

基因编辑技术及其临床应用

张 强, 顾明亮*

(聊城市人民医院转化医学研究联合实验室, 聊城 252000)

摘要: 基因编辑是利用核酸酶对内源性DNA或RNA进行准确且高效修饰的一种技术。锌指核酸酶(zinc finger nuclease, ZFN)、类转录激活因子效应核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)、规律成簇间隔的短回文重复相关蛋白技术(clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9, CRISPR/Cas9)和单碱基编辑(base editing, BE)技术以及精准编辑技术(prime editors, PE)的相继出现, 为基因功能研究提供了新工具, 也为疾病治疗提供了新策略。本文总结了基因编辑技术的发展以及在临床中的应用, 讨论了其在临床治疗中面临的机遇和挑战, 以期对基因编辑的临床转化提供参考。

关键词: 基因编辑技术; 基因治疗; 遗传病; 感染性疾病; 癌症

Gene editing technology and its clinical application

ZHANG Qiang, GU Mingliang*

(Joint Laboratory for Translational Medicine Research, Liaocheng City People's Hospital, Liaocheng 252000, China)

Abstract: Gene editing is a technology which utilizes nucleases to modify endogenous DNA or RNA accurately and efficiently. With the discovery and development of zinc finger nuclease (ZFN), transcription activator-like effector nuclease (TALEN), regular clustering of short palindrome repeats (CRISPR), single base editing (BE) techniques, and prime editors (PE) techniques, gene editing technologies provide new tools for the study of gene function, and also offer new strategies for the diagnosis and treatment of diseases. Gene editing shows a good application prospect in the gene therapy field of diseases. In this review, we summarize the development of gene editing technology and its application in disease diagnosis and treatment, and discuss the challenges and development prospects of gene editing technology in disease therapy, thereby providing references for its clinical transformation.

Key Words: gene editing technology; gene therapy; genetic disease; infectious disease; cancer

基因编辑是一种直接对遗传物质中的特定序列进行定点敲除、插入或突变的技术。最早的基因编辑技术为同源重组, 通过将外源DNA导入受体细胞, 目的基因取代原有基因, 促使特定基因失活或缺陷基因修复^[1]。随着对基因编辑技术的不断探索, 新型核酸酶的发现使基因编辑技术发生

了质的飞跃。基因编辑技术有锌指核酸酶技术(zinc finger nucleases, ZFNs)、类转录激活因子效应核酸酶技术(transcription activator-like effectors nucleases, TALENs)、规律成簇间隔的短回文重复相关蛋白技术[clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated

收稿日期: 20210929

基金项目: 国家自然科学基金项目(82000066)

第一作者: E-mail: qiangzhang17@yeah.net

*通信作者: E-mail: mingliangu@hotmail.com/guml@big.ac.cn

protein 9, CRISPR/Cas9]和单碱基编辑(base editor, BE)技术等^[2]。基因编辑技术的诞生与发展,不仅使其作为更精准、更高效的基因研究工具被开发,也因其重要作用在基因筛选、模型构建、机制研究中发挥了不可替代的独特作用,同时也为疾病治疗提供了新思路、新范式^[2-4]。

DNA作为遗传的物质基础得以证明之后,即拉开了从DNA层面认识疾病的序幕。“基因治疗(gene therapy)”这一概念也由此产生,即利用正常的外源基因取代患者的变异基因^[5]。与传统药物治疗需要长期服药相比,基因疗法的出现有望实现通过一次“给药”达到长期治疗的目的^[6]。但利用腺病毒、慢病毒等载体将正常外源基因导入患者体内的传统基因疗法不能直接解决突变基因的问题,仅作为一种替代疗法,其治疗时效性有待时间的考验,且具有潜在的致癌风险^[5,6]。基于核酸酶的基因编辑技术可对基因组进行针对性的定点剪切,可弥补传统基因疗法随机插入的不足,又具备特异性、高效性等优点,为疾病的基因治疗注入新希望。因此,未来基因编辑技术的应用将对生物医学研究与疾病治疗模式带来深刻变革。本文对基因编辑技术的发展及其在临床治疗中的应用进行概述,阐释基因编辑技术在临床应用中面临的挑战和未来前景。

1 基因编辑技术

核酸酶的发现使基因编辑工具不断完善,基因编辑技术也得以快速发展(图1)。ZFNs、TALENs和CRISPR/Cas9系统是基于核酸酶精确靶向诱导双链DNA断裂(double strand break, DSB),进而启动细胞内部修复机制,即易引起随机插入或缺失导致基因功能失活的异源末端连接(non-

homologous end joining, NHEJ)和依赖同源模板实现特定位点插入、缺失或碱基置换的同源重组修复(homology directed repair, HDR)^[7-9]。与ZFNs、TALENs和CRISPR/Cas9系统相比,BE技术不依赖同源模板,不引起DSB,更加高效、安全^[10-12](图1)。

1.1 ZFNs

1984年,从非洲爪蟾的转录因子中发现的锌指蛋白(zinc finger protein, ZFP)^[13]以及1992年从海床黄杆菌(*Flavobacterium okeanoikoites*)中发现的*Fok I*核酸内切酶^[14,15],为基因编辑技术的诞生奠定了分子基础。1996年, Kim等^[16]构建了基于ZFP和*Fok I*核酸内切酶的ZFNs技术(图2)。ZFP识别特异性的DNA序列,二聚化的*Fok I*核酸内切酶对DNA片段进行切割^[16,17]。Bibikova等^[18,19]将ZFNs注入果蝇胚胎,编辑其黄色基因[yellow(y) gene],导致约5.7%的雄性出现定向种系突变。DNA序列验证表明,ZFNs导致的缺失和/或插入精确地定位在设计的目标区域,这是第一次实现在动物中的基因编辑。2005年, Urnov等^[20]利用ZFNs在人类细胞中突变可引起严重联合免疫缺陷(severe combined immune deficiency, SCID)的*IL2Rg*基因进行靶向编辑,其基因修复效率达18%。由于锌指蛋白对上下游DNA序列具有依赖效应,其设计非常耗时耗力,筛选难度也随之增加,脱靶率较高,从而引发细胞毒性,这在一定程度上阻碍了其应用^[21,22]。毋庸置疑,ZFNs作为第一代基因编辑工具是开创性的,为基因编辑技术的发展奠定了基础。

1.2 TALENs

1989年,在黄单胞菌属(*Xanthomonas*)中发现的avrBs3蛋白可与宿主基因组结合并启动转录^[23]。2007年,avrBs3蛋白被命名为转录激活因子样效应

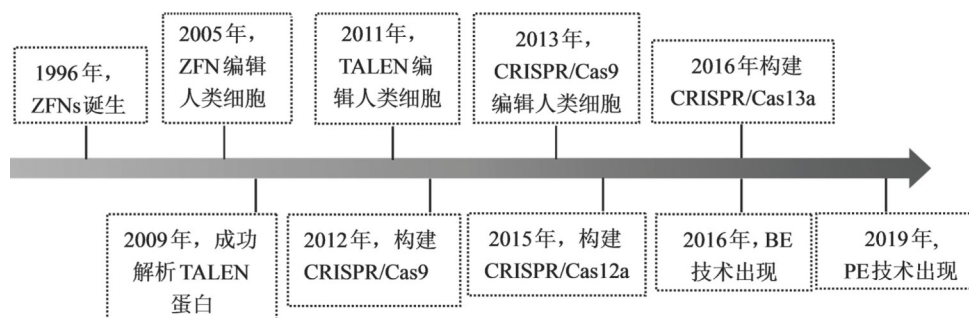


图1 基因编辑技术发展历程

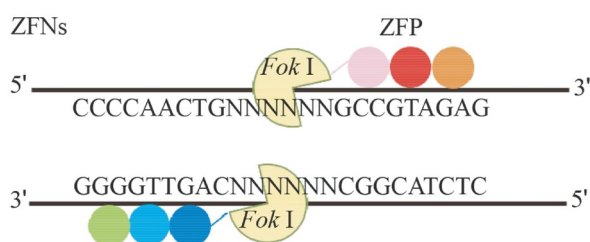


图2 ZFNs结构图

物(transcription activator-like effector, TALE)^[24,25]。2009年, TALE与DNA相互作用的分子机制被成功解析^[26,27]。通过TALE蛋白与Fok I 核酸内切酶的结合, TALENs技术正式出现, 成为新一代基因编辑工具^[28,29](图3)。TALE蛋白完成了DNA的识别结合功能, Fok I 核酸内切酶实现了DNA序列的切割^[30,31]。与ZFNs相比, TALENs的靶向识别性更高, 产生的细胞毒性更低^[32,33]。2011年, Miller等^[28]利用TALENs编辑人类细胞的NTF3和CCR5基因, 证明了TALENs的靶向修饰作用。TALENs的诞生, 为基因功能研究和基因疗法应用提供了有力工具。

1.3 CRISPR/Cas系统

1987年, Ishino等^[34]发现, 大肠杆菌的*iap*基因中含有29个碱基的高度同源重复序列。2002年, 这种重复序列被正式命名为CRISPR, 其附近存在保守的CRISPR相关基因(CRISPR associated, Cas)^[35]。Cas蛋白主要分为Class I 和Class II。

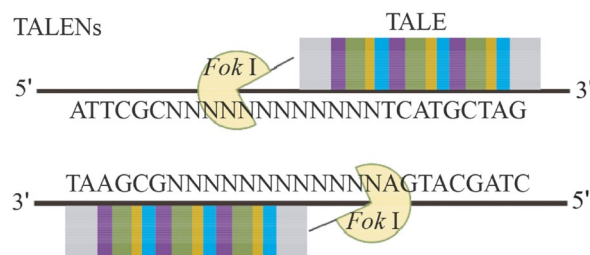


图3 TALENs结构图

Class I 利用多个Cas蛋白形成复合物降解外源性核酸, 包括I、III和IV型^[36]。Class II 利用单个Cas蛋白作为效应物执行剪切功能, 包括II型的Cas9、V型的Cas12和VI型的Cas13^[36](表1)。

1.3.1 CRISPR/Cas9

CRISPR/Cas9系统源于细菌和古细菌中的适应性免疫系统, 利用CRISPR RNA(crRNA)、trans-activating crRNA(tracRNA)和Cas9蛋白组成复合体特异性切割外源性DNA^[1](图4)。2012年, 科学家埃马纽埃尔·卡彭蒂耶(Emmanuelle Charpentier)和詹妮弗·杜德纳(Jennifer A. Doudna)完成了CRISPR/Cas9系统的体外重构, 开启了基因编辑的新时代^[54]。Gasiunas等^[55]发现, 利用单一引导RNA(single-guide RNA, sgRNA)与天然的crRNA和tracRNA一样可以介导Cas9靶向切割DNA片段, 并逐步优化CRISPR/Cas系统为更易操作的Cas9/sgRNA系统(图4)。

最早且广泛使用的Cas9是来源于酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的SpCas9核酸酶, 其与PAM(protospacer adjacent motif)、gRNA(guide RNA)组合成CRISPR/SpCas9系统^[56]。SpCas9核酸酶与Cas9核酸酶一样, 在天然环境中只作用于DNA底物。研究证实, 对PAM进行特殊设计, SpCas9核酸酶能够在特异结合并切割靶向RNA的同时避开相应的DNA序列, 为从细胞中分离特定的内源性mRNA提供了可能^[37,38,57]。随着CRISPR/SpCas9系统的应用和基因编辑工具的不断优化与完善, 与Cas9同源的核酸酶不断被发现(表2)。FnCas9核酸酶于新弗朗西斯菌(*Francisella novicida*)中被发现, 其与crRNA、由scaRNA(small CRISPR/Cas associated RNA)和tracRNA组成的双链rgRNA(RNA-targeting guide RNA)共同组合成CRISPR/FnCas9系统^[39]。scaRNA是CRISPR/FnCas9系统中的一种特殊小RNA, 其与tracRNA构成的

表1 CRISPR/Cas系统

CRISPR/Cas系统	核酸酶亚型	编辑原理	参考文献
CRISPR/Cas9	SpCas9、FnCas9、SaCas9、ScCas9、SmaCas9、NmCas9、CjCas9、StCas9	HNH和RuvC-like结构域共同切割	[37-45]
CRISPR/Cas12	Cas12a、Cas12b、Cas12f、Cas12e、Cas12j	RuvC结构域直接切割, Nuc结构域辅助	[46-50]
CRISPR/Cas13	Cas13a、Cas13b、Cas13c、Cas13d	两个HEPN结构域组成切割活性区域	[51-53]

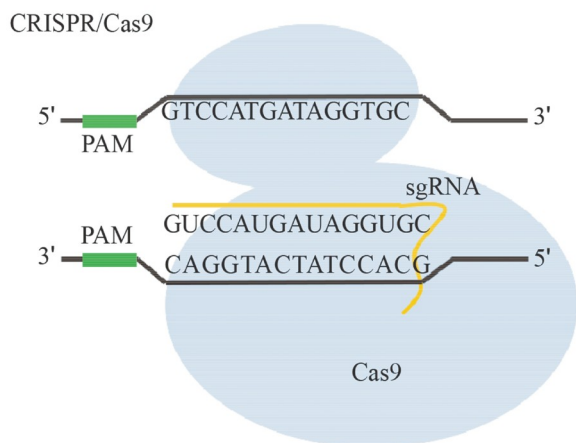


图4 CRISPR/Cas9系统结构图

rgRNA对FnCas9核酸酶具有导向作用,使FnCas9核酸酶无须依赖PAM序列也可实现靶向精准切割^[39]。SaCas9核酸酶在金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)中被发现,和SpCas9、Fncas9一样,与Cas9同源。CRISPR/SaCas9系统包括tracRNA、crRNA和SaCas9核酸酶,其作用原理与CRISPR/Cas9相同^[40]。ScCas9核酸酶在犬链球菌(*Streptococcus canis*)中被发现,与SpCas9相似,具有更广泛的靶向DNA序列的能力^[41]。SmacCas9核酸酶在猕猴链球菌(*Streptococcus macacae*)中被发现,为需要两个A碱基而不是两个G碱基的Cas9编辑器^[42]。NmCas9核酸酶在脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*)中被发现,具有蛋白质小、活力高、PAM序列差异大和脱靶率低等特点^[43]。CjCas9核酸酶在空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)中被发现,具有不同的PAM识别序列,体积较小,含984个氨基酸^[44]。StCas9核酸酶在嗜热链

球菌(*Sterptococcus thermophilus*)中被发现,与SpCas9相比,可识别更长的PAMs,特异性高,脱靶率低^[45]。

与ZFNs和TALEN技术相比,CRISPR/Cas9系统只需构建靶向特定位置的sgRNA,其构建过程更简单快捷,且Cas9以单体蛋白的形式发挥作用,其设计和组装更简单。由于Cas9对PAM序列的依赖性及其潜在的脱靶可能,限制了CRISPR/Cas9系统的应用^[58-60]。基于这些局限性,一方面可对已有的,如SpCas9进行优化改造,开发出以NG为PAM的xCas9^[61]和SpCas9-NG^[62];也可根据Cas9自身结构设计更精确的Cas9突变体,如eCas91.0、Cas9-HF1、HypaCas9等^[63,64];另一方面,可致力于发现更多的Cas核酸酶,以完善CRISPR/Cas系统,扩大其应用范围。

1.3.2 CRISPR/Cas12

Cas12a核酸酶为V型的A亚型,与crRNA组合成CRISPR/Cas12a(CRISPR/Cpf1)^[46]。Cas12a核酸酶对前体crRNA剪切得到成熟的crRNA,crRNA引导其靶向切割DNA。Cas12a核酸酶包含两个特殊的结构域,RuvC结构域可直接靶向剪切DNA,而Nuc结构域需利用RuvC结构域间接发挥功能^[65]。研究证实,若RuvC结构域发生突变,整个Cas12a核酸酶的剪切活性会丧失^[66-69]。与CRISPR/Cas9相比,因Cas12a核酸酶相对分子质量比Cas9小,只有1200~1300个氨基酸,更易利用载体实现递送,且Cas12a核酸酶剪切时产生黏性末端(sticky ends),而非Cas9剪切的平末端(blunt ends),有利于NHEJ,使基因更精准地插入^[70]。此外,CRISPR/Cas12a系统没有tracRNA,只包含crRNA和Cas12a

表2 CRISPR/Cas9亚型

核酸酶类型	来源	组成成分	参考文献
Cas9	——	sgRNA、Cas9核酸酶	[55,56]
SpCas9	<i>Streptococcus pyogenes</i>	PAM、gRNA、SpCas9核酸酶	[37]
FnCas9	<i>Francisella novicida</i>	crRNA、rgRNA、FnCas9核酸酶	[39]
SaCas9	<i>Staphylococcus aureus</i>	tracRNA、crRNA、SaCas9核酸酶	[40]
ScCas9	<i>Streptococcus canis</i>	PAM、gRNA、SpCas9核酸酶	[41]
SmacCas9	<i>Streptococcus macacae</i>	PAM、gRNA、SpCas9核酸酶	[42]
NmCas9	<i>Neisseria meningitidis</i>	PAM、gRNA、NmCas9核酸酶	[43]
CjCas9	<i>Campylobacter jejuni</i>	tracRNA、crRNA、CjCas9核酸酶	[44]
StCas9	<i>Sterptococcus thermophilus</i>	PAM、gRNA、StCas9核酸	[45]

蛋白, 其crRNA大约只有42 nt, 与CRISPR/Cas9系统(crRNA约100 nt)相比, 其编辑效率更高^[70]。

Cas12b核酸酶为V型的B亚型, CRISPR/Cas12b的组成和原理与CRISPR/Cas12a系统类似^[47], 不同的是, Cas12b核酸酶的最佳温度>40 °C^[65]。研究证实, 由嗜酸性芽孢杆菌(*Bacillus hisashii*)中分离出来的BhCas12b核酸酶在37 °C时无法形成双链断裂, 其会优先剪切非靶向DNA链, 且靶向剪切的DNA位点上会出现7个核苷酸的交错断裂, 编辑效率非常低^[71,72]。与CRISPR/Cas9系统相比, CRISPR/Cas12b系统引起的错误插入和缺失较少, 脱靶率也较低^[73]。

随着对核酸酶的不断探索, 发现并鉴定了较小分子尺寸的核酸酶: Cas12e^[48](986个氨基酸)、Cas12j^[49](700~800个氨基酸)以及Cas12f^[50](422个氨基酸)。它们可在体外实现PAM依赖性的靶向双链DNA切割。该超紧凑型系统在体外以及人和植物细胞中均具有活性, 相较于其他Cas蛋白, 这种超紧凑型系统具有扩展的靶标识别能力, 在传递上占据优势, 扩展了基因组编辑工具。

1.3.3 CRISPR/Cas13

在沙氏细毛杆菌(*Bacterium Leptotrichia shahii*)中发现的Cas13a核酸酶为VI型的A亚型, 与其他Cas核酸酶不同, Cas13a核酸酶靶向剪切RNA, 其与crRNA组合成CRISPR/Cas13a系统^[51]。在CRISPR/Cas13a系统中, crRNA的碱基数量只有24个, 是CRISPR/Cas系统中最少的, 又因其不包含tracRNA, 其反应速率较高。通过解析Cas13a核酸酶结构发现, crRNA和靶向RNA激活的Cas13a核酸酶能剪切任意的单链RNA^[74,75]。Cas13a核酸酶识别间隔区附近的PFS(protospacer flanking sequence)区序列为3'-A、3'-U及3'-C, 将CRISPR/Cas系统的识别范围进一步扩大^[61]。CRISPR/Cas13a系统已成功编辑了胰腺癌突变基因KRAS, 对其编辑效率高达70%^[76]。

Cas13b核酸酶属于VI型的B亚型, 与crRNA组合为CRISPR/Cas13b系统, 其作用原理与CRISPR/Cas13a系统基本一致, 由crRNA引导靶向结合剪切RNA^[52]。Csx27和Csx28是Cas13b核酸酶中的两个相关蛋白, Csx27蛋白抑制其介导的RNA干扰, 而

Csx28蛋白可增强其剪切能力^[52,77]。因环境中核糖核酸酶的稳定存在, 对CRISPR/Cas13a/b系统的操作要求会更加严格。

Cas13d属于VI型的D亚型, 在黄化瘤胃球菌XPD3002中被发现, 可特异性靶向切割RNA, 与Cas13a相比, 具有更高的特异性和敲除率^[53,78]。由于Cas13d具有高的切割活性, 且体积小, 更易于包装到腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)中以进行体内递送, 被认为是在未来应用中最具有优势的Cas13蛋白^[78]。

1.4 基于CRISPR/Cas系统的编辑工具

1.4.1 BE

2016年, Komor等^[79]将核酸酶活性缺陷的dCas9(dead Cas9/Cas9 nickase)与胞嘧啶脱氨酶(cytidine deaminase, CyD)融合构建了胞嘧啶碱基编辑器(cytidine base editors, CBEs), 其靶向位点的胞嘧啶(Cytosine, C)脱氨基变成尿嘧啶(Uracil, U), DNA复制后, U被胸腺嘧啶(Thymine, T)取代, 互补链的鸟嘌呤(Guanine, G)会替换为腺嘌呤(Adenine, A)(图5)。

随着单碱基编辑技术的出现, Nishida等^[80]将源于七鳃鳗(*Lethenteron camtschaticum*)的激活诱导性胞嘧啶脱氨酶类似物PmCDA1与dCas9和尿嘧啶糖基化酶抑制子(uracil DNA glycosylase inhibitor, UGI)融合, 开发出PMCDATA-dCas9/Cas9n-UGI单碱基编辑器, 实现了15%~55%的靶向突变。Ma等^[81]将人源胞嘧啶脱氨酶hAID(human activation induced deaminase)与dCas9的C端融合, 开发出dCas9-AIDx单碱基编辑器, 可通过诱变使局部序列产生多样化。2017年, Liu实验室在BE3基础上引入突变以减少脱靶, 开发出高保真的碱基编辑器(high-fidelity base editor, HF-BE3)^[82]。随后, 该研究团队利用*E.coli* TadA(ecTadA)在BE基础上开发出新型单碱基编辑器——腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editors, ABEs), 实现了A向G的精准转换, 其编辑效率可达约50%, 插入或缺失的引入频率<0.1%^[83,84]。

目前已实现嘧啶与嘧啶、嘌呤与嘌呤之间的自由转换。虽然CBEs、ABEs能高效地编辑某些特定靶点。但并非所有靶点均可编辑, 其编辑的靶点是否存在规律? 与Cas9选择的靶点是否存在相关

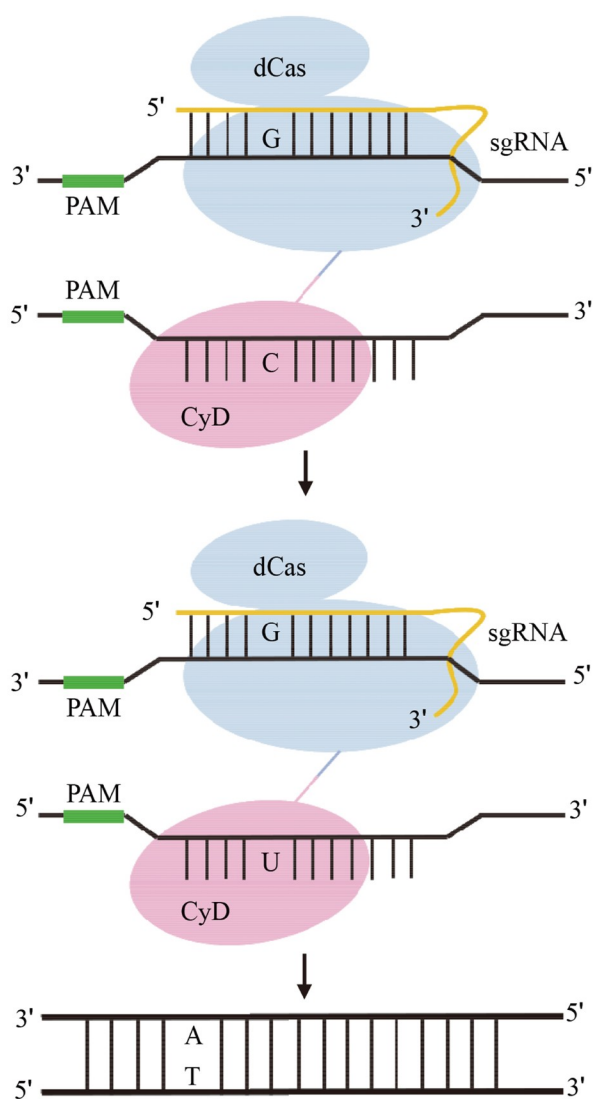


图5 单碱基编辑系统

性? Cas9的蛋白质结构已被破译,但胞嘧啶脱氨酶与腺苷脱氨酶的蛋白质结构尚未被解析,对BE的靶向识别和编辑机制尚未有更深刻的理解,这些问题是否为嘧啶与嘌呤之间颠换的关键,有待进一步研究。

1.4.2 PE

2019年,Anzalone等^[85]开发出一种全新的精准基因编辑工具PE (prime editors),无需额外的DNA模板便可有效实现12种单碱基的自由转换,而且还能有效实现多碱基的精准插入(最多可插入44 bp)与删除(最多可删除80 bp),PE系统为基因编辑领域带来重大变革。PE系统以CRISPR/Cas9为基础,在sgRNA 3'末端增加一段RNA序列,新获得

的RNA被称作pegRNA(prime editing extended guide RNA); Cas9酶(H840A突变型)与逆转录酶融合,获得新的融合蛋白^[85]。PE的基因编辑原理:在pegRNA的引导下,Cas9 H840切口酶切断含PAM的靶点DNA链,断裂的靶DNA链与pegRNA的3'末端引物结合位点序列互补并结合,随后逆转录酶发挥功能,沿逆转录的模板序列开始逆转录反应,反应结束后DNA链的切口处会形成处在动态平衡中的5'-和3'-flap结构,5'-flap结构的DNA链无任何突变,被结构特异性内切酶识别并切除,而3'-flap结构的DNA链携带有目标突变,经DNA连接和修复以实现精准的基因编辑^[85]。

通过将野生型的鼠白血病病毒(murine leukemia virus, MLV)逆转录酶与Cas9 H840酶的C末端融合,构建出第一代编辑工具PE1,经293T细胞验证,PE1的点突变效率为0.7%~5.5%,碱基的增加/删除效率为4%~17%^[85]。在PE1基础上,通过对MLV逆转录酶热稳定性、底物亲和性以及核酸酶活性等方面进行优化,得到第二代编辑工具PE2,其点突变效率和碱基的增删效率是PE1的两倍以上^[85]。PE1/2系统只编辑DNA一条链,非编辑链需要进行修复完成精准编辑。事实上,Cas9酶切断非编辑链可有效提高修复效率。在PE2基础上,增加可切断非编辑链的sgRNA,得到新的PE3和PE3b系统,其编辑效率与PE2相比提升了近3倍,在293T细胞中最高编辑效率可达78%^[85]。由于使用了两条sgRNA,增加了PE3的随机插入缺失风险,这也是未来PE3的需改进之处。

2 基因编辑的临床应用

随着对已有基因编辑工具的优化以及新的基因编辑工具的发现,其编辑精准度和编辑效率不断提高,为临床疾病的治疗提供了新的治疗模式。基于基因编辑技术的基因治疗已在遗传病、感染性疾病以及肿瘤等疾病中开始了临床试验。

2.1 遗传病

镰刀型红细胞贫血是编码β-珠蛋白的HBB基因发生碱基突变引起的一种遗传病。Hoban等^[86]利用ZFNs靶向HBB基因对其进行基因矫正,恢复其正常功能。β-地中海贫血是HBB基因缺失或突变造成α链和β链比例失衡,导致红细胞寿命缩短的一种遗

传缺陷病^[6]。Liang等^[87]利用CRISPR/Cas9系统引入正常*HBB*基因恢复*HBB*基因的功能。2017年, 该研究者利用BE技术对人胚胎*HBB*进行G变A的定点突变, 以纠正基因功能^[88]。Cromer等^[89]利用Cas9/AAV6基因组编辑方法, 编辑 β -地中海贫血衍生的造血干细胞, 介导全长*HBB*转基因特异性替换内源性*HBA1*。衍生的造血干细胞中 β -珠蛋白/ α -珠蛋白失衡正常化, 恢复了红细胞中的功能性成人血红蛋白四聚体。小鼠移植实验证明, 编辑的造血干细胞能够在体内重建造血系统, 且可长期稳定移植。这为*HBB*替代*HBA1*作为治疗 β -地中海贫血的新策略提供了证据。

输血依赖型 β 地中海贫血(transfusion dependent thalassaemia, TDT)和镰状细胞病(sickle cell disease, SCD)是严重的单基因病, 具有严重且可能危及生命的临床表现。BCL11A可抑制红细胞内 γ 珠蛋白和胎儿血红蛋白(fetal hemoglobin, HbF)。Frangoul等^[90]利用CRISPR/Cas9对来自健康供体的CD34+造血干细胞中BCL11A红系特异性增强子实施靶向编辑, 约80%的等位基因被修饰且无脱靶编辑。在接受骨髓消融治疗后, 1例TDT患者和1例SCD患者接受了靶向相同BCL11A增强子的CRISPR/Cas9编辑的自体CD34+细胞。一年后, 2例患者骨髓和血液内的等位基因编辑水平高, HbF分布增加, 造血恢复规律, 并且(SCD患者)不再发生血管闭塞。Esrick等^[91]对6例SCD患者输入慢病毒载体转导的自体CD34+细胞, 载体编码嵌入微RNA内, 靶向BCL11A mRNA的短发夹RNA(shRNA, shmiR), 实现红系特异性敲除。患者接受基因治疗后中位随访时间为18个月(7~29个月), 可进行全面评估的所有患者均实现了稳定的HbF诱导[最近一次随访中的HbF/(F+S)百分比为20.4%~41.5%], 并且HbF广泛分布在红细胞内(F细胞在并非输入患者体内的红细胞中占58.9%~93.6%), 每个F细胞的HbF为9.0 pg~18.6 pg。镰状细胞病的临床表现在随访期间减少或消失。该研究证实, 抑制BCL11A是诱导HbF的有效靶点, 并提供初步证据表明, 基于shmiR的基因敲除策略在镰状细胞病治疗中具有有良好的风险获益特征。

先天性黑蒙症(leber congenital amaurosis, LCA)是与视网膜功能相关的基因功能丧失导致的

一种遗传性疾病, 主要为常染色体隐性遗传^[92]。先天性黑蒙症10型, 是*CEP290*基因的26号内含子发生点突变(A>G), 产生新的剪切位点, 导致转录提前终止^[93]。目前, Editas Medicine公司利用AAV载体将*CEP290*特异性的gRNA递送至视网膜, gRNA靶向突变的内含子区域, 将其删除或倒位以恢复*CEP290*基因功能^[93]。先天性黑蒙症2型是*RPE65*基因3号外显子发生单碱基突变, 引起蛋白转录提前终止。2017年12月, FDA批准Spark公司利用AAV载体将正确的*RPE65*基因递送到视网膜细胞, 用于治疗先天性黑蒙2型^[94,95]。早期临床试验表明, 患者接受AAV基因治疗后第一年视觉功能有所改善, 但长期报告显示, 患者出现持续性的视网膜病变和1~3年后的视力下降, AAV载体递送的转基因的表达水平会随时间下降, 甚至达不到维持视网膜健康的需求, 且*RPE65*蛋白缺乏引起的视网膜变性可能会对外源表达的*RPE65*蛋白产生抗性^[96-99]。随着单碱基编辑技术的诞生, Suh等^[100]使用慢病毒载体递送ABE, 实现了对先天性黑蒙2型小鼠模型突变基因的高效修复, 有效恢复小鼠的视觉能力, 且未发现可检测的脱靶效应。这项工作为遗传性视网膜疾病的治疗提供了新的策略, 同时表明单碱基编辑技术可以替代基因增强疗法, 以永久挽救因突变而失能的关键蛋白的功能, 或修正无法使用基因增强疗法的显性遗传病。

转甲状腺素淀粉样变又称ATTR淀粉样变, 是一种危及生命的疾病, 其特征是错误折叠的转甲状腺素(transthyretin, TTR)蛋白在组织中的进行性积累。Gillmore等^[101]利用CRISPR/Cas9系统, 由包覆Cas9蛋白mRNA的脂质纳米颗粒(LNP)和靶向TTR的sgRNA组成了NTLA-2001, 特异性沉默肝细胞中的*TTR*基因, 降低血清中TTR浓度以治疗ATTR淀粉样变。本项临床试验纳入6名hATTR多发性神经病患者, 3例患者接受0.1 mg/kg单剂NTLA-2001治疗; 3名接受0.3 mg/kg单剂NTLA-2001治疗。结果显示, NTLA-2001可使患者血清TTR呈剂量依赖性降低, 且6例患者对纳入分析的两个剂量耐受性普遍良好。第28天实验室检查未见肝脏或凝血功能异常, 没有发现严重不良事件和肝脏问题, 所有不良事件均为轻度不良事件(1级)。此外, 使用原代人肝细胞评估NTLA-2001的

“脱靶效应”，显示治疗剂量的NTLA-2001并未出现脱靶。该临床试验极大地拓展了CRISPR基因编辑疗法的应用范围，通过直接注射到体内进行高效基因编辑，为众多遗传疾病的治疗开辟了新的途径。

2.2 感染性疾病

病毒借助特异性受体感染宿主细胞，通过复制、转录和翻译在宿主体内定植生存^[102]。病毒的高效感染性和可传递性使其成为递送基因编辑工具的载体，又因其基因组的可被识别性，为治疗感染性疾病提供了新思路。

由于多数病毒具有致病性，病毒若作为载体，须删除其自身DNA中可致病的功能元件，只保留具有整合功能的元件，方可达到既减轻其致病性又可在宿主中稳定共存的效果^[103]。最常用的病毒载体有逆转录病毒如AAV等^[104]。逆转录病毒经修饰后，具备单次感染特性，其致病性大大降低。虽然逆转录病毒的感染效率高、毒性小，但只能感染分裂的细胞，存在致癌风险，其可携带的外源片段大小需低于8 kb^[104,105]。AAV为一种复制缺陷型的单链DNA病毒，需借助腺病毒才可将外源基因定点整合到宿主基因组上^[103]。通过人工设计改造，AAV无需腺病毒辅助，可不插入宿主基因组，以卫星状态游离于宿主基因组外长期稳定表达^[106]。AAV具有免疫原性低、适用范围广、表达时间长等优势，但其可容纳的外源基因<4.7 kb，这一弊端也限制了其广泛应用^[107]。

病毒作为基因编辑工具的载体，使基因编辑技术更加完善，也正是得益于基因编辑技术的日趋成熟，感染性疾病不再局限于抗生素治疗，而着眼于病毒致病性DNA，通过基因修饰使其灭活以达到抑制感染的目的。乙型肝炎是由乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染所致。HBV是一种DNA病毒，其遗传物质为一种共价闭合环状DNA(covalently closed circle DNA)，是HBV基因组和前基因组RNA(pre-genomic RNA, pgRNA)复制的原始模板^[108]。研究证实，利用ZFNs或TALENs技术切除HBV病毒的基因保守区域，破坏HBV病毒基因组，可有效抑制HBV感染^[109]。Ramanan等^[110]以HBV基因组靶向设计sgRNA，利用Cas9核酸内切酶直接靶向剪切cccDNA，使cccDNA灭

活，抑制HBV感染。

在人类历史上，真正临床上利用基因编辑技术治疗感染性疾病是利用ZFNs敲除艾滋病患者自身T细胞中的辅助受体趋化因子受体5(C-C chemokine receptor type 5, CCR5)以抵抗HIV(human immunodeficiency virus)感染，实现基因治疗的目的^[111-114]。CCR5基因是大部分HIV菌株早期感染辅助受体，其敲除可对HIV耐受。研究证实，利用ZFNs可敲除原代CD4⁺ T细胞中的CCR5基因，使免疫缺陷小鼠具备抗HIV能力^[115]。此外，利用ZFNs、TALEN或CRISPR/Cas9系统在人造血前体干细胞、胚胎干细胞和多能干细胞中也能成功敲除CCR5基因，赋予细胞抗病毒能力，为临床应用的实现提供支持^[116-118]。但CCR5并不是HIV感染人体所需的唯一辅助受体，趋化因子受体4(C-X-C chemokine receptor type 4, CXCR4)在病毒感染时也发挥着巨大作用。研究表明，利用ZFNs敲除CXCR4基因，也可起到抗病毒效果^[119,120]。以基因编辑为基础的基因治疗方法无法治愈已感染的HIV患者，因为HIV病毒仍以病毒宿主的形式存在于已治疗个体中，想要彻底治愈艾滋病，仍需对其感染机制进行更深入的研究。

2.3 癌症

肿瘤发生是一个复杂的过程，涉及多基因和多阶段的变化，包括原癌基因激活、抑癌基因失活，以及微缺失、微重复、重排和染色体结构异常等。免疫疗法是目前肿瘤治疗的主要方式之一，其利用具有抗肿瘤功能的单克隆抗体或者供体T细胞，靶向自身免疫系统。在肿瘤的演变过程中，会出现免疫逃逸现象，即机体免疫系统无法识别肿瘤细胞特异性抗原，使其逃过免疫监视。基因编辑与免疫疗法相结合，可重新恢复对肿瘤细胞的免疫监视功能，以清除肿瘤细胞。人工改造的具有嵌合抗原受体的T细胞[chimeric antigen receptor (CAR) T cells]具有肿瘤细胞特异性抗原嵌合结构域，可激活T细胞，实现对肿瘤细胞的杀伤作用^[121]。Ren等^[122]利用CRISPR/Cas9系统剪切多个基因位点，制备TCR(T cell receptor)和HLA-I(HLA class I)缺陷的通用CAR-T细胞，以突破癌症的种系限制，避免免疫排斥等问题。此外，利用基因编辑技术敲除T细胞信号分子基因，如CTLA4

(cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4), 产生增强型CAR-T细胞, 以扩大其应用范围^[123,124]。

2016年, 全球首例利用CRISPR/Cas9敲除转移性非小细胞肺癌患者T细胞中*PD-1*(programmed death-1)基因的I期临床试验顺利开展。*PD-1*是免疫反应的关键开关, 其可抑制T细胞抗肿瘤效应, 敲除*PD-1*的T细胞回输到患者体内后可杀伤肿瘤细胞^[125,126]。2020年, 其临床试验结果公布, 数据显示: 22名志愿患者中有17名患者基因编辑后的T细胞可足够进行回输, 其中有12名最终可接受治疗。回输治疗后, 与治疗相关的不良事件均为1/2级。输注后其外周血中可检测到编辑过的T细胞。利用二代测序技术对候选位点进行检测, 其脱靶的中位频率仅为0.05%。患者的中位无进展生存期为7.7周, 中位总生存期为42.6周^[127]。此项结果的发布证实了CRISPR/Cas9基因编辑的T细胞临床应用是安全可行的。

肿瘤演化过程中存在很多的基因变异, 随着测序技术的发展越来越多与肿瘤发生发展相关的突变基因被鉴定出来。CRISPR/Cas9系统高效、特异的基因编辑功能, 为直接靶向生物体内引发癌变的突变基因提供了可能。Koo等^[128]利用CRISPR/Cas9系统敲除NSCLC细胞系(H1975)中*EGFR*突变等位基因(L858R), 发现癌细胞死亡且肿瘤体积减小。Stadtmauer等^[129]利用慢病毒将靶向NY-ESO-1和LAGE-1的TCR序列导入患者自体T细胞, 定点靶向NY-ESO-1和/或LAGE-1阳性的肿瘤细胞, 同时利用CRISPR/Cas9敲除T细胞中内源性TCR和PDCD1, 增强了T细胞的肿瘤杀伤力。

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是一种高死亡率的原发性肝癌。研究表明, NSD1(nuclear receptor binding SET domain protein 1)在HCC中高表达且与预后不良相关。Zhang等^[130]利用CRISPR/Cas9系统敲除*NSD1*基因, 可促进组蛋白H3K27me3甲基化, 抑制Wnt/ β -catenin信号通路激活, 从而阻碍癌细胞的增殖和转移。NCOA5(nuclear receptor coactivator 5)与葡萄糖耐受不良和HCC易感性相关。He等^[131]利用CRISPR/Cas9系统敲除*NCOA5*基因, 可抑制HCC细胞的增殖和迁移以及肿瘤微球的形成。Nogo-B是细胞凋亡的负调节剂, 在细胞增殖和迁移、血管重塑以及上皮-间

质转化中起关键作用^[132]。Zhu等^[133]利用CRISPR/Cas9系统敲除*Nogo-B*基因, 可抑制体外细胞增殖和体内肿瘤生长。基于CRISPR/Cas9系统的个体化靶向治疗将是肿瘤治疗的新方向, 其在基因水平的肿瘤治疗中显示出巨大潜力, 为肿瘤治疗带来新范式。

3 基因编辑技术的挑战

相较于小分子的药物疗法和其他生物疗法, 基因疗法的分子性质明显不同。虽然以基因编辑为基础的基因疗法在医学领域显现出优势, 但与真正意义上的临床应用还有不小的差距。

3.1 基因编辑的安全性

基因编辑技术临床应用中首要考虑的是安全性问题。基因修饰是永久性的, 一旦出现脱靶, 其引起的脱靶突变可能产生具有致癌潜力的细胞, 导致生物体的生存适应性降低或造成生物体功能障碍。此外, 脱靶编辑后产生的致癌突变可能会导致被编辑细胞的扩增, 因此, 即使是低水平的脱靶突变也可能产生毁灭性后果^[134]。除脱靶效应及其造成的副作用, 基因编辑工具自身的安全性也有待提高。研究证实, CRISPR/Cas9系统引发的DNA双链断裂可导致细胞周期停滞, 且激活p53信号通路, 这意味着即使避免了脱靶突变, 也会使编辑成功的细胞成为潜在的癌细胞, 无形中增加患癌风险^[135-137]。然而, 即便CRISPR/Cas9系统靶向编辑成功, 也可能导致其靶点附近的DNA序列大规模被删除, 甚至引发DNA重排, 造成染色体结构异常, 影响调控序列, 进而改变细胞功能^[138-140]。另外, 因人体中普遍存在Cas9抗体, 利用CRISPR/Cas9系统进行基因治疗可能会引发强烈的免疫反应, 影响治疗效果^[141,142]。此外, 基因编辑工具的传送载体, 如病毒、质粒等本身也会产生免疫反应, 或载体随细胞分裂造成的插入突变, 也是基因治疗应用于临床亟需解决的安全性问题。

3.2 基因编辑的有效性

基因治疗应用于临床的另一个主要问题是基因编辑系统的传递效率, 这直接影响基因治疗效果。基因编辑工具的传送系统包括病毒、质粒、RNA和蛋白质等系统^[1]。病毒或质粒传送系统, 除

自身安全性影响其传递效率外,其可传输的分子大小不一,不仅影响其治疗的有效性,也限制了其应用范围^[141]。另外,曾自然接触过病毒如AAV的人,可能会对特定血清型产生免疫力,进而影响最终的治疗效果^[141]。基于纳米颗粒和脂质体的mRNA或蛋白质传递系统,虽然可以更精确地控制剂量,但mRNA或蛋白质暴露可能会刺激免疫系统,其传递引起的免疫毒性会降低传递效率。依据靶细胞和传递方法,传送载体携带外源基因的能力、与细胞的亲和性以及细胞感染效率不容忽视,编辑工具和传递系统应谨慎选择^[6,142]。

3.3 伦理问题

虽然基因编辑在遗传病、癌症、感染性疾病等的治疗中取得了突破性进展,但对生殖细胞、胚胎细胞的编辑一直备受争议,基因编辑的伦理问题也是限制其应用的因素之一^[143]。一方面,对胚胎细胞进行基因编辑,不仅能了解发育的分子机制,加深对早期发育的理解,还可以在发育早期修饰致病基因,实现疾病的治愈,避免遗传给下一代^[1,6]。另一方面,鉴于基因编辑工具自身的安全性和有效性问题,无法保证编辑是否成功,一旦出现编辑失误,附加疾病等都会随之而来^[144-146]。基因编辑将会改变人类的繁衍方式和生活形式,伦理原则应与技术进步同步甚至超前规范,其目的是使技术的应用实现可控可用,而不仅仅是单纯的禁止。

4 总结与展望

随着基因编辑工具的不断完善的新的疾病有效靶点的鉴定,基因编辑技术的临床转化和应用研究得到拓展。ZFNs和TALENs由于其各自特性,组装复杂且脱靶率较高,其应用受限^[147,148]。Fok I 核酸内切酶需二聚化方可具备剪切能力,且其二聚化会对细胞产生毒性^[21,22]。相较于ZFNs和TALENs,CRISPR/Cas系统的靶点设计和操作简单、编辑效率高、脱靶率低,但其位点设计无法摆脱对PAM的依赖。单碱基编辑技术的出现和不断优化,实现了单个碱基的精准转换,降低了脱靶效率^[86]。虽然基因编辑技术取得了一定突破,但基因编辑工具仍需进行不断的迭代更新,以系统地解决其特异性、有效性和安全性的问题。通

过对已有基因编辑工具的优化,使其可识别剪切的范围不断扩大,临床治疗的适用性也不断提高。在未来,特别是在复杂研究和临床治疗实践中,不同基因编辑技术的组合使用,如CRISPR/Cas技术与BE技术组合等,将是未来基因编辑技术开发与应用的发展方向。

除已有基因编辑工具的优化和组合开发,新的基因编辑工具的发现和开发将是推动基因编辑技术持续发展的动力。最新研究证实,反转录子(retrons)就像CRISPR一样,也是细菌免疫系统的一部分,可保护细菌免受噬菌体攻击^[149]。反转录子于1984年在黄色黏球菌(*Myxococcus xanthus*)中被发现,其大量存在于细菌细胞中,由逆转录酶和非编码RNA组成,逆转录酶以非编码RNA为模板,生成一个嵌合的RNA/DNA分子^[150,151]。关于反转录子的生物学功能,有研究指出,反转录子是一种自私的遗传元素(selfish genetic elements)^[152],或具有饥饿应激功能^[153],或与发病机制相关^[154],或与细胞特化相关^[155]。但这些证实其功能的证据是间接的,反转录子发挥这些假定功能的机制尚未确定,其生物功能仍然未知。Simon等^[155]证实,反转录子Ec48可保护同源重组蛋白RecBCD,噬菌体蛋白对RecBCD的抑制会激活反转录子Ec48,以诱发被感染细菌的自我毁灭,从而提供一种针对噬菌体的广泛防御机制。与CRISPR/Cas系统相比,虽然CRISPR/Cas系统靶向性很强,但不擅长在目标DNA中引入新编码,而反转录子则可以通过逆转录酶产生大量靶标序列副本,这些副本可被有效地拼接到宿主基因组中。在未来,反转录子将会是精确、高效的基因组编辑工具。若将反转录子与CRISPR整合,甚至与BE整合,或许能开发出一种全新的、功能更强大的基因编辑工具。

尽管基因编辑存在诸多问题,其仍为解决一些传统疗法无法解决的疾病提供了新思路。在未来的临床医疗实践中,基于多学科的交叉融合,其应用性问题会逐步得以解决。基于基因编辑技术的基因疗法必将成为人类治疗疾病的一种常规手段,其治疗方式的个体化、最优化原则将为人类健康选择创造更多机遇。

参考文献

- [1] 任云晓, 肖茹丹, 娄晓敏, 等. 基因编辑技术及其在基因治疗中的应用. *遗传*, 2019, 41(1): 18-28
- [2] Gaj T, Gersbach CA, Barbas Iii CF. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol*, 2013, 31(7): 397-405
- [3] Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 2014, 157(6): 1262-1278
- [4] Kim H, Kim JS. A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nat Rev Genet*, 2014, 15(5): 321-334
- [5] 席海瑞, 卢大儒. 基因编辑与遗传病治疗. *科学*, 2019, 71(1): 19-23
- [6] 牛煦然, 尹树明, 陈曦, 等. 基因编辑技术及其在疾病治疗中的研究进展. *遗传*, 2019, 41(7): 582-598
- [7] Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, et al. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J*, 1998, 17(18): 5497-5508
- [8] Ahmad HI, Ahmad MJ, Asif AR, et al. A review of CRISPR-based genome editing: survival, evolution and challenges. *Curr Issues Mol Biol*, 2018, 28: 47-68
- [9] Musunuru K. The hope and hype of CRISPR-Cas9 genome editing. *JAMA Cardiol*, 2017, 2(8): 914-919
- [10] Joung JK, Sander JD. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 14(1): 49-55
- [11] Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(4): 347-355
- [12] Komor AC, Badran AH, Liu DR. CRISPR-based technologies for the manipulation of eukaryotic genomes. *Cell*, 2017, 168(1-2): 20-36
- [13] Mani M, Kandavelou K, Dy FJ, et al. Design, engineering, and characterization of zinc finger nucleases. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 335(2): 447-457
- [14] Li L, Wu LP, Chandrasegaran S. Functional domains in Fok I restriction endonuclease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(10): 4275-4279
- [15] Kim YG, Chandrasegaran S. Chimeric restriction endonuclease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(3): 883-887
- [16] Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(3): 1156-1160
- [17] Carroll D. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics*, 2011, 188(4): 773-782
- [18] Bibikova M, Golic M, Golic KG, et al. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics*, 2002, 161(3): 1169-1175
- [19] Bibikova M, Beumer K, Trautman JK, et al. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science*, 2003, 300(5620): 764
- [20] Urnov FD, Miller JC, Lee YL, et al. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature*, 2005, 435(7042): 646-651
- [21] Lam KN, van Bakel H, Cote AG, et al. Sequence specificity is obtained from the majority of modular C2H2 Zinc-finger arrays. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(11): 4680-4690
- [22] Ul Ain Q, Chung JY, Kim YH. Current and future delivery systems for engineered nucleases: ZFN, TALEN and RGEN. *J Control Release*, 2015, 205: 120-127
- [23] Bonas U, Stall RE, Staskawicz B. Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*. *Mol Gen Genet*, 1989, 218(1): 127-136
- [24] Kay S, Hahn S, Marois E, et al. A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science*, 2007, 318(5850): 648-651
- [25] Sugio A, Yang B, Zhu T, et al. Two type III effector genes of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* control the induction of the host genes *OsTFIIA 1* and *OsTFX1* during bacterial blight of rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(25): 10720-10725
- [26] Boch J, Scholze H, Schornack S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 2009, 326(5959): 1509-1512
- [27] Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 2009, 326(5959): 1501
- [28] Miller JC, Tan S, Qiao G, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(2): 143-148
- [29] Bedell VM, Wang Y, Campbell JM, et al. *In vivo* genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature*, 2012, 491(7422): 114-118
- [30] Tan WS, Carlson DF, Walton MW, et al. Precision editing of large animal genomes. *Adv Gene*, 2012, 80: 37-97
- [31] Eid A, Mahfouz MM. Genome editing: the road of CRISPR/Cas9 from bench to clinic. *Exp Mol Med*, 2016, 48(10): e265
- [32] Kim JS. Genome editing comes of age. *Nat Protoc*, 2016, 11(9): 1573-1578
- [33] Ramani V, Shendure J, Duan Z. Understanding spatial

- genome organization: methods and insights. *Genomics Proteomics Bio Inf*, 2016, 14(1): 7-20
- [34] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, et al. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*, 1987, 169(12): 5429-5433
- [35] Jansen R, Embden JDA, Gastra W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol*, 2002, 43(6): 1565-1575
- [36] Koonin EV, Makarova KS, Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Microbiol*, 2017, 37: 67-78
- [37] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823
- [38] O'Connell MR, Oakes BL, Sternberg SH, et al. Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9. *Nature*, 2014, 516(7530): 263-266
- [39] Hirano H, Gootenberg JS, Horii T, et al. Structure and engineering of *Francisella novicida* Cas9. *Cell*, 2016, 164(5): 950-961
- [40] Ran FA, Cong L, Yan WX, et al. *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*, 2015, 520(7546): 186-191
- [41] Chatterjee P, Jakimo N, Lee J, et al. An engineered ScCas9 with broad PAM range and high specificity and activity. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(10): 1154-1158
- [42] Chatterjee P, Lee J, Nip L, et al. A Cas9 with PAM recognition for adenine dinucleotides. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 2474
- [43] Zhang Y, Heidrich N, Ampattu BJ, et al. Processing-independent CRISPR RNAs limit natural transformation in *neisseria meningitidis*. *Mol Cell*, 2013, 50(4): 488-503
- [44] Chylinski K, Le Rhun A, Charpentier E. The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems. *RNA Biol*, 2013, 10(5): 726-737
- [45] Horvath P, Romero DA, Coute-Monvoisin AC, et al. Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol*, 2008, 190(4): 1401-1412
- [46] Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, 2015, 163(3): 759-771
- [47] Strecker J, Jones S, Koopal B, et al. Engineering of CRISPR-Cas12b for human genome editing. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 212
- [48] Liu JJ, Orlova N, Oakes BL, et al. CasX enzymes comprise a distinct family of RNA-guided genome editors. *Nature*, 2019, 566(7743): 218-223
- [49] Pausch P, Al-Shayeb B, Bisom-Rapp E, et al. CRISPR-Cas9 from huge phages is a hypercompact genome editor. *Science*, 2020, 369(6501): 333-337
- [50] Karvelis T, Bigelyte G, Young JK, et al. PAM recognition by miniature CRISPR-Cas12f nucleases triggers programmable double-stranded DNA target cleavage. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(9): 5016-5023
- [51] Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Konermann S, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science*, 2016, 353(6299): aaf5573
- [52] Barrangou R, Gersbach CA. Expanding the CRISPR toolbox: targeting RNA with Cas13b. *Mol Cell*, 2017, 65(4): 582-584
- [53] Konermann S, Lotfy P, Brideau NJ, et al. Transcriptome engineering with RNA-targeting type VI-D CRISPR effectors. *Cell*, 2018, 173(3): 665-676.e14
- [54] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821
- [55] Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(39): E2579-E2586
- [56] Fonfara I, Le Rhun A, Chylinski K, et al. Phylogeny of Cas9 determines functional exchangeability of dual-RNA and Cas9 among orthologous type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(4): 2577-2590
- [57] Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339(6121): 823-826
- [58] Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 827-832
- [59] Pattanayak V, Lin S, Guilinger JP, et al. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 839-843
- [60] Fu Y, Foden JA, Khayter C, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 822-826
- [61] Hu JH, Miller SM, Geurts MH, et al. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature*, 2018, 556(7699): 57-63
- [62] Nishimasu H, Shi X, Ishiguro S, et al. Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space. *Science*, 2018, 361(6408): 1259-1262
- [63] Singh D, Wang Y, Mallon J, et al. Mechanisms of improved specificity of engineered Cas9s revealed by single-molecule FRET analysis. *Nat Struct Mol Biol*,

- 2018, 25(4): 347-354
- [64] Chen JS, Dagdas YS, Kleinstiver BP, et al. Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy. *Nature*, 2017, 550(7676): 407-410
- [65] 李佰伦, 黄书琴, 王奕众. CRISPR/Cas系统的研究进展及前沿应用. *生命的化学*, 2020, 40(1): 16-24
- [66] Ounzain S, Burdet F, Ibberson M, et al. Discovery and functional characterization of cardiovascular long non-coding RNAs. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 89: 17-26
- [67] Gao P, Yang H, Rajashankar KR, et al. Type V CRISPR-Cas Cpf1 endonuclease employs a unique mechanism for crRNA-mediated target DNA recognition. *Cell Res*, 2016, 26(8): 901-913
- [68] Fonfara I, Richter H, Bratovi M, et al. The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA. *Nature*, 2016, 532(7600): 517-521
- [69] Swarts DC, van der Oost J, Jinek M. Structural basis for guide RNA processing and seed-dependent DNA targeting by CRISPR-Cas12a. *Mol Cell*, 2017, 66(2): 221-233.e4
- [70] 赵子璇, 李春辉, 周莉莉, 等. CRISPR/Cas系统递送技术及其应用研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2020, 47(4): 286-299
- [71] Yan WX, Hunnewell P, Alfonse LE, et al. Functionally diverse type V CRISPR-Cas systems. *Science*, 2019, 363(6422): 88-91
- [72] Nakade S, Yamamoto T, Sakuma T. Cas9, Cpf1 and C2c1/2/3—What's next? *Bioengineered*, 2017, 8(3): 265-273
- [73] Liu L, Chen P, Wang M, et al. C2c1-sgRNA complex structure reveals RNA-guided DNA cleavage mechanism. *Mol Cell*, 2017, 65(2): 310-322
- [74] Liu L, Li X, Ma J, et al. The molecular architecture for RNA-guided RNA cleavage by Cas13a. *Cell*, 2017, 170(4): 714-726.e10
- [75] Knott GJ, East-Seletsky A, Cofsky JC, et al. Guide-bound structures of an RNA-targeting A-cleaving CRISPR-Cas13a enzyme. *Nat Struct Mol Biol*, 2017, 24(10): 825-833
- [76] Zhao X, Liu L, Lang J, et al. A CRISPR-Cas13a system for efficient and specific therapeutic targeting of mutant KRAS for pancreatic cancer treatment. *Cancer Lett*, 2018, 431: 171-181
- [77] Smargon AA, Cox DBT, Pyzocha NK, et al. Cas13b is a type VI-B CRISPR-associated RNA-guided RNase differentially regulated by accessory proteins Csx27 and Csx28. *Mol Cell*, 2017, 65(4): 618-630.e7
- [78] Mahas A, Aman R, Mahfouz M. CRISPR-Cas13d mediates robust RNA virus interference in plants. *Genome Biol*, 2019, 20(1): 263
- [79] Komor AC, Kim YB, Packer MS, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 2016, 533(7603): 420-424
- [80] Nishida K, Arazoe T, Yachie N, et al. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science*, 2016, 353(6305): aaf8729
- [81] Ma Y, Zhang J, Yin W, et al. Targeted AID-mediated mutagenesis (TAM) enables efficient genomic diversification in mammalian cells. *Nat Methods*, 2016, 13(12): 1029-1035
- [82] Rees HA, Komor AC, Yeh WH, et al. Improving the DNA specificity and applicability of base editing through protein engineering and protein delivery. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 15790
- [83] Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, et al. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 2017, 551(7681): 464-471
- [84] Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, et al. Publisher Correction: Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 2018, 559(7714): E8
- [85] Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, 2019, 576(7785): 149-157
- [86] Hoban MD, Cost GJ, Mendel MC, et al. Correction of the sickle cell disease mutation in human hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood*, 2015, 125(17): 2597-2604
- [87] Liang P, Xu Y, Zhang X, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triploid zygotes. *Protein Cell*, 2015, 6(5): 363-372
- [88] Liang P, Ding C, Sun H, et al. Correction of β -thalassemia mutant by base editor in human embryos. *Protein Cell*, 2017, 8(11): 811-822
- [89] Cromer MK, Camarena J, Martin RM, et al. Gene replacement of α -globin with β -globin restores hemoglobin balance in β -thalassemia-derived hematopoietic stem and progenitor cells. *Nat Med*, 2021, 27(4): 677-687
- [90] Frangoul H, Altshuler D, Cappellini MD, et al. CRISPR-Cas9 gene editing for sickle cell disease and β -thalassemia. *N Engl J Med*, 2021, 384(3): 252-260
- [91] Esrick EB, Lehmann LE, Biffi A, et al. Post-transcriptional genetic silencing of *BCL11A* to treat sickle cell disease. *N Engl J Med*, 2021, 384(3): 205-215
- [92] Cremers FPM, van den Hurk JAJM, den Hollander AI. Molecular genetics of Leber congenital amaurosis. *Hum Mol Genet*, 2002, 11(10): 1169-1176
- [93] Maeder ML, Stefanidakis M, Wilson CJ, et al. Devel-

- opment of a gene-editing approach to restore vision loss in Leber congenital amaurosis type 10. *Nat Med*, 2019, 25(2): 229-233
- [94] Utz VM, Coussa RG, Antaki F, et al. Gene therapy for RPE65-related retinal disease. *Ophthalmic Genet*, 2018, 39(6): 671-677
- [95] Maguire AM, Russell S, Wellman JA, et al. Efficacy, safety, and durability of voretigene neparvovec-rzyl in RPE65 mutation-associated inherited retinal dystrophy. *Ophthalmology*, 2019, 126(9): 1273-1285
- [96] Bainbridge JWB, Mehat MS, Sundaram V, et al. Long-term effect of gene therapy on leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med*, 2015, 372(20): 1887-1897
- [97] Jacobson SG, Cideciyan AV, Roman AJ, et al. Improvement and decline in vision with gene therapy in childhood blindness. *N Engl J Med*, 2015, 372(20): 1920-1926
- [98] Cideciyan AV, Jacobson SG, Beltran WA, et al. Human retinal gene therapy for Leber congenital amaurosis shows advancing retinal degeneration despite enduring visual improvement. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(6): E517-E525
- [99] Gardiner KL, Cideciyan AV, Swider M, et al. Long-term structural outcomes of late-stage RPE65 gene therapy. *Mol Ther*, 2020, 28(1): 266-278
- [100] Suh S, Choi EH, Leinonen H, et al. Publisher correction: restoration of visual function in adult mice with an inherited retinal disease via adenine base editing. *Nat Biomed Eng*, 2020, 4(11): 1119
- [101] Gillmore JD, Gane E, Taubel J, et al. CRISPR-Cas9 *in vivo* gene editing for transthyretin amyloidosis. *N Engl J Med*, 2021, 385(6): 493-502
- [102] 张雨超, 郝瑞栋, 徐建青. CRISPR/Cas9技术在感染性疾病中的应用. *微生物与感染*, 2016, 11(5): 317-320
- [103] 张岩松, 陈丽娇, 张婷, 等. 基因治疗的研究进展. *中国细胞生物学学报*, 2020, 42(10): 1858-1869
- [104] Lundstrom K. Viral vectors in gene therapy. *Diseases*, 2018, 6(2): 42
- [105] Dunbar CE, High KA, Joung JK, et al. Gene therapy comes of age. *Science*, 2018, 359(6372): eaan4672
- [106] Wang D, Tai PWL, Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(5): 358-378
- [107] Asokan A, Schaffer DV, Jude Samulski R. The AAV vector toolkit: poised at the clinical crossroads. *Mol Ther*, 2012, 20(4): 699-708
- [108] Ganem D, Varmus HE. The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Annu Rev Biochem*, 1987, 56(1): 651-693
- [109] Chen J, Zhang W, Lin J, et al. An efficient antiviral strategy for targeting hepatitis B virus genome using transcription activator-like effector nucleases. *Mol Ther*, 2014, 22(2): 303-311
- [110] Ramanan V, Shlomai A, Cox DBT, et al. CRISPR/Cas9 cleavage of viral DNA efficiently suppresses hepatitis B virus. *Sci Rep*, 2015, 5(1): 10833
- [111] Wang CX, Cannon PM. The clinical applications of genome editing in HIV. *Blood*, 2016, 127(21): 2546-2552
- [112] Wang Q, Chen S, Xiao Q, et al. Genome modification of CXCR4 by *Staphylococcus aureus* Cas9 renders cells resistance to HIV-1 infection. *Retrovirology*, 2017, 14(1): 5
- [113] Wang CX, Cannon PM. Clinical applications of genome editing to HIV cure. *AIDS Patient Care STDs*, 2016, 30(12): 539-544
- [114] Liu Z, Chen S, Jin X, et al. Genome editing of the HIV co-receptors CCR5 and CXCR4 by CRISPR-Cas9 protects CD4⁺ T cells from HIV-1 infection. *Cell Biosci*, 2017, 7(1): 47
- [115] Perez EE, Wang J, Miller JC, et al. Establishment of HIV-1 resistance in CD4⁺ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(7): 808-816
- [116] Holt N, Wang J, Kim K, et al. Human hematopoietic stem/progenitor cells modified by zinc-finger nucleases targeted to CCR5 control HIV-1 *in vivo*. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(8): 839-847
- [117] Yao Y, Nashun B, Zhou T, et al. Generation of CD34⁺ cells from CCR5-disrupted human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Hum Gene Ther*, 2012, 23(2): 238-242
- [118] Ye L, Wang J, Beyer AI, et al. Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5Δ32 mutation confers resistance to HIV infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(26): 9591-9596
- [119] Wilen CB, Wang J, Tilton JC, et al. Engineering HIV-resistant human CD4⁺ T cells with CXCR4-specific zinc-finger nucleases. *PLoS Pathog*, 2011, 7(4): e1002020
- [120] Yuan J, Wang J, Crain K, et al. Zinc-finger nuclease editing of human cxcr4 promotes HIV-1 CD4⁺ T cell resistance and enrichment. *Mol Ther*, 2012, 20(4): 849-859
- [121] Ren J, Zhao Y. Advancing chimeric antigen receptor T cell therapy with CRISPR/Cas9. *Protein Cell*, 2017, 8(9): 634-643
- [122] Ren J, Liu X, Fang C, et al. Multiplex genome editing to generate universal CAR T cells resistant to PD1 inhibition. *Clin Cancer Res*, 2018, 23(9): 2255-2266
- [123] Ren J, Zhang X, Liu X, et al. A versatile system for rapid multiplex genome-edited CAR T cell generation.

- [Oncotarget](#), 2017, 8(10): 17002-17011
- [124] Hoos A. Development of immuno-oncology drugs — from CTLA4 to PD1 to the next generations. [Nat Rev Drug Discov](#), 2016, 15(4): 235-247
- [125] Cyranoski D. Chinese scientists to pioneer first human CRISPR trial. [Nature](#), 2016, 535(7613): 476-477
- [126] Cyranoski D. CRISPR gene-editing tested in a person for the first time. [Nature](#), 2016, 539(7630): 479
- [127] Lu Y, Xue J, Deng T, et al. Safety and feasibility of CRISPR-edited T cells in patients with refractory non-small-cell lung cancer. [Nat Med](#), 2020, 26(5): 732-740
- [128] Koo T, Yoon AR, Cho HY, et al. Selective disruption of an oncogenic mutant allele by CRISPR/Cas9 induces efficient tumor regression. [Nucleic Acids Res](#), 2017, 45(13): 7897-7908
- [129] Stadtmauer EA, Fraietta JA, Davis MM, et al. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. [Science](#), 2020, 367(6481): eaba7365
- [130] Zhang S, Zhang F, Chen Q, et al. CRISPR/Cas9-mediated knockout of NSD1 suppresses the hepatocellular carcinoma development via the NSD1/H3/Wnt10b signaling pathway. [J Exp Clin Cancer Res](#), 2019, 38(1): 467
- [131] He J, Zhang W, Li A, et al. Knockout of NCOA5 impairs proliferation and migration of hepatocellular carcinoma cells by suppressing epithelial-to-mesenchymal transition. [Biochem Biophys Res Commun](#), 2018, 500(2): 177-183
- [132] Kawaguchi N, Tashiro K, Taniguchi K, et al. Nogo-B (Reticulon-4B) functions as a negative regulator of the apoptotic pathway through the interaction with c-FLIP in colorectal cancer cells. [Biochim Biophys Acta](#), 2018, 1864(8): 2600-2609
- [133] Zhu B, Chen S, Hu X, et al. Knockout of the Nogo-B gene attenuates tumor growth and metastasis in hepatocellular carcinoma. [Neoplasia](#), 2017, 19(7): 583-593
- [134] Cox DBT, Platt RJ, Zhang F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. [Nat Med](#), 2015, 21(2): 121-131
- [135] Ihry RJ, Worringer KA, Salick MR, et al. p53 inhibits CRISPR-Cas9 engineering in human pluripotent stem cells. [Nat Med](#), 2018, 24(7): 939-946
- [136] Haapaniemi E, Botla S, Persson J, et al. CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. [Nat Med](#), 2018, 24(7): 927-930
- [137] Enache OM, Rendo V, Abdusamad M, et al. Author Correction: Cas9 activates the p53 pathway and selects for p53-inactivating mutations. [Nat Genet](#), 2020, 52(7): 748-749
- [138] 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
- [139] Cullot G, Boutin J, Toutain J, et al. CRISPR-Cas9 genome editing induces megabase-scale chromosomal truncations. [Nat Commun](#), 2019, 10(1): 1136
- [140] Song Y, Liu Z, Zhang Y, et al. Large-fragment deletions induced by Cas9 cleavage while not in the BEs system. [Mol Ther - Nucleic Acids](#), 2020, 21: 523-526
- [141] Mout R, Ray M, Lee YW, et al. *In vivo* delivery of CRISPR/Cas9 for therapeutic gene editing: progress and challenges. [Bioconjugate Chem](#), 2017, 28(4): 880-884
- [142] Charlesworth CT, Deshpande PS, Dever DP, et al. Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans. [Nat Med](#), 2019, 25(2): 249-254
- [143] 褚嘉祐. 遗传学研究领域发展过程中不可忽视的伦理学问题. [遗传](#), 2019, 41(5): 447-450
- [144] Woods NB, Bottero V, Schmidt M, et al. therapeutic gene causing Lymphoma. [Nature](#), 2006, 440(7088): 1123
- [145] Mavilio F, Ferrari G. Genetic modification of somatic stem cells. [EMBO Rep](#), 2008, 9(S1): S64
- [146] Lappé M. Ethical issues in manipulating the human germ line. [J Med Philosophy](#), 1991, 16(6): 621-639
- [147] 马云青, 常兴. 基因编辑与基因治疗. [生命的化学](#), 2019, 39(1): 21-27
- [148] Lee HB, Sundberg BN, Sigafoos AN, et al. Genome engineering with TALE and CRISPR systems in neuroscience. [Front Genet](#), 2016, 7(47): 1
- [149] Millman A, Bernheim A, Stokar-Avihail A, et al. Bacterial retrons function in anti-phage defense. [Cell](#), 2020, 183(6): 1551-1561.e12
- [150] Yee T, Furuichi T, Inouye S, et al. Multicopy single-stranded DNA isolated from a gram-negative bacterium, *Myxococcus xanthus*. [Cell](#), 1984, 38(1): 203-209
- [151] Dhundale A, Lampson B, Furuichi T, et al. Structure of msDNA from *myxococcus xanthus*: Evidence for a long, self-annealing RNA precursor for the covalently linked, branched RNA. [Cell](#), 1987, 51(6): 1105-1112
- [152] Rice SA, Lampson BC. Bacterial reverse transcriptase and msDNA. [Virus Genes](#), 1995, 11(2-3): 95-104
- [153] Herzer PJ. Starvation-induced expression of retron-Ec107 and the role of ppGpp in multicopy single-stranded DNA production. [J Bacteriol](#), 1996, 178(15): 4438-4444
- [154] Elfenbein JR, Knodler LA, Nakayasu ES, et al. Multicopy single-stranded DNA directs intestinal colonization of enteric pathogens. [PLoS Genet](#), 2015, 11(9): e1005472
- [155] Simon AJ, Ellington AD, Finkelstein IJ. Retrons and their applications in genome engineering. [Nucleic Acids](#)