, Shao Y, et al. Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 681–683
- 10 Zhang X H, Tee L Y, Wang X G, et al. Off-target effects in CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2015, 4: e264

- 11 Prakash V, Moore M, Yáñez-Muñoz R J. Current progress in therapeutic gene editing for monogenic diseases. *Mol Ther*, 2016, 24: 465–474
- 12 Kotterman M A, Schaffer D V. Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nat Rev Genet*, 2014, 15: 445–451
- 13 Friedmann T, Roblin R. Gene therapy for human genetic disease? *Science*, 1972, 175: 949–955
- 14 Naldini L. *Ex vivo* gene transfer and correction for cell-based therapies. *Nat Rev Genet*, 2011, 12: 301–315
- 15 Schwank G, Koo B K, Sasselli V, et al. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell*, 2013, 13: 653–658
- 16 Wu Y, Liang D, Wang Y, et al. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell*, 2013, 13: 659–662
- 17 Wu Y, Zhou H, Fan X, et al. Correction of a genetic disease by CRISPR-Cas9-mediated gene editing in mouse spermatogonial stem cells. *Cell Res*, 2015, 25: 67–79
- 18 Long C, McAnally J R, Shelton J M, et al. Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. *Science*, 2014, 345: 1184–1188
- 19 Yin H, Xue W, Chen S, et al. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 551–553
- 20 Ding Q, Strong A, Patel K M, et al. Permanent alteration of PCSK9 with *in vivo* CRISPR-Cas9 genome editing. *Circ Res*, 2014, 115: 488–492
- 21 Yin H, Song C Q, Dorkin J R, et al. Therapeutic genome editing by combined viral and non-viral delivery of CRISPR system components *in vivo*. *Nat Biotechnol*, 2016, 34: 328–333
- 22 Yang Y, Wang L, Bell P, et al. A dual AAV system enables the Cas9-mediated correction of a metabolic liver disease in newborn mice. *Nat Biotechnol*, 2016, 34: 334–338
- 23 Nelson C E, Hakim C H, Ousterout D G, et al. *In vivo* genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science*, 2016, 351: 403–407
- 24 Long C, Amoasii L, Mireault A A, et al. Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. *Science*, 2016, 351: 400–403
- 25 Tabebordbar M, Zhu K, Cheng J K W, et al. *In vivo* gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science*, 2016, 351: 407–411
- 26 Bakondi B, Lv W, Lu B, et al. *In vivo* CRISPR/Cas9 gene editing corrects retinal dystrophy in the S334ter-3 rat model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Mol Ther*, 2016, 24: 556–563
- 27 Guan Y, Ma Y, Li Q, et al. CRISPR/Cas9-mediated somatic correction of a novel coagulator factor IX gene mutation ameliorates hemophilia in mouse. *EMBO Mol Med* 2016, 8: 477–488
- 28 Xie C, Zhang Y P, Song L, et al. Genome editing with CRISPR/Cas9 in postnatal mice corrects PRKAG2 cardiac syndrome. *Cell Res*, 2016, 26: 1099–1111
- 29 Kim K, Park S W, Kim J H, et al. Genome surgery using Cas9 ribonucleoproteins for the treatment of age-related macular degeneration. *Genome Res*, 2017, 27: 419–426
- 30 Pankowicz F P, Barzi M, Legras X, et al. Reprogramming metabolic pathways *in vivo* with CRISPR/Cas9 genome editing to treat hereditary tyrosinaemia. *Nat Commun*, 2016, 7: 12642
- 31 Suzuki K, Tsunekawa Y, Hernandez-Benitez R, et al. *In vivo* genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature*, 2016, 540: 144–149
- 32 Park C Y, Kim D H, Son J S, et al. Functional correction of large factor VIII gene chromosomal inversions in hemophilia A patient-derived iPSCs using CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell*, 2015, 17: 213–220
- 33 DeWitt M A, Magis W, Bray N L, et al. Selection-free genome editing of the sickle mutation in human adult hematopoietic stem/progenitor cells. *Sci Transl Med*, 2016, 8: 360ra134–360ra134
- 34 Dever D P, Bak R O, Reinisch A, et al. CRISPR/Cas9 β -globin gene targeting in human haematopoietic stem cells. *Nature*, 2016, 539: 384–389
- 35 Abifadel M, Varret M, Rabès J P, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet*, 2003, 34: 154–156
- 36 Bengtsson N E, Hall J K, Odom G L, et al. Corrigendum: muscle-specific CRISPR/Cas9 dystrophin gene editing ameliorates pathophysiology in a mouse model for Duchenne muscular dystrophy. *Nat Commun*, 2017, 8: 16007
- 37 Nguyen T H, Anegón I. Successful correction of hemophilia by CRISPR/Cas9 genome editing *in vivo*: delivery vector and immune responses are the key to success. *EMBO Mol Med*, 2016, 8: 439–441
- 38 Ou Z, Niu X, He W, et al. The combination of CRISPR/Cas9 and iPSC technologies in the gene therapy of human β -thalassemia in mice. *Sci Rep*, 2016, 6: 32463
- 39 Cyranoski D. Chinese scientists to pioneer first human CRISPR trial. *Nature*, 2016, 535: 476–477
- 40 Wang C X, Sather B D, Wang X, et al. Rapamycin relieves lentiviral vector transduction resistance in human and mouse hematopoietic stem cells.

- [Blood](#), 2014, 124: 913–923
- 41 Nygaard S, Barzel A, Haft A, et al. A universal system to select gene-modified hepatocytes *in vivo*. [Sci Translational Med](#), 2016, 8: 342ra79–342ra79
- 42 Wang L, Shao Y, Guan Y, et al. Large genomic fragment deletion and functional gene cassette knock-in via Cas9 protein mediated genome editing in one-cell rodent embryos. [Sci Rep](#), 2015, 5: srep17517
- 43 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. *Nature*, 2017, 35: 431–434
- 44 Maruyama T, Dougan S K, Truttmann M C, et al. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of non-homologous end joining. [Nat Biotechnol](#), 2015, 33: 538–542
- 45 Song J, Yang D, Xu J, et al. RS-1 enhances CRISPR/Cas9-and TALEN-mediated knock-in efficiency. *Nat Commun*, 2016, 7: 10548
- 46 Pattanayak V, Lin S, Guilinger J P, et al. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. [Nat Biotechnol](#), 2013, 31: 839–843
- 47 Fu Y, Foden J A, Khayter C, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. [Nat Biotechnol](#), 2013, 31: 822–826
- 48 Kescu C, Arslan S, Singh R, et al. Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 677–683
- 49 Wu X, Scott D A, Kriz A J, et al. Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. [Nat Biotechnol](#), 2014, 32: 670–676
- 50 Kim D, Bae S, Park J, et al. Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells. [Nat Meth](#), 2015, 12: 237–243
- 51 Tsai S Q, Zheng Z, Nguyen N T, et al. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 187