

CRISPR/Cas9 系统在疾病研究和治疗中的应用

史梦然¹, 沈宗毅¹, 张楠¹, 王璐瑶¹, 喻长远¹, 杨昭^{1,2}

1 北京化工大学 生命科学与技术学院, 北京 100029

2 塔里木大学 生命科学学院 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室, 新疆 阿拉尔 843300

史梦然, 沈宗毅, 张楠, 等. CRISPR/Cas9 系统在疾病研究和治疗中的应用. 生物工程学报, 2021, 37(4): 1205-1228.

Shi MR, Shen ZY, Zhang N, et al. CRISPR/Cas9 technology in disease research and therapy: a review. Chin J Biotech, 2021, 37(4): 1205-1228.

摘要: 基因组编辑技术 (Genome editing technology) 是一种通过人工手段在基因组水平对 DNA 序列进行改造的遗传操作技术, 包括特定 DNA 片段的插入、敲除、替换和点突变。其中, 依赖核酸酶的基因组编辑技术的基本原理是在基因组的特定位置产生双链 DNA 断裂 (Double-stranded break, DSB) 后通过非同源末端连接 (Non-homologous end joining, NHEJ) 或同源重组 (Homologous recombination, HR) 的方式进行修复。随着对核酸酶更深入的研究, 基因组编辑技术也得到了快速发展, 其中最常使用的核酸酶主要包括巨型核酸酶、锌指核酸酶、转录激活因子样效应物核酸酶以及成簇的规律间隔的短回文重复序列相关蛋白 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-associated proteins (Cas)。文中在介绍上述基因组编辑技术的发展及作用原理的基础上, 主要综述了 CRISPR/Cas9 系统在基因功能鉴定、疾病模型建立、基因治疗和免疫治疗等应用领域研究进展, 并对其未来发展进行了展望。

关键词: 基因组编辑, CRISPR/Cas9, 单碱基编辑, 转录调控, 肿瘤

CRISPR/Cas9 technology in disease research and therapy: a review

Mengran Shi¹, Zongyi Shen¹, Nan Zhang¹, Luyao Wang¹, Changyuan Yu¹, and Zhao Yang^{1,2}

1 College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China

2 College of Life Science, Engineering Laboratory of South Xinjiang Chemical Resources Utilization of Xinjiang Production and Construction Corps, Tarim University, Alar 843300, Xinjiang, China

Abstract: Genome editing is a genetic manipulation technique that can modify DNA sequences at the genome level, including insertion, knockout, replacement and point mutation of specific DNA fragments. The ultimate principle of genome

Received: July 1, 2020; **Accepted:** October 13, 2020

Supported by: National Key Research and Development Program of China (No. 2017YFA0105900), Beijing-Tianjin-Hebei Basic Research Cooperation Special Project (No. 19JCZDJC65800(Z)), Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. buctrc201910).

Corresponding author: Zhao Yang. Tel: +86-10-64421335; E-mail: yangzhao@mail.buct.edu.cn

国家重点研发计划 (No. 2017YFA0105900), 京津冀基础研究合作专项 (No. 19JCZDJC65800(Z)), 中央高校基本科研业务费 (No. buctrc201910) 资助。

editing technology relying on engineered nucleases is to generate double-stranded DNA breaks at specific locations in genome and then repair them through non-homologous end joining or homologous recombination. With the intensive study of these nucleases, genome editing technology develops rapidly. The most used nucleases include meganucleases, zinc finger nucleases, transcription activator-like effector nucleases, and clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated Cas proteins. Based on introducing the development and principles of above mentioned genome editing technologies, we review the research progress of CRISPR/Cas9 system in the application fields of identification of gene function, establishment of disease model, gene therapy, immunotherapy and its prospect.

Keywords: genome editing, CRISPR/Cas9, base editing, transcriptional regulation, tumor

1 CRISPR/Cas9 技术

1.1 CRISPR 技术简介

1.1.1 CRISPR 系统概述

CRISPR/Cas 系统是来自细菌及古生菌的一种天然免疫系统，由 CRISPR 序列和高度多样化的 Cas 蛋白组成。CRISPR 序列由重复序列区 (Repeats) 和间隔区 (Spacers) 组成。重复序列区含有回文序列，可以形成发卡结构，间隔区是被俘获的外源 DNA 序列。Cas 蛋白根据功能可以分为 4 个模块：适应模块主要参与获取 Spacer 以及外源基因整合到 CRISPR 序列的过程；表达处理模块负责 pre-crRNA 的处理；干扰和效应子模块参与靶标识别和切割；信号转导和辅助模块是一系列功能不同的基因的集合。

基于 Cas 蛋白的序列、组合差异，CRISPR

系统可被分为 2 个大类。1 类 CRISPR/Cas 系统为多个 Cas 蛋白组成的效应子模块，而 2 类 CRISPR/Cas 系统为单个多域的 Cas 蛋白效应子模块。Cas 蛋白分类示意图见图 1。

1 类 CRISPR/Cas 系统包括 I 型、III 型、IV 型；2 类 CRISPR/Cas 系统结构简单、靶向效率高，目前已广泛应用于基因编辑领域。其中，II 型的效应蛋白 Cas9 有两个结构域：HNH 和 RuvC 样核酸酶结构域，每个结构域负责切割 DNA 的一条链；V 型效应蛋白 Cas12 仅包含一个可切割两条链的 RuvC 样结构域；VI 型效应蛋白 Cas13 包含两个 HEPN 域，可靶向切割 DNA 和 RNA^[1-3]。

1.1.2 作用原理

作为细菌应对外源遗传物质（如噬菌体）的入侵而形成的适应性免疫，CRISPR 系统的不同分型产生防御作用的过程相似，可总结为以下

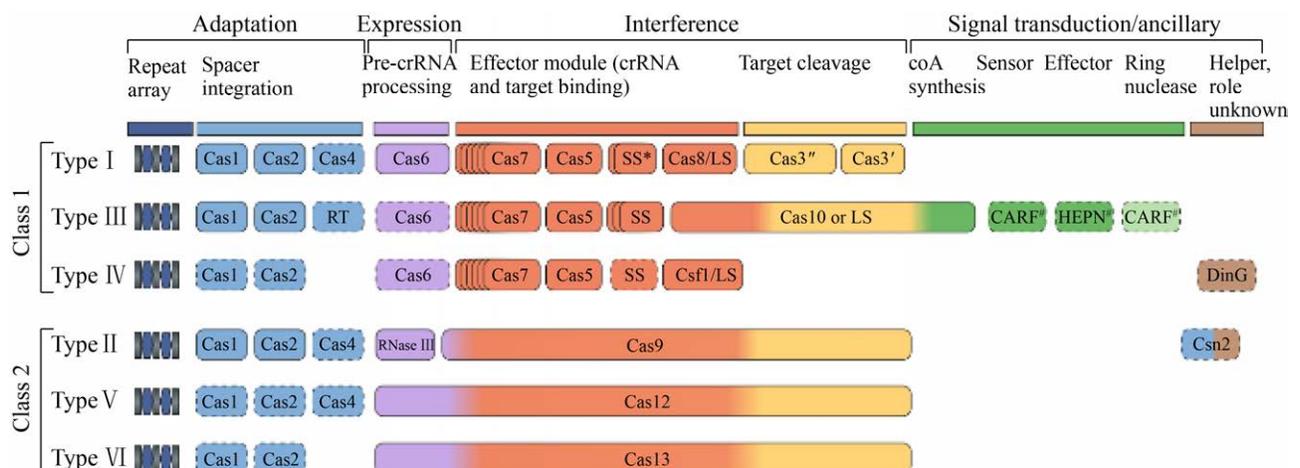


图 1 Cas 蛋白分类示意图^[1]

Fig. 1 Schematic of Cas protein classification^[1].

3 个阶段：适应阶段、表达阶段及干扰阶段。以 CRISPR/Cas9 系统为例，当细菌检测到噬菌体 DNA 时，噬菌体 DNA 中的被称为前间隔序列的一小段被截取下来整合到细菌的 CRISPR 序列中，产生“免疫记忆”，此为适应阶段；当同样的噬菌体再次侵入，带有外源遗传物质的 CRISPR 序列可以迅速转录出前体 CRISPR RNA (pre-crRNA)，在 RNase III 的作用下被加工成为成熟的 crRNA，与 tracrRNA 互补形成双链 RNA 结构，此为表达阶段；这个双链结构可与 Cas9 蛋白形成核糖核蛋白复合体，在这个复合体中 Cas9 蛋白负责识别特定的前间隔序列邻近基序 (Protospacer adjacent motif, PAM)，双链 RNA 负责与靶序列结合，同时符合上述两个条件，Cas9 蛋白的酶切活性才能被激活。被激活的 Cas9 蛋白可以促使靶基因产生双链 DNA 断裂 (Double-stranded DNA breaks, DSB)，此为干扰阶段。图 2 为 CRISPR/Cas9 技术示意图。

最近几年，研究人员发现 CRISPR 系统不仅可以用来切割病毒 DNA，也可以精确地切割其他的 DNA 序列，crRNA-tracrRNA 被简化为单链导向 RNA (Single guide RNA, sgRNA)，可以被简单地设计、合成，通过改变 sgRNA 的序列即可匹配靶基因，进而引导 Cas9 蛋白到指定位置切割 DNA。针对产生的 DSB，细胞有两种相应的 DNA 断裂修复机制：非同源末端连接 (Non-homologous end joining, NHEJ) 和同源重组 (Homologous recombination, HR)。其中 NHEJ 是一种主要的修

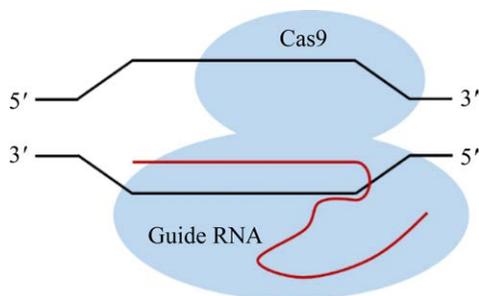


图 2 CRISPR/Cas9 技术

Fig. 2 CRISPR/Cas9 technology.

复方式。简单来说就是多种修复酶在 DNA 断裂处强行将两段 DNA 连接起来，因此这种修复方式比较容易出现问题，造成插入或缺失突变 (Indel)。而 HR 是一种更精确的修复方式，需要提供外源 DNA 片段，在产生 DSB 后，这个外源片段可以与切割末端配对重新组合，对断裂的基因进行替换或修复。

1.2 CRISPR/Cas9 技术与其他基因组编辑技术的比较

1.2.1 巨型核酸酶

巨型核酸酶 (Meganuclease) 是一种具有较大的切割识别位点 (14–40 bp) 的核酸内切酶，由于其识别位点较长，这种基因编辑的方法特异性很高。巨型核酸酶主要以归巢核酸内切酶 (Homing endonuclease, HEs) 为代表，可在归巢的过程中引发 DSB 随后诱导基因重组^[4]。

酿酒酵母的线粒体内含子编码的核酸内切酶 I-Sce I 是一种归巢核酸内切酶，负责内含子归巢。有研究证明 I-Sce I 可以在小鼠基因组的预测位置引入 DSB，并且利用断裂部位两侧的供体分子同源区域修复断裂，这种诱导的同源重组的频率比自发同源重组的频率高大约 2 个数量级，证明了 I-Sce I 在设计基因组重排中的有效性。

Smith 等通过半理性设计，首先选择 I-Cre I 的几个残基 (例如：K28、N30、D75) 进行突变，结合高通量筛选 (High-throughput screening, HTS)，从 I-Cre I 衍生出了数百种新型核酸内切酶^[5]。又对 I-Cre I 与 DNA 结合的亚结构域进行突变，使核酸酶可实现对选定 DNA 序列的切割。最终，这些突变被组装到一起形成了一个异源二聚体核酸内切酶，在酵母细胞内实现了对 RAG 基因的特异性切割，证明了通过改造可以生成新型核酸内切酶，扩宽其在基因组工程领域的应用范围。

前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶 kexin-9 (Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PSK9) 可以阻碍有害的低密度脂蛋白 (LDL) 胆固醇从

血液中移除,增加人患心血管疾病的危险。有研究证明抑制 *PCSK9* 可通过降低血清胆固醇来治疗心血管疾病^[6]。Wang 等对猴子静脉注射 I-Cre I^[7],6 个月后,在被处理的猴子中检测到约 60% 的肝细胞的 *PCSK9* 基因被敲除,与对照相比,*PCSK9* 蛋白的血液表达降低约 80%,LDL 胆固醇降低 60%,为不能耐受抗 *PCSK9* 蛋白药物的高胆固醇心脏病患者提供了一种治疗策略。

巨型核酸酶本身的编码基因约 1 kb,所以很容易包裹在腺病毒载体 (Adeno-associated viral vector, AAV) 中进行递送,且识别位点长,所以这种基因编辑的特异性很高。但这种较长的靶标位点即使在大型基因组内也很罕见,虽然可以通过蛋白改造以扩宽巨型核酸酶的识别范围,但该过程成本高且耗时,这也就导致了巨型核酸酶无法广泛应用。

1.2.2 锌指核酸酶

锌指核酸酶 (Zinc-finger nucleases, ZFNs) 是较早出现的一种基因编辑方式^[8],模块化架构简单,由可结合 DNA 的锌指结构域和衍生自 *Fok I* 限制酶的核酸酶结构域组成,二者通过短的接头序列连接。每个锌指可以特异性识别 3-4 个碱基,3 个锌指最多可以与 18 bp 的 DNA 靶序列结合,这样的序列在基因组水平已具有特异性,可以实现基因的定位。由于 *Fok I* 仅在作为二聚体时才具有酶促活性,所以,当正反两个互补的识别位点间距离为 6-8 bp 时,两个 *Fok I* 形成二聚体后进行酶切,从而使 DNA 双链断裂^[9]。图 3 为锌指核酸酶技术示意图。

Naldini 研究组利用整合酶缺陷型慢病毒载体

(Integrase-deficient lentivirus, IDLV) 递送 ZFN,靶向不同细胞类型的 IL-2 受体通用 γ 链基因^[10],并提供在不同细胞类型中进行基因编辑的模板 DNA,结果在靶基因处实现了 13%-39% 的编辑效率。

线粒体疾病是一种因线粒体 DNA (Mitochondrial DNA, mtDNA) 突变引起的疾病,通常突变的 mtDNA 和野生型 mtDNA 是共存的,当突变 mtDNA 的比例超过 60% 时就会出现相应症状,所以治疗线粒体疾病的一个策略就是将突变的 mtDNA 比例降至 60% 以下。由于线粒体内缺少良好的 DNA 修复策略,所以一旦产生 DSB,mtDNA 很容易被降解。Minczuk 研究组通过 AAV 将靶向突变 mtDNA 的 ZFN 静脉注射入小鼠^[11],随后被运送至小鼠心脏,结果发现中等剂量的注射策略得到了最好的效果,心脏组织中突变 mtDNA 的比例由 73% 下降至 37%,下降约 40%,有效地改善了心脏代谢功能。

亨廷顿基因 (*Huntingtin*, *HTT*) CAG 序列的异常扩增将导致突变蛋白 (Mutant *HTT*, mHTT) 的表达,从而引起亨廷顿舞蹈症 (Huntington's disease, HD) 的发生。Zeitler 等将锌指蛋白 (Zinc-finger protein, ZFP) 与 *Kox1* 的转录阻遏结构域 Krüppel-associated box (KRAB) 融合表达,所得到的锌指蛋白转录因子 (ZFP-transcription factors, ZFP-TFs),能够靶向致病性重复 CAG 序列。在源自亨廷顿舞蹈症患者的成纤维细胞和神经元中,ZFP-TFs 可抑制 99% 的致病基因 (*mHTT*) 的表达,而保留了 >86% 的正常 *HTT* 基因的表达。上述研究结果证明了 ZFP-TFs 在 HD 方面的治疗潜力^[12]。

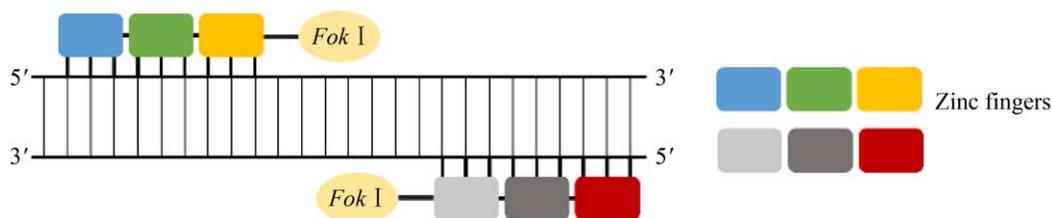


图 3 锌指核酸酶技术

Fig. 3 Zinc finger nuclease technology.

虽然 ZFNs 的编辑效率较高,但这种基因编辑的方法需要不同锌指核酸酶的组合保证基因编辑的序列特异性;然而为不同的靶序列设计不同的锌指核酸酶工作量大、效率低,限制了其广泛使用。

1.2.3 转录激活因子样效应物核酸酶

转录激活因子样效应物核酸酶 (Transcription activator-like (TAL) effector nucleases, TALENs) 是 ZFNs 后出现的另一种基因编辑效应蛋白^[13],其原理与 ZFNs 相似,主要由与 DNA 结合的 TALE 模块和核酸酶结构域组成。其中,TALE 的识别模块由 34 个氨基酸组成,每种碱基都有相对应的 TALE 模块,所以理论上,按照目标序列将不同的 TALE 模块连接就可以识别特定序列。*Fok I* 与 TALE 结合后形成 TALEN 蛋白,当一对 TALE 识别靶点处的正反序列后,*Fok I* 形成二聚体对 DNA 进行切割。图 4 为转录激活因子样效应物核酸酶技术示意图。

Hockemeyer 等首次将 TALENs 技术用于干细胞领域^[14],在人类胚胎干细胞 (Embryonic stem cell, ESCs) 和诱导性多能干细胞 (Induced pluripotent stem cells, iPS cells) 的 5 个位点评估 TALENs 进行基因修饰的频率,结果在 5 个位点处得到了与基因位点相关的不同频率的基因修饰。例如对于 *OCT4* 基因的第一个外显子,编辑频率在 67%–100% 之间,而对于 *OCT4* 的终止密

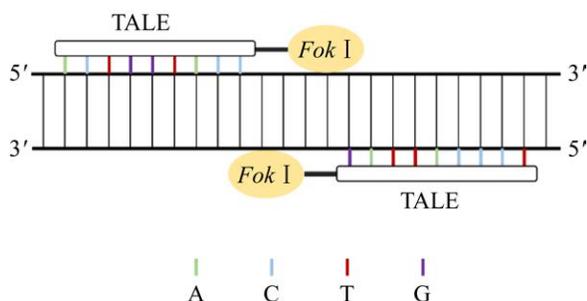


图 4 转录激活因子样效应物核酸酶技术
Fig. 4 Transcription activator-like effector nuclease technology.

码子区域,编辑频率在 2%–46% 之间。Bacman 等通过 AAV 将靶向突变的 mtDNA 的 TALEN 注入小鼠肌肉,6 个月后发现小鼠肌肉内突变 mtDNA 的比例下降了约 50%^[15]。

与 ZFN 相比,TALEN 更容易设计,并且在一项靶向 C-C 趋化因子受体 5 (C-C motif chemokine receptor 5, *CCR5*) 的特异性实验中^[16],ZFN 造成了 11% 的错误突变,而 TALEN 的错误突变率仅为 1%,证明了 TALEN 有着比 ZFN 更高的准确率。TALEN 一度处在基因组编辑技术的最前沿,但同时,TALEN 的模块组装困难,使得 TALEN 模块组装周期较长,且组装好的 TALEN 较大,使用载体向细胞内递送存在障碍。虽然一些研究开发了构建模块的方法^[17-19],但其领先地位在 CRISPR 技术出现后逐渐被取代^[20]。

1.2.4 CRISPR/Cas9 技术

2013 年出现了大量针对 CRISPR 技术的报道^[21-24],标志着基因组编辑技术进入了一个新的阶段。CRISPR/Cas9 技术是通过 sgRNA 的序列保证基因编辑的特异性,并不涉及与 *Fok I* 的连接,免疫原性较低。可见,与其他基因编辑方法相比,CRISPR/Cas9 技术效率高、安全性高、通量高、方法简单且易实现。

2 CRISPR/Cas9 技术的应用

2.1 基因敲除

2.1.1 基因功能的鉴定

随着分子生物学和测序技术的发展,人们对疾病的认识进入了分子水平,发现了人类许多疾病的发生、进展都可能与基因突变相关。例如:某些原癌基因的突变可促使肿瘤的发生,甚至某些抑癌基因的突变可通过导致原癌基因的激活从而使肿瘤发生等^[25]。所以确定与疾病密切相关的基因及其功能将有助于为临床治疗提供更好的策略。随着 CRISPR 技术的迅速发展,基于 CRISPR 技术的基因组筛选在实验室水平上已得到了广泛

的应用,这种筛选方法具有文库设计灵活、操作简单、覆盖范围广等优点。

为了确定急性髓性白血病 (Acute myeloid leukemia, AML) 细胞增殖过程中的关键代谢酶基因, Lowe 研究组对 AML 细胞进行了以代谢酶为靶点的 CRISPR/Cas9 功能基因组筛选, 鉴定出吡哆醛激酶 (Pyridoxal kinase, PDXK), 负责催化维生素 B6 生成磷酸吡哆醛 (Pyridoxal phosphate, PLP), 能够促进 AML 细胞利用维生素 B6, 进而产生 AML 增殖所需的关键酶和核苷酸等^[26]。当 PDXK 被抑制或阻断后, AML 细胞无法利用维生素 B6, 增殖受阻。而破坏 PDXK 对其他肿瘤细胞 (如人肉瘤细胞等) 的增殖无显著影响。该研究表明, 通过抑制 PDXK 或阻断维生素 B6 信号通路的激活是一种潜在的治疗 AML 的方法。

融合基因是指两种基因的编码区异常结合在一起的现象, 经常发生于实体瘤中。目前, 已报道的融合基因有 20 000 多种, 但它们在肿瘤发生和进展中的作用尚不完全清楚。Garnett 研究组分析了来自 43 种不同癌症类型的 8 000 多种融合基因^[27], 并利用 CRISPR/Cas9 文库筛选, 首次发现了在胶质母细胞瘤 AM-38 细胞、卵巢癌 ES-2 细胞、头颈癌 SAS 细胞中共同存在的一种融合基因 *YAPI-MAML2*。这种融合基因通过上调表达 *YAPI*, 激活 Hippo 信号传导, 进而促进肿瘤细胞的耐药、抗凋亡和进化, 最终导致肿瘤患者的不良预后^[28]。综上, 抑制 Hippo 信号通路是治疗具有 *YAPI-MAML2* 融合基因实体瘤的新思路。

吉西他滨是治疗晚期或转移性胆囊癌的一种有效药物, 但某些患者对于这种治疗策略存在抗药性甚至不良反应。为了鉴定胆囊癌的耐药机制, Xu 等利用 CRISPR/Cas9 技术对胆囊癌细胞 NOZ 进行了功能基因组筛选, 鉴定了 *ELP5* 基因的缺失赋予了 NOZ 细胞抵抗吉西他滨的能力^[29]。机制方面, *ELP5* 是延伸因子复合物 (Elongator complex) 的亚基, 它的缺失能够诱导延伸因子复

合物的降解。更重要的是, *ELP5* 的缺失显著降低了异质核糖核蛋白 Q 的表达, 从而抑制 P53 蛋白的磷酸化和激活。最终, P53 的表达量下降或活性抑制是胆囊癌细胞抵抗吉西他滨的主要原因。综上, 延伸因子复合物-*hnRNPQ*-P53 通路参与调控胆囊癌细胞对吉西他滨的敏感性, 增强该信号通路是一种潜在的治疗策略。

在另外一项研究中, Chen 等通过 mGeCKOa 文库处理一株非转移性小鼠非小细胞肺癌细胞^[30], 然后将病毒感染的细胞移植给免疫缺陷小鼠, 制备皮下移植瘤模型。肿瘤形成后, 将原发灶和转移灶的肿瘤分离并进行测序比较、分析 sgRNA 的富集程度。测序结果表明 *Nf2*、*pten*、*cdkn2a*、*trim72*、*fga* 等基因的缺失与肿瘤转移密切相关。

因此, CRISPR 系统的基因组筛选技术的快速发展, 有效地推动了致病基因和疾病新型治疗靶点的筛选鉴定, 促进了疾病的分子分型和预后预测等诸多领域的研究进程, 为开发更特异更有效的诊疗方法奠定了理论基础。

2.1.2 疾病模型建立

动物疾病模型可以模拟人类疾病的生物学和病理特征, 在疾病发生机理和药物筛选等基础和转化研究中发挥关键作用。CRISPR/Cas9 技术因具有编辑效率高、操作简单和适用范围广等优点, 已广泛用于肿瘤、神经退行性疾病、白化病等疾病模型的建立^[31-34]。

小细胞肺癌 (Small cell lung cancer, SCLC) 是一种高度侵袭性的神经内分泌肺癌, 约占所有肺癌病例的 13%–15%。SCLC 生长速度快、易发生复发和转移。由于缺乏有效的新型治疗方法, SCLC 的临床治疗效果在近 30 年没有明显改善。SCLC 动物模型的建立和发病机理的深入研究, 对开发新型治疗靶点至关重要。Tyler Jacks 研究团队通过 CRISPR/Cas9 技术同时敲除抑癌基因 *Trp53* 和 *Rbl*^[31], 成功构建了 SCLC 的小鼠模型。

在此基础上,证明了 *p107* 和 *p130* 的缺失能够加速肿瘤的生长、显著降低荷瘤小鼠生存期。该研究提供了一种人 SCLC 的小鼠模型,适用于研究 SCLC 的致病机理。

肝癌是指发生于肝脏细胞的恶性肿瘤,分为原发性肝癌和继发性肝癌。手术切除和放化疗仍是临床治疗的主要手段,但易造成复发和转移,使得肝癌患者预后很差,5 年生存率仅为 14.1%^[35]。因此深入研究肝癌的发生机制并鉴定特异标志物,对肝癌的早期诊疗具有重大意义。Xue 等通过 CRISPR/Cas9 技术,同时靶向小鼠肝细胞的抑癌基因 *PTEN* 和 *P53*。结果表明,3% 的肝细胞同时缺失了抑癌基因 *PTEN* 和 *P53*。3 个月 after,所有 5 只小鼠都生成了具有胆汁分化特征的肝肿瘤,成功构建了肝癌的小鼠模型^[32]。

帕金森氏病是一种影响患者活动能力的中枢神经系统疾病,多发生于中老年人群。*PARK2* 基因和 *PINK1* 基因中任意一个发生突变都会造成帕金森氏病的发作。为了构建这一疾病模型动物,Zhou 等将靶向 *PARK2* 和 *PINK1* 的 CRISPR/Cas9 表达载体转染至来自 35 日龄大的猪的成纤维细胞 (Porcine fetal fibroblasts, PFF) 中^[33],通过体细胞核移植 (Somatic cell nuclear transfer, SCNT) 获得重组胚胎,并将胚胎转移给受孕母亲。DNA 测序结果表明获得的 20 只克隆仔猪在预计的靶点处均携带了预期的纯合突变 (*PARK2*^{-/-}/*PINK1*^{-/-})。免疫荧光分析表明 *PARK2*^{-/-}/*PINK1*^{-/-} 的猪的脑神经元中未发现 PTEN 诱导激酶 1 (由 *PINK1* 基因编码) 和 Parkin 蛋白 (由 *PARK2* 基因编码),成功构建了帕金森氏病的模型猪。虽然在 7 个月大的模型猪中尚未观察到帕金森氏病的典型症状,但这一模型的成功构建有助于后续对帕金森氏病的症状及治疗策略的研究。

白化病是由于酪氨酸酶缺乏或功能减退引起的一种皮肤及附属器官黑色素缺乏或合成障碍导致的遗传性疾病,有研究表明酪氨酸酶

(Tyrosinase, *Tyr*) 基因 291G-T 的突变会在有色素的 C57BL/6J 小鼠中引起白化病^[36]。为了构建此类白化病小鼠模型,Mizuno 等向 C57BL/6J 小鼠胚胎中注射了 CRISPR/Cas9 表达载体以及突变的 DNA 供体^[34],然后将该胚胎转移给受孕小鼠。在获得的 27 只具有白化症状的小鼠中有 11 只 *Tyr* 基因发生了 291G-T 的单核苷酸突变,这 11 只小鼠中有 10 只小鼠除 291G-T 的单核苷酸突变外,在 *Tyr* 基因靶点周围还产生了单等位基因的插入缺失,其余 16 只小鼠在 291G 处未产生突变但在该靶点周围产生了插入缺失突变。该研究成功构建了白化病小鼠模型,有助于研究白化病的致病机理。

以上研究表明,通过 CRISPR/Cas9 技术构建动物疾病模型,有助于研究疾病发展的分子机理,为开发针对疾病的精准医疗方案奠定理论基础。

2.1.3 基因治疗

基因治疗 (Gene therapy) 是指将外源基因导入靶细胞,修正或补偿由于基因异常或缺失导致的疾病的一种治疗方法。CRISPR/Cas9 技术凭借其编辑效率高、可同时靶向多个靶基因等特点,已报道被用于肿瘤、神经退行性疾病、造血系统疾病和艾滋病等疾病的基因治疗^[37-43]。

Guo 等将靶向乳腺癌驱动基因之一 *LCN2* 的 sgRNA-Cas9 的核糖核蛋白复合物 (Ribonucleoprotein, RNP) 包裹在一种纳米脂质凝胶中,并在载体表面偶联可特异性识别三阴性乳腺癌 (Triple negative breast cancer, TNBC) 细胞的细胞间黏附分子-1 (Intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1) 来提高递送的靶向性。结果发现敲除 *LCN2* 显著影响了 TNBC 细胞的迁移,与对照相比,*LCN2* 敲除组中迁移的细胞比例降低了 60%,减弱了 TNBC 的侵袭性。在此基础上,对荷瘤小鼠尾静脉注射包裹了 RNP 的脂质凝胶,在小鼠体内实现对 *LCN2* 的敲除,结果发现 *LCN2* 敲除小鼠肿瘤的体积和重量分别减少了 77% 和 69%。该研究表明敲除 *LCN2* 可使肿瘤生长受到抑制,因

此敲除 *LCN2* 可作为治疗 TNBC 的有效策略^[37]。

肌萎缩性脊髓侧索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 俗称渐冻症, 是一种神经退行性疾病, 会引起肌肉渐进退化, 最后瘫痪直至死亡, 没有良好的治疗策略。一部分 ALS 是由超氧化物歧化酶 1 (Superoxide-dismutase-1, *SOD1*) 突变引起。Gaj 等向 ALS 小鼠注射 Cas9 和靶向 *SOD1* 的 sgRNA, 使突变的 *SOD1* 蛋白表达降低^[38]。与未经过治疗的小鼠相比, 经过处理的小鼠腰椎和胸椎区域的突变型 *SOD1* 蛋白分别减少了 3 倍和 2.5 倍, 小鼠的发作期延迟了 33 d, 平均生存期增加了 28–30 d。该研究表明敲除 *SOD1* 可有效延缓 ALS 小鼠的疾病进展, 证明了 CRISPR/Cas9 技术治疗遗传突变引起的中枢神经系统疾病的能力。

包括镰刀状细胞贫血病、 β -地中海贫血症在内的 β -血红蛋白病, 是一类由 β -珠蛋白基因突变引起的疾病。该疾病的治疗策略之一是用胎儿血红蛋白 (Fetal hemoglobin, HbF) 替代缺陷且不足的成人血红蛋白 (Adult hemoglobin, HbA)。但由于 HbF 启动子 *HBG1* 处有阻遏物的结合位点, HbF 的表达在一岁左右就被关闭了。Humbert 等通过 CRISPR/Cas9 技术对 *CD34*⁺ 的造血干细胞和祖细胞的 *HBG1* 处进行编辑^[39], 然后将细胞重新注入非人灵长类动物模型中, 发现基因编辑细胞的移植率高达 30%, 持续时间超过 1 年, 外周血中高达 18% 的红细胞可表达 HbF, 证明了被编辑的细胞有效且稳定地重新激活了 HbF 的表达, 这种结果足以逆转镰状细胞贫血病和 β -地中海贫血症的症状。

年龄相关性黄斑变性 (Age-related macular degeneration, AMD) 是一种可导致失明的视力疾病, 由于血管内皮生长因子 A (Vascular endothelial growth factor A, VEGFA) 高水平表达, 造成了脉络膜新血管形成 (Choroidal neovascularization, CNV), 血液等流体进入眼睛破坏视网膜, 从而导致疾病的发生。Kim 等对具有激光诱导产生的 CNV 的小鼠视网膜下注射了靶向 *Vegfa* 的 RNP,

注射后 3 d 在 CNV 区域的视网膜色素上皮细胞中检测到产生的插入缺失频率分别为 $22\% \pm 5\%$ 和 $24\% \pm 2\%$; 注射后 7 d, 通过评估 CNV 面积评估治疗效果, 发现注射 RNP 的小鼠与对照相比, CNV 的区域约减小 58%^[40]。该研究表明通过敲除 *Vegfa* 可有效减小小鼠 CNV 的面积, 因此, 通过基因外科手术进行 AMD 局部治疗是一种可行的策略。

肺表面活性蛋白缺乏症, 是由肺表面活性蛋白 C 基因 (*Surfactant protein-C*, *SFTPC*) 突变引起的疾病, 可导致胎儿出生时或出生不久就死亡, 几乎没有治疗选择。Peranteau 团队构建靶向敲除突变基因 *Sftpc*^{*173T*} 的 CRISPR 系统并对患病小鼠进行羊膜腔内注射^[41]。结果发现未经过治疗的小鼠在出生后 6 h 就死亡, 而经过治疗的小鼠在出生 24 h 后可保留 8% 的生存率, 一周后仍有 5.7% 的小鼠存活。表明羊膜内递送 CRISPR/Cas9 系统后出生的胎儿携带基因编辑是可行的, 这种方法为难治性遗传疾病的治疗带来希望。

毛细胞行使功能离不开跨膜离子通道样蛋白 1 (Transmembrane channel-like protein 1, *TMC1*), 若 *TMC1* 突变会导致毛细胞退化、死亡, 最终导致听力消失。由于这种突变为单核苷酸突变, 而 Jeffrey 等发现常使用的来自酿脓链球菌的 Cas9 (*Streptococcus pyogenes* Cas9, SpCas9) 在该实验中没有良好的矫正单核苷酸突变的特异性, 除了在患病小鼠 (贝多芬小鼠) 中可进行基因编辑外, 在野生型小鼠中也可能产生插入缺失突变。所以选择了可以选择性破坏突变的 *Tmc1/TMC1* 等位基因但对野生型基因没有影响的 SaCas9-KKH 变体进行后续实验^[42]。观察小鼠的内耳结构发现, 未经处理的贝多芬小鼠毛细胞结构逐渐恶化, 在 6 个月左右完全丧失听力。而经过基因治疗的贝多芬小鼠毛细胞的数量、结构被很好的保留, 部分治疗小鼠甚至可以在一年内拥有与正常小鼠相同的听力。此外, 该实验还在具有 *TMC1* 突变

的人类细胞系上进行实验,发现这种 CRISPR 系统仍然只在突变核苷酸处编辑,不会影响正常基因,有较高的安全性。以上结果表明通过 CRISPR/Cas9 技术对突变 *TMC1* 基因进行校正可以有效缓解贝多芬小鼠的症状,因此可成为治疗 *TMC1* 突变引起的耳聋的一条治疗策略。

CCR5 编码的蛋白质可以帮助 HIV 病毒进入细胞,该基因发生突变的人几乎不会受到 HIV 的侵害。基于此理论,研究人员通过 CRISPR/Cas9 技术将捐献者 CD34⁺ 成体造血干细胞的 *CCR5* 基因敲除^[43],并将其移植到患有艾滋病伴随白血病的患者体内,在进行的持续 19 个月的随访中发现,骨髓细胞能持续检测到 *CCR5* 的基因编辑,效率为 5.20%–8.28%,患者的白血病得到持续缓解。但在抗 HIV 方面,暂停使用抗 HIV 药物 4 周时,血清中的病毒载量从检测不到的水平增加至 3×10^7 /mL。虽然该研究在抵抗 HIV 方面的效果欠佳,但这是世界上首例通过基因组编辑技术敲除人造造血干细胞 *CCR5* 基因后回输至艾滋病伴随白血病患者的事件,对通过基因组编辑技术治疗艾滋病具有重要的指导意义。

以上研究表明,基于 CRISPR/Cas9 的基因组编辑技术为患者提供了一条不同于传统治疗方法的新的治疗策略,给难治性疾病带来了治疗的希望。

2.1.4 免疫治疗

自 2018 年 James P. Allison 和 Tasuku Honjo 获得诺贝尔生理学或医学奖后,针对免疫治疗的实验研究不断涌现。免疫治疗是通过调动患者自身免疫系统杀伤肿瘤细胞的一种方法,主要分为免疫检查点阻断和嵌合抗原受体 T 细胞免疫疗法 (Chimeric antigen receptor T-cell immunotherapy, CAR-T)。CRISPR/Cas9 技术通过筛选对免疫治疗至关重要的基因、对相关基因进行基因水平改造等手段,为免疫治疗带来了新的突破。

在实际应用中,并不是所有患者都能对免疫治疗产生响应,有些基因突变可能使免疫治疗失

效,所以筛选出与免疫治疗相关的基因至关重要。Patel 等建立了一个带有超过 12 万个 sgRNA 的筛选库^[44],这些 sgRNA 能靶向细胞内 19 050 个编码蛋白质的基因。作者利用该筛选文库对人黑色素瘤细胞 Mel624 的基因进行敲除,在抵抗靶向细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, CTLA4) 免疫治疗的转移性肺癌细胞中,发现了编码爱帕琳肽的基因 *APLNR* 的错义突变。小鼠体内实验结果表明,野生型黑色素瘤细胞 A375 所形成的肿瘤接受靶向 CTLA4 的免疫治疗后,50% 的肿瘤完全消退;但 *APLNR* 基因敲除的 A375 细胞,获得了抵抗靶向 CTLA4 免疫治疗的能力,所有肿瘤不仅没有消退,反而全部进展恶化。上述结果证明了 *APLNR* 的功能缺失减弱了免疫治疗的有效性。

在免疫疗法中,理想的 T 细胞是浸润到肿瘤细胞后可以维持杀伤作用并可以自我更新,但大多数 T 细胞向 CD8⁺T 细胞分化过程中都很难保证持续存活^[45]。Chi 研究组从 T 细胞代谢入手^[46],构建了靶向代谢酶、小分子转运蛋白等分子的文库,对 T 细胞进行转染后对荷瘤小鼠进行过继治疗,7 d 后发现 *Regnase-1* 在肿瘤浸润淋巴细胞中最为富集,敲除 *Regnase-1* 可延长 CD8⁺T 细胞的存活,与对照相比,可增加 CD8⁺T 细胞在肿瘤中的聚集约 2 000 倍,回输给荷瘤小鼠后,与野生 CD8⁺T 细胞相比可更有效地抑制肿瘤的生长和延长小鼠生存期。

在通过基因编辑提高免疫治疗效果方面:程序性细胞死亡受体 1 (Programmed cell death protein 1, PD-1) 与其配体细胞程序性死亡配体 1 (Programmed cell death 1 ligand 1, PD-L1) 或细胞程序性死亡配体 2 (Programmed cell death 1 ligand 2, PD-L2) 结合后会导致肿瘤微环境中的免疫抑制。阻断 PD-1/PD-L1 信号通路的激活可以抑制免疫系统的免疫抑制行为,从而促进抗肿瘤免疫。有研究证明抑制 β -catenin 可下调 PD-L1 的表达。

在此基础上, He 等开发了基于天然聚合物的递送载体并对载体进行表面修饰来提高载体的核靶向能力和细胞穿透能力。通过此载体将 CRISPR/Cas9 系统的质粒递送到肿瘤细胞核, 敲除 β -catenin 从而下调 PD-L1 的表达, 编辑效率最高约 40%^[47]。经过编辑的细胞 PD-L1 的表达水平显著下降, 将此细胞与活化的 CD8⁺ T 细胞共培养, 结果发现 CD8⁺T 细胞对编辑后的肿瘤细胞表现出强烈的细胞毒性, 可以消除大多数肿瘤细胞, 而对未编辑的肿瘤细胞的细胞毒性要弱得多。另一方面, 还发现与编辑过的肿瘤细胞共培养后的 T 细胞增殖远高于与未编辑过的肿瘤细胞共培养的 T 细胞。 γ 干扰素 (Interferon γ , IFN- γ) 是活化 T 细胞分泌的典型抗肿瘤细胞因子, 实验中发现与编辑过的肿瘤细胞共培养后, IFN- γ 阳性的 T 细胞显著增加。说明这种基因编辑不仅通过影响肿瘤细胞, 还通过影响免疫系统, 整体提高了对肿瘤的杀伤效果。

CAR-T 疗法可通过在 T 细胞表面配有人类白细胞抗原 (Human leukocyte antigen, HLA) 使杀伤性 T 细胞特异性攻击肿瘤细胞。但 HLA 在个体之间差异很大, 所以这种疗法仅针对白血病、淋巴瘤等少数几种癌症。Andrew 教授在实验中意外发现 MC.7.G5 这一 T 细胞克隆与多种肿瘤细胞, 例如肺、皮肤、血液、结肠、乳腺等共培养后, 都可以杀死 80% 以上的肿瘤细胞, 而与正常细胞共培养时却没有产生任何杀伤作用, 甚至没有分泌任何细胞因子^[48]。为了确定 MC.7.G5 识别靶标必不可少的基因, 研究人员通过 CRISPR/Cas9 技术对人体两万多个编码蛋白质的基因进行筛选, 发现了单态 MHC I 类分子相关蛋白 (MHC class I-related protein 1, MR1) 在 MC.7.G5 识别并杀伤癌细胞中起重要作用。敲除了 MR1 的癌细胞将不再被 MC.7.G5 细胞杀伤, 该研究筛选并证明了 MR1 分子表现出了泛癌细胞识别的 T 细胞抗原受体 (T cell receptor, TCR) 特性, 为泛癌、

泛人群的 T 细胞介导的免疫治疗提供新的思路。

CAR-T 细胞治疗方法的研究已经有了令人鼓舞的结果, 但利用自体 T 细胞可能因 T 细胞的质量和数量不佳以及制造自体 T 细胞产品的时间和费用等使得治疗受到阻碍。这些限制可以通过使用同种异体 T 细胞来避免, 但同种异体 T 细胞上的内源性 TCR 可能会识别受体的同种异体抗原, 从而导致移植物抗宿主病 (Graft versus-host disease, GVHD)。Ren 等使用 CRISPR/Cas9 技术同时靶向内源 TCR 和 HLA- I 类分子^[49], 获得了 TCR 和 HLA- I 表达不足的 T 细胞。将此细胞注入 NSG 小鼠中未发现 GVHD, 而注入未经编辑的 T 细胞的 5 只 NSG 小鼠中有 4 只都出现了致死性 GVHD, 说明 TCR 和 HLA- I 双敲除的 T 细胞显著降低了机体的免疫反应。在此基础上继续敲除编码 PD-1 的基因, 得到 TCR、HLA- I、PD-1 缺失的 CD19-CAR-T 细胞, 与未破坏 PD-1 的 CAR-T 治疗相比, PD-1 破坏的 CAR-T 治疗后的小鼠肿瘤面积始终更小, 体现出更强的抗肿瘤效果。

另外, 在 CAR-T 治疗中通常是使用 γ -逆转录病毒载体或其他整合载体将 CAR 转导到患者的 T 细胞, 可能导致转录沉默、克隆扩增等现象, 存在随机性。Eyquem 等通过 CRISPR/Cas9 技术敲除 T 细胞受体 α 恒定 (TRAC) 基因位点并将 CD19 特异的 CAR 插入, 结果发现 95% 的 CAR⁺ T 细胞呈现出 TCR 阴性, 成功构建了 TRAC-CAR-T 细胞^[50]。细胞毒性实验结果表明, 虽然传统 CAR-T 与 TRAC-CAR-T 细胞在肿瘤部位聚集程度相近, 但 TRAC-CAR-T 细胞控制肿瘤生长的效果更好, 可明显延长小鼠的中位生存期。

在一例对人类进行免疫治疗的 1 期临床试验中^[51], 研究人员通过 CRISPR/Cas9 技术敲除了两个编码内源性 TCR 的基因 *TCR α* 和 *TCR β* , 还有编码 PD-1 的基因 *PDCD1*, 又将靶向 NY-ESO-1 的 T 细胞受体编码基因插入到 T 细胞中, 然后将这个编辑过的 T 细胞回输入患者体内。共有 3 名

患者接受了测试, 结果发现经过编辑的 T 细胞可在体内稳定存在 9 个月; 3 名患者中只有 1 名患者出现肿瘤消退的现象, 腹部肿块减少约 50% 并持续了 4 个月, 但其他病变有进展, 对 3 名患者的骨髓活检和肿瘤活检结果表明经过编辑的 T 细胞均向肿瘤部位转运; 截止到 2019 年 12 月, 3 名患者疾病都发生了恶化, 1 名患者死亡, 其余 2 名患者接受了其他治疗。总之, 这项研究初步证明了在临床水平上通过 CRISPR/Cas9 技术进行多重基因编辑的可行性, 但仍需更多临床试验来证明或改善这种治疗方法的安全性。

在免疫治疗中, CRISPR/Cas9 技术可以对某些基因进行编辑从而提高治疗的效果, 为传统的免疫治疗带来新的契机。随着更多的动物实验和临床实验的进行, 免疫治疗的安全性和有效性有望得到进一步提高, 成为治疗肿瘤的有力武器。

2.2 基因插入

与基因敲除对应的是基因插入, 在基因组指定位置插入目的基因, 可以实现对指定基因进行功能的评估、示踪等。

2.2.1 疾病模型建立

Mou 等对野生型 B6 小鼠注射致癌基因鼠类肉瘤病毒癌基因 (Kirsten rat sarcoma viral oncogene, *KRAS*) 的模板以及靶向抑癌基因 *TP53* 的 sgRNA^[52], 一个月后在小鼠肝脏内发现肿瘤, 成功构建了肿瘤模型。在构建致癌基因 *KRAS* 的质粒时加入一段荧光素酶基因, 然后用同样的方法处理小鼠, 用体内生物发光成像可以测量和跟踪肿瘤生长随时间的变化, 实现活体肿瘤成像。

Leonetti 等将绿色荧光蛋白 (Green fluorescent protein, GFP) 标签分裂为 GFP1-10 与 GFP11, 在表达 GFP1-10 的 293T 细胞 (293T^{GFP1-10}) 中, 通过 CRISPR/Cas9 技术将 GFP11 插入感兴趣的蛋白质基因组^[53]。在同一细胞共表达后, GFP1-10 和 GFP11 非共价组装成功能性 GFP 分子, 实现对蛋白质的荧光标记。在 293T^{GFP1-10} 细胞内靶向的

48 个基因中, 有 30 个基因 (63%) 成功产生了 GFP 荧光标签, 通过共聚焦显微镜分析 GFP 荧光所在位置与相应蛋白的预期亚细胞定位相匹配, 证明了通过 CRISPR/Cas9 技术在细胞内源基因中添加 GFP 标签的方法, 为在细胞内全面表征蛋白质带来可能。

2.2.2 基因治疗

Chen 等提出了一种将“自杀基因”插入基因组从而提高癌症模型小鼠生存率的方法^[54]: *MAN2A1-FER* 融合基因可能对肝癌、卵巢癌等疾病的发展至关重要, 融合基因时会产生一个“断裂点”。研究人员通过 CRISPR/Cas9 技术将“自杀基因” *HSV1-tk* 插入断裂点的位置, 然后用前体药物更昔洛韦处理, 发现这种方法可导致 27% 的细胞死亡。将带有融合基因的肿瘤细胞移植到小鼠体内, 成瘤后利用 CRISPR/Cas9 技术插入自杀基因, 协同更昔洛韦对小鼠进行治疗。结果发现肿瘤大小比最高值减小了 29%, 实验过程中未发生明显的肿瘤转移和小鼠死亡的现象。该研究表明插入“自杀基因”可抑制肿瘤生长, 因此该方法可作为治疗携带融合基因的肿瘤的可行策略。

基因插入涉及到的主要 DNA 修复方式为 HR, 但其效率受切割位点模板 DNA 浓度低的限制。Ling 等通过将模板核苷酸偶联在经过化学修饰的 Cas9 蛋白上一起递送进细胞, 或者在 Cas9 上偶联一段短的核苷酸接头^[55], 可以通过碱基互补配对与模板 DNA 偶联, 从而提高切割位点模板的浓度。经过这种处理后, 细胞内 HR 的效率可从 20% 提高至 60%, 并且在小鼠胚胎内也可以起作用。优化了插入基因的方法, 为更有效构建细胞或动物模型提供便利。

为解决基因插入在人细胞, 尤其是干细胞内的效率不高的问题。Yu 等开发了一种将模板 DNA 的末端进行化学修饰的方法^[56]。该研究共构建了 13 种化学基团末端修饰的模板 DNA, 从中筛选出一种 C6-聚乙二醇 (C6-PEG10) 5'端修饰的方

式有最高的插入效率,并且在多种细胞的多个基因位点证实了这种修饰的有效性,在 HEK293T 细胞中的 *Lamin A/C* 位点使用该策略能够实现高达 65% 的插入效率,是目前报道的最高的基因插入效率。

2.3 单碱基编辑

单碱基编辑器 (Base editor, BE) 主要分为两大类: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)。CBE 这一概念最早于 2016 年由 David R. Liu 团队提出^[57]。其工作原理为将胞苷脱氨酶与失去活性的 Cas9 蛋白 (Nuclease dead-Cas9, dCas9) 融合,在 sgRNA 的引导作用下,在指定的胞嘧啶 (C) 位点脱氨基, C 脱去氨基后成为尿嘧啶 (U) 并暂时改变碱基互补配对的特点,在接下来的 DNA 复制中与胸腺嘧啶 (T) 配对,从而将 C 转变为 T。对于 ABE 的作用原理,与 CBE 类似,首先,腺嘌呤 (A) 脱氨基后变为肌苷,在后续的 DNA 复制中,肌苷与鸟嘌呤 (G) 配对,从而实现从 A 到 G 的转变。所以理论上来说,将腺苷脱氨酶与 dCas9 融合就可以产生 ABE。但实验结果表明经此操作后并没有产生 A 到 G 的转变^[58]。针对此问题,2017 年,David R. Liu 团队对蛋白质进行了广泛的定向进化,以开发可作用于 DNA 底物的腺苷脱氨酶,发现大肠杆菌野生型腺嘌呤脱氨酶可以结合 DNA 并使 DNA 上的腺嘌呤脱氨,所以使用 ecTadA 作为脱氨酶开发了第一代 ABE^[59]。

第一代 BE 虽然已实现碱基编辑,但也存在活性编辑窗口小、限制特定的 PAM 序列、存在脱靶现象等,针对不同问题已经涌现出了许多优化的方法。例如:Cheng 等通过筛选新的脱氨酶,扩大 CBE 的活性编辑窗口,降低脱靶效应^[60]; Kim 等通过使用 Cas9 变体产生的 CBE,可不严格要求将 NGG 序列作为 PAM 序列,对于某些位置的 NGAN、NGCG、NNRRT 序列,也可作为 PAM 序列使用,从而靶向基因组位点^[61]; Doman

等通过使用 CBE 的变体 YE1,在保证底物编辑范围的情况下降低了脱靶效应^[62]。

2.3.1 疾病模型建立

大多数动物模型都是通过敲除特定基因构建的,这无法完全模拟出由点突变造成的性状改变。所以基于单碱基编辑的点突变在构建模式生物、修饰突变基因方面有较大潜力。

RAG1、*RAG2* 和 *IL2RG* 是一组与 B 细胞、T 细胞成熟相关的基因。研究人员通过对 *RAG1*、*RAG2* 和 *IL2RG* 位点进行单碱基编辑^[63],产生了终止密码子,提前结束基因的表达。然后将这些胚胎种植给代孕猪。测序证明携带纯合或杂合突变的仔猪都会因肺部感染等原因死亡。对死去的仔猪进行尸检发现它们的脾和胸腺严重发育不足,导致了免疫缺陷,与预计表型相同。证明通过单碱基编辑成功构建出了免疫缺陷的猪,这也是第一次将单碱基编辑技术用于大型动物。

Dmd 和 *Tyr* 分别是编码肌钙蛋白和酪氨酸酶的两种基因。Kim 等将编码 BE3 的 mRNA 和 sgRNA 一同注射到小鼠受精卵中^[64],在 *Dmd* 和 *Tyr* 两个位点进行点突变,然后移植到代孕鼠中,得到 *Dmd* 和 *Tyr* 突变的小鼠后代。九只进行 *Dmd* 突变实验的小鼠中有一只出现了由 C-T 转换引起的终止密码子,该小鼠不表达肌钙蛋白。七只进行 *Tyr* 突变实验的小鼠中有两只出现了由 C-T 转换引起的终止密码子,这两只小鼠的眼睛出现白化表型。以上性状都与预期一致,表明成功构建了点突变模型小鼠。

Liu 等通过单碱基编辑的方式处理兔子胚胎,然后移植给代孕母亲,结果在 8 只兔子中有 4 只 (50%) 产生了所需的错义突变,成功构建了模仿人类错义突变的兔子模型^[65]。

2.3.2 基因治疗

TERT 启动子区-124C-T 的突变经常出现在肿瘤细胞中。Li 等将基因编码序列较短的 CjCas9 切口酶与腺苷脱氨酶融合得到 CjABE,便于用包

覆能力有限的 AAV 递送^[66]。对注射了人神经胶质瘤 (U87) 和多形性胶质母细胞瘤 (Glioblastoma multiforme, GBM) 而形成的荷瘤小鼠进行 CjABE 的注射。结果在肿瘤中导致了相似的-124T-C 的转化效率 (85.2%–90.4%), 减少了 TERT 的转录和蛋白表达, 抑制了胶质瘤生长, 与对照相比经过处理的小鼠可延长生存期约 20 d。

着色性干皮病 C 组蛋白 (Xeroderma pigmentosum group C, XPC) 是一种 DNA 修复酶, 参与 DNA 损伤的识别和修复。缺乏 XPC 的细胞在暴露于化学或物理刺激 (包括紫外线照射) 时会积累 DNA 损伤, 进而使某些疾病发生, 着色性干皮病就是其中一种。Lee 等通过使用 ABE 对来自着色性干皮病患者的成纤维细胞进行编辑, 恢复了关键蛋白 XPC 的表达并至少维持了 4 周, 在紫外线照射下细胞恢复了对 DNA 损伤的抵抗, 证明通过 ABE 校正突变的 XPC 基因可有效恢复细胞 XPC 蛋白的表达, 因此通过 ABE 校正突变基因可以作为治疗着色性干皮病的方法^[67]。

苯丙氨酸羟化酶 (Phenylalanine hydroxylase, PAH) 缺乏症可导致人体对饮食摄入的必需氨基酸之一苯丙氨酸不耐受, 从而产生苯丙酮尿症等疾病。Villiger 等对苯丙酮尿症小鼠模型进行尾静脉注射 BE, 从而靶向校正纯合的 Pah^{enu2} c.835T-C 突变。14 周后, 小鼠肝脏中 Pah -mRNA 的校正率最高达 63%, 全肝裂解物中 PAH 酶的活性恢复至野生酶活性的 1.7%–22.8%, 小鼠体内苯丙氨酸水平降至正常水平, 不再出现苯丙酮尿症的症状^[68]。

β 地中海贫血是由 HBB (-28 A-G) 基因突变引起的疾病。Liang 等用 CBE 对胚胎进行注射并对 HBB 位点进行 PCR 扩增。结果表明 HBB 基因成功扩增到 22 个胚胎中, 其中, 10 个胚胎 (45.4%) 的-28G 转化为 A 或 C, 1 个胚胎 (4.54%) 的-28G 转化为 C, 其余 9 个胚胎 (40.9%) 的-28G 转化为 A。表明单碱基编辑对人类胚胎中的突变可以实现特异性很高的修复^[69]。

Ryu 等通过 AAV 将 ABE 转入肌营养不良小鼠模型的肌细胞中, 纠正了 DMD 基因的无义突变。在 17% 的肌纤维中恢复了肌营养不良蛋白的表达, 远超过改善肌肉功能所需的 4%, 显示了单碱基编辑器在疾病治疗上的潜力^[70]。

在研究者的努力下, 单碱基编辑的研究进展迅速, 极具临床应用潜力。考虑到单碱基编辑的独特机制, 以及现有 CBE 和 ABE 在多种细胞和疾病模型中的优良特性, 这种单碱基编辑工具对基因编辑领域的发展有重要意义。

2.4 双碱基编辑

单碱基编辑器在同一个位点只能实现腺嘌呤或胞嘧啶某一个碱基的转化。近年来, 有研究团队陆续开发出了双碱基编辑器, 可以在同一个位点实现腺嘌呤或胞嘧啶双碱基的转化, 提高了碱基编辑能力。

Joung 团队设计了带有腺苷和胞苷脱氨酶的蛋白, 构建为双碱基编辑器“SPACE”^[71]。“SPACE”可以有效地引入 A-G 和 C-T 的编辑, 并且可以产生额外的 60 个密码子的变化 (导致 18 个氨基酸的取代)。这是常规的单碱基编辑器 ABE 或 CBE 做不到的。在另一项研究中, 研究人员通过将胞苷和腺苷脱氨酶与 Cas9 切口酶 (Cas9 nickase, Cas9n) 融合, 创建了一个新的碱基编辑器 A & C-BE^[72], 其编辑窗口从 C3-C10 位扩展到了 C2-C17 位。因此, 双碱基编辑器的出现成功地拓宽了 CRISPR 碱基编辑器的应用范围。

2.5 基因转录调控

基于 CRISPR/Cas9 技术进行基因调控的原理在于将调控因子与 dCas9 融合, dCas9 虽不能切割 DNA 双链但仍可与 DNA 双链结合, 在 sgRNA 的定位下, 可以调控指定位点基因的表达。通过将不同功能的调控因子与 dCas9 结合可以实现对基因的激活、抑制或甲基化等调控。

2.5.1 疾病模型建立

基因的特异性失活是神经生物学领域的重要

研究方法,虽然基于 Cas9 的基因敲除技术已相对成熟,但神经元不可分裂,无法通过建立细胞系来研究基因的功能。Zheng 等选择 *Syt1* 和 3 个 SNARE 基因 *Vamp2*、*Stx1a* 和 *Snap25*,将 dCas9 与转录抑制因子 KRAB 融合表达,构建为 dCas9-KRAB,在培养的海马神经元中抑制基因表达^[73]。与 RNAi 抑制基因表达在 50%左右的水平相比,dCas9-KRAB 在所选的 4 个基因处都起到了更强的抑制作用。与对照相比,实验组的 mRNA 和蛋白质的表达水平都有所降低,效率接近 90%。后续又将该抑制系统注射到成年小鼠海马齿状回神经中,结果表明 4 个基因的 mRNA 和蛋白表达均被抑制 90%以上,证明了 dCas9-KRAB 在大脑中同样可以实现抑制基因表达的效果。该研究成功构建了特异性降低脑内基因表达的小鼠模型,证明了 dCas9-KRAB 在神经生物学领域具有广泛的应用空间。

2.5.2 基因治疗

Lama2 突变会使得编码的层黏连蛋白 $\alpha 2$ 不能正常表达,而这种蛋白对于肌肉发育必不可少,缺失该蛋白可能导致先天性肌营养不良这种疾病。有研究证实了 *Lama1* 基因编码的 laminin- $\alpha 1$ 蛋白也可以促进肌肉组织的形成,*Lama2* 的缺陷可以通过 *Lama1* 基因的过表达来弥补。研究人员将 SadCas9 与转录激活因子 VP64 融合表达,构建为 SadCas9-2XVP64^[74]。用 AAV 递送进入 3 周龄的肌肉功能障碍的小鼠颞静脉。结果表明经过治疗的小鼠 *Lama1* 基因的表达量明显上调,肌肉组织病理学显著改善,纤维化区域约减少 50%,小鼠后肢麻痹程度减轻,运动功能有所恢复。该研究表明 CRISPR-dCas9 介导的 *Lama1* 表达上调可有效缓解肌营养不良小鼠的症状,因此这种基因调控的方法可以作为肌营养不良的一种治疗策略。

SIM1 和 *Mc4r* 是对人体的食欲调节起至关重要作用的基因,任意一个基因发生突变,另一基因产生的蛋白量不足以支撑相应生命活动(单倍

体剂量不足),这一类人群会因为抑制不住食欲引起肥胖。在一项研究中,研究人员将靶向 *Mc4r* 启动子的 dCas9-VP64 注射进入 4 周龄 *Mc4r*^{+/-} 小鼠的下丘脑室旁核(Paraventricular nucleus of hypothalamus, PVN)^[75],使得小鼠 *Mc4r* 的表达增加 2.7 倍,与对照相比,小鼠体重明显下降。该研究表明 CRISPR-dCas9 介导的 *Mc4r* 表达上调可有效使得肥胖小鼠体重减轻,因此基因表达调控可作为单基因拷贝数不足造成的疾病的一种治疗方法。

常规的 dCas9-转录调节因子融合的方法产生的融合序列较大,AAV 包裹困难。Liao 等使用了短 sgRNA (14 bp 或 15 bp 而不是 20 bp),这些短的 sgRNA (Dead sgRNA, dgRNA) 阻止了活性 Cas9 产生 DSB,经过改造的 dgRNA 可以募集 MPH 转录激活复合物。将 dgRNA 系统引入表达活性 Cas9 的小鼠中,可以实现与传统的 dCas9-VP64 的系统相近的激活基因表达的效果^[76]。Klotho 基因编码的 Klotho 蛋白可保护肾脏免受损害,并且该基因的表达在衰老和急性肾损伤后降低。Interleukin (IL)-10 是一种抗炎细胞因子,可减轻顺铂治疗后的肾损伤。针对急性肾损伤小鼠模型,研究人员构建了 dgRNA-MPH 激活系统,并对成年小鼠进行尾静脉注射。通过此激活系统靶向上调 Klotho、IL-10 的表达。注射 12 d 后分析肝脏组织,结果表明与对照组相比,实验组中 IL-10 的表达上调 158 倍,klotho 的表达上调 2 553 倍。为评估治疗效果,研究人员在对小鼠注射 dgRNA-MPH 后第 8 天进行顺铂治疗,发现顺铂导致了肾损伤。但在第 12 天时分析发现由于 Klotho、IL-10 表达的上调,小鼠肾功能又得到改善。证明了通过 CRISPR 系统上调功能蛋白的表达,为疾病进行预防性干预提供可能性。

肥胖小鼠 *Fabp4* mRNA 的水平比非肥胖小鼠的高,可作为解决肥胖问题的一个标志物。Chung 等对肥胖模型小鼠腹膜注射 dCas9/sgFabp4 从而

靶向下调脂肪细胞内的 Fabp4^[77]。处理 6 周后小鼠体重降低约 20%，血清中的游离脂肪酸，甘油三酸酯等物质的表达水平降低 50%，对于由肥胖引起的肝部脂肪变性等问题有一定的逆转作用。

X 染色体易裂症 (Fragile X syndrome, FXS) 是一种遗传性智力低下的疾病，由于 *FMR1* 基因 CGG 重复序列过度扩增伴随不正常的甲基化，使 *FMR1* 基因的启动子异常从而无法正常编码 FMRP 蛋白。Liu 等将 dCas9 与甲基化修饰酶 Tet 融合构建了甲基化修饰工具，通过 sgRNA 引导至病理性 *FMR1* 基因处诱导其去甲基化^[78]，打破了 *FMR1* 的沉默。与野生型细胞相比，成功表达 dCas9-Tet 的细胞 *FMR1* mRNA 的表达水平恢复至野生型水平的 90%，FMRP 表达水平恢复至野生型水平的 73%，甲基化水平由开始设置的 100% 降至 4%。将包裹 dCas9-Tet 的慢病毒载体注入神经元前体细胞，然后注入小鼠大脑，发现编辑过的神经元可以表达 FMRP，说明这种去甲基化修饰注入体内后仍可以维持，这为治疗 FXS 提供了有力的工具。

2.5.3 免疫治疗

自身的抗肿瘤免疫反应中最主要的一步就是免疫系统识别肿瘤特异性抗原，但大多数情况下肿瘤会下调或沉默抗原的表达来逃逸免疫系统杀伤。Chen 的研究团队开发了基于 CRISPR 技术的集成内源基因激活疗法 (Multiplexed activation of endogenous genes as an immunotherapy, MAEGI)^[79]。以 TNBC 为例，该研究首先筛选出与 TNBC 相关的所有基因突变并建立了相应的“激活库”，然后靶向激活可产生抗原的突变基因对肿瘤细胞进行“标记”，让免疫系统攻击“标记”的细胞。结果发现与对照相比，经处理的小鼠肿瘤体积明显减小，半数小鼠都可以产生完全应答或近完全应答，80% 以上的小鼠体内肿瘤细胞被完全清除，流式分析肿瘤微环境中的免疫细胞群发现，经 MAEGI 治疗的小鼠肿瘤微环境中免疫细胞的浸润增强，

有利于增强小鼠体内的抗肿瘤免疫反应。该研究表明通过 CRISPR/dCas9 技术上调突变基因的表达成功提高了免疫治疗的效果，因此这种基因调控的方法有望用于临床实验中，使得免疫治疗为患者带来更大的益处。

基于 CRISPR/Cas9 系统的基因转录水平调控，不产生 DSB、安全性更高、在临床前和临床试验中可以产生良好的治疗效果，是一种非常有前景的疾病治疗手段。

3 存在问题及解决方案

虽然针对 CRISPR/Cas9 技术的研究越来越多，但仍存在一些问题限制其在实际环境中的应用。例如：脱靶效应、自身免疫带来的安全问题，PAM 序列的限制等。分析产生问题的原因并找出相应的解决策略可为 CRISPR/Cas9 技术尽早投入广泛应用奠定基础。

3.1 脱靶效应

Cas9 蛋白识别 PAM 序列，待 sgRNA 与靶序列配对后，Cas9 就可以开始切割，但有时在非目标序列也会发生切割，也就是脱靶。

3.1.1 产生原因

(1) 识别错误的 PAM 序列。PAM 序列大概 2–5 bp，对于经常使用的来自 SpCas9，其对应的 PAM 序列通常为 NGG (N 代表任意核苷酸)。但 Cas9 可能与低频率出现的 NAG 识别，因此导致脱靶。但总的来说，与其他导致脱靶的原因相比，CRISPR/Cas9 技术对 PAM 序列的错配容忍度低，相应产生脱靶事件的概率小^[80]。(2) sgRNA 与靶序列错配。sgRNA 本身是一段 20 bp 左右的序列，它与靶序列的互补配对是保证 Cas9 切割特异性最重要的因素，但 sgRNA 具有容错性，在与靶序列存在 1–5 个碱基错配时，切割仍然可以发生。所以 Cas9 也可以切割与靶序列类似的 DNA 序列^[81]。有研究证明 PAM 序列下游 (+4) 到 (+7) 位置是一段“核心”序列，一旦在此区域内出现错

配, 基因编辑的效率也会降低。此外 CRISPR 系统对 PAM 序列远侧的突变比近侧突变耐受性更高^[82]。对于单碱基错配或双碱基错配的情况, 靶序列对 sgRNA 不同位置的错配敏感性不同, 总体来说, sgRNA 5'端错配的敏感性低于 3'端, 但当引入三碱基错配时, Cas9 的切割活性就会消失^[83]。Lin 等发现了另一种脱靶形式^[84]: 若脱靶序列比靶序列多或少一个或多个碱基时, 会通过“DNA 凸起”或“RNA 凸起”使得 DNA 与 sgRNA 仍然可以配对。Cas9 可以切割 sgRNA 的两个末端以及 PAM 序列下游的第 7 个碱基发生“DNA 凸起”时错配的 DNA 序列, 但不能切割临近 PAM 序列的位点发生“DNA 凸起”以及发生大于 5 bp 的“RNA 凸起”时错配的 DNA 序列。

3.1.2 解决方案

(1) sgRNA 的合理设计与修饰。Hsu 等通过对 100 个预测的脱靶位点及设计的 700 个 sgRNA 进行评估^[85], 提出了设计 sgRNA 时应减少 sgRNA 与脱靶序列的匹配度来提高 Cas9 的切割特异性。另外, 常规使用的 sgRNA 长度为 20 bp, 有研究表明将 sgRNA 适当缩短到 17–18 bp 可在保证与靶序列结合的情况下降低脱靶效应 5 000 倍^[86]。在 sgRNA 的 5'端加上“GG”序列也可降低脱靶效应^[87]。此外一些 sgRNA 的设计网站包括预测脱靶效率的功能^[88], 因此可在网站上进行脱靶效率的预估, 找到特异性更高的 sgRNA 后用于后续实验。

对 sgRNA 进行修饰方面, Ryan 等证明在 sgRNA 的位点掺入 2-O-甲基-3-磷酸基乙酸酯或 (2'-O-methyl-3'-phosphonoacetate, MP) 的化学修饰可显著降低对脱靶位点的编辑效率而不影响对正确位点的编辑效率^[89]。在人外周血 CD34⁺ HSPC 中证明修饰的 sgRNA 对 *HBB* 基因的作用, 发现在 sgRNA 的第 5 位和第 11 位掺入 MP 修饰后, 对脱靶位点 OFF1 的编辑效率从 50%降低到 2%。

(2) 使用 Cas9 突变体。Cas9 的 REC3 结构域负责检测 sgRNA 与靶序列结合的准确度, 确定二者准

确配对后, REC3 指示 REC2 向外翻转, 为 HNH 结构域发挥作用提供位点。Doudna 研究团队通过突变 REC3 的某个氨基酸残基后得到了 HypaCas9, 在存在错配的情况下可降低 HNH 被激活的可能, 提高 Cas9 切割 DNA 的特异性^[90]。Choi 等将编码蛋白的 DNA 分为几部分, 构建了 948 个突变体, 其中几种构建的突变体不能兼容常用的 U6 启动子, 而筛选出的 Opti-SpCas9 的活性与野生型 SpCas9 相近, 但脱靶活性显著低于野生型^[91]。Charpentier 团队发现 Cas9 蛋白的结构域中 R63 和 R66 在存在错配的情况下可通过稳定 R 环来降低 Cas9 特异性, Q768 可以降低 Cas9 对原间隔子相邻基序远端错配的敏感性, 基于此理论, 研究人员对结构域进行突变, 得到的变体 R63A/Q768A 在人 MCF-7 细胞中可表现出很高的特异性^[92]。Ran 等将 Cas9 突变为只能切割一条 DNA 链的单切口酶 D10A, 与一条 sgRNA 形成复合物, 所以若想产生 DSB 需要设计两条 sgRNA, 构建两个这样的复合物起作用, 两条 sgRNA 均错配才会脱靶, 所以这种方法在细胞系中可降低脱靶效应 50–1 500 倍又能保证与野生型 Cas9 相同的编辑效果^[93]。利用同样的原理, 将 dCas9 与 *Fok I* 融合得到 fCas9, 由于 *Fok I* 二聚化才能切割 DNA 的特性, fCas9 仍需设计两条 sgRNA 才能产生 DSB, 所以可提高整个体系的特异性, 实验证明 fCas9 在具有高度相似的脱靶位点处的特异性比成对的双切口酶至少高 4 倍^[94-95]。

(3) 通过“开关”调节 Cas9 活性。CRISPR/Cas9 技术可用作许多疾病的基因治疗手段, 但其脱靶效应给基因治疗带来很大的风险。脱靶效应一方面是序列上的错配使得 Cas9 在错误的位点切割, 另一方面由于 Cas9 的活性无法控制, 基因编辑一旦开始就无法中断, 只能等待自然结束, 所以若能有效调节 Cas9 的活性则也可以一定程度上解决脱靶问题。

已经鉴定出了一些可以影响 Cas9 作用活性的蛋白。例如: Bondy-Denomy 等鉴定出 AcrF1、

AcrF2 和 AcrF3, 可通过阻断 CRISPR-Cas 复合物与 DNA 结合、与 Cas9 的亚基结合等不同机制调节 CRISPR/Cas9 的作用^[96]。Harrington 等从已经鉴定出的可抑制 Cas9 活性的蛋白中选择了 ACR II C1 和 ACR II C3 来研究其作用机制^[97], 发现 ACR II C1 可以占据 Cas9 本应与 DNA 结合的位置, 从而使 Cas9 不能与 DNA 结合, 无法进一步切割 DNA; ACR II C3 则通过将两个 Cas9 距离拉近, 改变了 Cas9 的结构, 通过影响其与 DNA 结合从而影响其行使功能。这些大分子抑制剂虽然有效, 但由于其分子较大可能存在递送问题, 且可能被蛋白酶降解引起一些免疫反应。针对这些问题, 研究人员开发了小分子筛选平台, 可快速有效的筛选出能抑制 Cas9 活性的小分子。通过该平台, 研究人员筛选出了小分子 BRD0539^[98], 通过阻断 Cas9 与 DNA 结合从而干扰 DNA 的切割。与大分子抑制剂 (例如 ACR II A4) 相比, BRD0539 的抑制作用有明显的剂量依赖和时间依赖的特征, 并且 BRD0539 在血浆中十分稳定, 因此可作为 CRISPR/Cas9 开关的有利候选。

在另一项研究中, 研究人员从 sgRNA 入手, 选择茶碱这种细胞渗透性好的配体插入 sgRNA 中, 可通过改变 sgRNA 的构象影响 CRISPR/Cas9 系统的作用效果^[99]。在设计 86 条 sgRNA 中有 10 条有良好的茶碱响应, 其中 9 条为配体激活型 (ligRNA+), 1 条为配体抑制型 (ligRNA-)。在细胞内进行的茶碱剂量依赖的实验表明在一定浓度范围内 ligRNA 的作用效果与茶碱浓度呈现良好的线性关系, 证明了作为“开关”的 ligRNA 可以以精确的剂量来控制 Cas9 对 DNA 的切割。Liu 等构建了程序化的 sgRNA^[100], 在无外界信号的情况下, sgRNA 的引导区与设计的茎环自身互补而不与 DNA 互补, 不能产生相应的作用。当有外界信号与 sgRNA 内相应的适体识别后, 导致 sgRNA 的构象变化, 使得引导区与靶 DNA 结合, 在 dCas9 或 dCas9-VP64 存在的情况下对某些基因

实现激活或抑制。NF- κ B 和 β -catenin 是在肿瘤细胞中高表达而在正常细胞中未高表达的蛋白, Bcl2/Bax 的比例与细胞凋亡显著相关。由此出发, 研究人员构建了一个“与”门的回路, 用响应 NF- κ B 的 sgRNA 配合 dCas9 抑制 Bcl2 的表达, 用响应 β -catenin 的 sgRNA 配合 dCas9-VP64 激活 Bax 表达, 因此, 相较于正常细胞, 肿瘤细胞中 Bcl2/Bax 的比率被显著改变。这种设计的回路可更有效地诱导肿瘤细胞凋亡, 接受了这种治疗的荷瘤小鼠与对照相比, 肿瘤的大小和重量都明显降低。

3.2 PAM 序列的限制

PAM 序列是 CRISPR 系统起作用的决定因素之一, 但也为 CRISPR 的广泛应用带来限制, 对于距离 PAM 序列较远的靶序列很难实现基因编辑。SpCas9 识别的 PAM 为 NGG, 为了扩展 Cas9 对不同 PAM 的兼容性, 科学家们先后进行了很多尝试与开发: 开发可识别 NGA 的 SpCas9-VRQR 变体以及可识别 NGCG 的 SpCas9-VRER 变体^[101]。开发可识别 NG 的 SpCas9-NG 变体^[102]。通过连续进化的方法得到可识别包括 NGG、NG、GAA 和 GAT 在内的多种 PAM 序列的 xCas9 变体^[103]。开发可识别 NRNH 的变体, 其中 R 为 A/G, H 为 A、C 或 T^[104]。开发变体 SpG 和 SpRY, SpG 可以识别 NGN, 对 SpG 优化得到了 SpRY 变体, 几乎摆脱了 Cas9 对于 PAM 序列的识别限制, 可识别 NNN (NRN 或 NYN) 的 PAM 序列 (R 为 A/G, Y 为 C/T, NRN>NYN)^[105]。

3.3 递送方式的影响

CRISPR 系统的递送方式分为物理递送、病毒递送、非病毒递送, 其中物理递送使用的方法为电穿孔, 难以在体内应用, 而其他不同的递送方式也将对 CRISPR 发挥出的效力产生影响。

逆转录病毒是整合型载体, 会将外源 DNA 整合到宿主染色体中, 但这种整合是随机整合, 因此会给宿主带来插入突变等潜在风险。慢病毒

也是一种整合型载体,最多可容纳 8.5 kb 的外源 DNA 片段,因此可容纳大多数 sgRNA/Cas9 表达元件,但可能造成细胞毒性。AAV 是最常使用的病毒递送载体,免疫原性低,最多可容纳 4.7 kb 的外源 DNA 片段,外源 DNA 不整合到宿主基因组内。但最常使用的 SpCas9 自身大小在 4.2 kb 左右,连同 sgRNA、模板 DNA 在内,整体大小会超过 AAV 的负载能力。因此通常会将 Cas9 和 sgRNA 分为两个载体进行递送或选择使用更小的 SaCas9 等。但 AAV 在体内可长期存在,使得外源基因持续表达,长期可能带来副作用。对于非病毒递送载体,例如可以利用脂质体或利用聚合物来包裹 CRISPR 的组分进行递送。但该方法存在靶向性差、对溶酶体的逃逸率低、包裹后产生的颗粒粒径大等问题。

纳米材料尺寸小,还可以通过表面修饰来提高靶向性,基于纳米材料的递送载体是目前研究的热点。Wang 等合成了基于金纳米颗粒-脂质体体系的光控释放纳米递送系统^[106]:金纳米颗粒表面修饰一层 TAT 而带正电,与靶向 *Plk-1* 的 Cas9-sgRNA 的带负电的质粒结合,在最外层包裹一层脂质体结构,从而得到具有核壳结构的纳米颗粒。由激光产生的金纳米颗粒的热效应可以使整个核壳结构进入细胞,释放 Cas9-sgRNA 的质粒,在 TAT 的引导下进入细胞核,实现对指定基因的切割。

将 sgRNA 与 Cas9 蛋白的 RNP 直接递送起效快,并且不会长期表达,具有细胞毒性小、插入突变风险低等特点,所以直接递送 RNP 也是一种理想的策略。Chen 等设计了一种直径在 25 nm 的表面涂有一层谷胱甘肽 (Glutathione, GSH) 的纳米胶囊^[107],可以包裹设计好的 RNP 进入细胞,在细胞质基质等富含 GSH 的位置释放 RNP。由于核定位信号的作用使得 RNP 可以进入细胞核,对细胞内的基因进行编辑,细胞毒性验证实验表明这种纳米胶囊在 293 细胞内仅造成 <6% 的细胞死亡,有较低的细胞毒性。

3.4 其他

安全性方面,除了脱靶带来的安全问题,还有很多其他方面的报道:*p53* 是抑癌基因,Haapaniemi 等提出 CRISPR/Cas9 会激活 *p53* 的表达,使细胞启动一种应激的保护机制,出现细胞周期停滞等现象来保护自身免受 DNA 损伤的影响^[108]。另一项研究还发现在 78% 的捐献者血清中检测到抗 SaCas9 的 T 细胞,67% 的捐献者产生抗 SpCas9 的 T 细胞^[109],说明人体本身可能对 Cas9 蛋白存在免疫,这也成为基因编辑的一大安全隐患。

另外,基因编辑技术是一种能够直接干预人类遗传基因的强大工具,其不仅蕴含了巨大的健康、进化和遗传风险,还可能导致一系列的社会伦理风险。贺建奎“基因编辑婴儿事件”突显出我国相关法律或治理架构的不足。因此,制定相关法律法规和医学伦理规范,对基因编辑技术进行合理引导和严格监管,是基因编辑技术从基础走向临床的必要环节。

4 总结与展望

自 2013 年以来,作为一种新型基因组编辑技术,CRISPR/Cas9 经历了迅速的发展,它可应用于基因敲除、插入、碱基编辑等操作,具有效率高、适用范围广的优势,可应用于基因功能鉴定和筛选、疾病模型建立和治疗等诸多领域。例如:在基因功能筛选方面,鉴定出 PDXK 是对白血病进展至关重要的酶;在疾病模型的建立方面,成功构建了肝癌、SCLC 动物模型并进行了基因功能的研究;在疾病治疗方面,通过敲除 *SOD1* 基因延缓了 ALS 小鼠的疾病进展。可见,上述研究进展加深了人们对疾病发生发展机理的理解,为探索新的治疗策略奠定了理论基础。

但 CRISPR/Cas9 基因编辑工具仍存在一些问題,最主要的就是脱靶效应、安全性和医学伦理等问题。脱靶效应指的是,在 CRISPR/Cas9 工作过程中,因为识别错误的 PAM 序列或者 sgRNA 与 DNA 的错配等原因,导致的非靶向性识别和

切割。对此问题,研究人员可通过合理设计 sgRNA、使用 Cas9 变体或者给 CRISPR/Cas9 系统加“开关”等方法,提高基因编辑的特异性,降低脱靶效应。

除了脱靶问题,能否将基因编辑工具安全地、准确地靶向递送到指定部位也是影响安全性的一大难题。对此,使用非病毒递送载体是一种更有利的选择。以纳米材料为例,其尺寸小,对其进行表面修饰还可以实现特异性更高的递送,提高递送的靶向性,这对于在体内进行基因编辑来说更利于提高安全性。另外,使用 CRISPR/Cas9 进行的研究多局限于临床前研究,进入临床的实验较少,所以在改进 CRISPR/Cas9 系统的同时还要在动物研究中进行更严格的测试,确保其在临床实验中的安全性和可行性后再进入临床应用。

基因编辑附带产生的医学伦理问题也非常值得关注。最新研究结果显示,使用 CRISPR/Cas9 在胚胎中进行基因编辑仍有未预期的结果发生。例如,在利用 CRISPR/Cas9 敲除胚胎中的 *POU5F1* 基因的实验中却发现 22% 的胚胎都在 *POU5F1* 基因座附近出现了未预料的数千个碱基的缺失^[110];在另一项利用 CRISPR/Cas9 校正胚胎中携带的 *EYS* 突变的实验中,发现有 50% 的胚胎因 DSB 未被修复而导致了 *EYS* 所在染色体的丢失^[111]。上述研究均表明 CRISPR/Cas9 在进行基因编辑的过程中可能导致胚胎内大片的基因缺失、染色体缺失的现象。不同于体细胞水平的基因编辑,胚胎内的基因组或染色体组水平的不稳定将有机会传递给后代,造成不可逆的群体影响。另外,国际上,人类胚胎干细胞研究的伦理准则是:开展人类胚胎体外研究的过程中,在体外培养人类胚胎的时间不得超过 14 d (自受精之日起),研究后需销毁,不得出生。所以,以生殖为目的进行生殖细胞的基因编辑操作是严重违背科学道德的,“基因编辑婴儿”的出生严重违背了相关国际(伦理)准则。对此,我国在 2019 年 7 月

通过了《国家科技伦理委员会组建方案》^[112],成立国家科技伦理委员会,标志着我国已着手建立经得起伦理考验的法律制度体系,防范科学伦理道德不端的事件发生。

综上,CRISPR/Cas9 是一种极具发展潜力的新型基因编辑工具,随着基础研究和临床应用的不断革新,CRISPR/Cas9 将会在更广泛的领域为疾病治疗带来新希望。

REFERENCES

- [1] Makarova KS, Wolf YI, Iranzo J, et al. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nat Rev Microbiol*, 2020, 18(2): 67-83.
- [2] Meeske AJ, Nakandakari-Higa S, Marraffini LA. Cas13-induced cellular dormancy prevents the rise of CRISPR-resistant bacteriophage. *Nature*, 2019, 570(7760): 241-245.
- [3] Shmakov S, Abudayyeh OO, Makarova KS, et al. Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-Cas systems. *Mol Cell*, 2015, 60(3): 385-397.
- [4] Choulika A, Perrin A, Dujon B, et al. Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-Sce I system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 1995, 15(4): 1968-1973.
- [5] Smith J, Grizot S, Arnould S, et al. A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(2): e149.
- [6] Sijbrands EJG. Inhibition of PCSK9 in familial hypercholesterolaemia. *Lancet*, 2012, 380(9836): 6-7.
- [7] Wang LL, Smith J, Breton C, et al. Meganuclease targeting of PCSK9 in macaque liver leads to stable reduction in serum cholesterol. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(8): 717-725.
- [8] Wah DA, Bitinaite J, Schildkraut I, et al. Structure of *Fok I* has implications for DNA cleavage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(18): 10564-10569.
- [9] Händel EM, Alwin S, Cathomen T. Expanding or

- restricting the target site repertoire of zinc-finger nucleases: the inter-domain linker as a major determinant of target site selectivity. *Mol Ther*, 2009, 17(1): 104-111.
- [10] Lombardo A, Genovese P, Beausejour CM, et al. Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(11): 1298-1306.
- [11] Gammage PA, Viscomi C, Simard ML, et al. Genome editing in mitochondria corrects a pathogenic mtDNA mutation *in vivo*. *Nat Med*, 2018, 24(11): 1691-1695.
- [12] Zeitler B, Froelich S, Marlen K, et al. Allele-selective transcriptional repression of mutant *HTT* for the treatment of Huntington's disease. *Nat Med*, 2019, 25(7): 1131-1142.
- [13] Zhang MJ, Wang F, Li SF, et al. TALE: a tale of genome editing. *Prog Biophys Mol Biol*, 2014, 114(1): 25-32.
- [14] Hockemeyer D, Wang HY, Kiani S, et al. Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(8): 731-734.
- [15] Bacman SR, Kauppila JHK, Pereira CV, et al. MitoTALEN reduces mutant mtDNA load and restores tRNA^{Ala} levels in a mouse model of heteroplasmic mtDNA mutation. *Nat Med*, 2018, 24(11): 1696-1700.
- [16] Mussolino C, Morbitzer R, Lütge F, et al. A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(21): 9283-9293.
- [17] Kim Y, Kweon J, Kim A, et al. A library of TAL effector nucleases spanning the human genome. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 251-258.
- [18] Cermak T, Doyle EL, Christian M, et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(12): e82.
- [19] Reyon D, Tsai SQ, Khayter C, et al. FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(5): 460-465.
- [20] Kim JS. Genome editing comes of age. *Nat Protoc*, 2016, 11(9): 1573-1578.
- [21] Cho SW, Kim S, Kim JM, et al. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 230-232.
- [22] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823.
- [23] Mali P, Yang LH, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339(6121): 823-826.
- [24] Hwang WY, Fu YF, Reyon D, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 227-229.
- [25] Jiang CY, Lin XH, Zhao ZG. Applications of CRISPR/Cas9 technology in the treatment of lung cancer. *Trends Mol Med*, 2019, 25(11): 1039-1049.
- [26] Chen CC, Li B, Millman SE, et al. Vitamin B6 addiction in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*, 2020, 37(1): 71-84.e7.
- [27] Picco G, Chen ED, Alonso LG, et al. Functional linkage of gene fusions to cancer cell fitness assessed by pharmacological and CRISPR-Cas9 screening. *Nat Commun*, 2019, 10: 2198.
- [28] Peng CM, Zhu Y, Zhang WJ, et al. Regulation of the hippo-YAP pathway by glucose sensor O-GlcNAcylation. *Mol Cell*, 2017, 68(3): 591-604.e5.
- [29] Xu SW, Zhan M, Jiang C, et al. Genome-wide CRISPR screen identifies ELP5 as a determinant of gemcitabine sensitivity in gallbladder cancer. *Nat Commun*, 2019, 10: 5492.
- [30] Chen SD, Sanjana NE, Zheng KJ, et al. Genome-wide CRISPR screen in a mouse model of tumor growth and metastasis. *Cell*, 2015, 160(6): 1246-1260.
- [31] Ng SR, Rideout III WM, Akama-Garren EH, et al. CRISPR-mediated modeling and functional validation of candidate tumor suppressor genes in small cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(1): 513-521.
- [32] Xue W, Chen SD, Yin H, et al. CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. *Nature*, 2014, 514(7522): 380-384.
- [33] Zhou XQ, Xin JG, Fan NN, et al. Generation of CRISPR/Cas9-mediated gene-targeted pigs via somatic cell nuclear transfer. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 323(6): 1175-1184.

- [34] Mizuno S, Dinh TT, Kato K, et al. Simple generation of albino C57BL/6J mice with G291T mutation in the tyrosinase gene by the CRISPR/Cas9 system. *Mamm Genome*, 2014, 25(7/8): 327-334.
- [35] Allemani C, Matsuda T, Di Carlo V, et al. Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *Lancet*, 2018, 391(10125): 1023-1075.
- [36] Le Fur N, Kelsall SR, Mintz B. Base substitution at different alternative splice donor sites of the tyrosinase gene in murine albinism. *Genomics*, 1996, 37(2): 245-248.
- [37] Guo P, Yang J, Huang J, et al. Therapeutic genome editing of triple-negative breast tumors using a noncationic and deformable nanolipogel. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(37): 18295-18303.
- [38] Gaj T, Ojala DS, Ekman FK, et al. *In vivo* genome editing improves motor function and extends survival in a mouse model of ALS. *Sci Adv*, 2017, 3(12): eaar3952.
- [39] Humbert O, Radtke S, Samuelson C, et al. Therapeutically relevant engraftment of a CRISPR-Cas9-edited HSC-enriched population with HbF reactivation in nonhuman primates. *Sci Transl Med*, 2019, 11(503): eaaw7368.
- [40] Kim K, Park SW, Kim JH, et al. Genome surgery using Cas9 ribonucleoproteins for the treatment of age-related macular degeneration. *Genome Res*, 2017, 27(3): 419-426.
- [41] Alapati D, Zacharias WJ, Hartman HA, et al. In utero gene editing for monogenic lung disease. *Sci Transl Med*, 2019, 11(488): eaav8375.
- [42] György B, Nist-Lund C, Pan BF, et al. Allele-specific gene editing prevents deafness in a model of dominant progressive hearing loss. *Nat Med*, 2019, 25(7): 1123-1130.
- [43] Xu L, Wang J, Liu YL, et al. CRISPR-edited stem cells in a patient with HIV and acute lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 2019, 381(13): 1240-1247.
- [44] Patel SJ, Sanjana NE, Kishton RJ, et al. Identification of essential genes for cancer immunotherapy. *Nature*, 2017, 548(7669): 537-542.
- [45] Lim WA, June CH. The principles of engineering immune cells to treat cancer. *Cell*, 2017, 168(4): 724-740.
- [46] Wei J, Long LY, Zheng WT, et al. Targeting REGNASE-1 programs long-lived effector T cells for cancer therapy. *Nature*, 2019, 576(7787): 471-476.
- [47] He XY, Ren XH, Peng Y, et al. Aptamer/peptide-functionalized genome-editing system for effective immune restoration through reversal of PD-L1-mediated cancer immunosuppression. *Adv Mater*, 2020, 32(17): 2000208.
- [48] Crowther MD, Dolton G, Legut M, et al. Genome-wide CRISPR-Cas9 screening reveals ubiquitous T cell cancer targeting via the monomorphic MHC class I-related protein MR1. *Nat Immunol*, 2020, 21: 178-185.
- [49] Ren JT, Liu XJ, Fang CY, et al. Multiplex genome editing to generate universal CAR T cells resistant to PD1 inhibition. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(9): 2255-2266.
- [50] Eyquem J, Mansilla-Soto J, Giavridis T, et al. Targeting a CAR to the *TRAC* locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature*, 2017, 543(7643): 113-117.
- [51] Stadtmauer EA, Fraietta JA, Davis MM, et al. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science*, 2020, 367(6481): eaba7365.
- [52] Mou HW, Ozata DM, Smith JL, et al. CRISPR-SONIC: targeted somatic oncogene knock-in enables rapid *in vivo* cancer modeling. *Genome Med*, 2019, 11: 21.
- [53] Leonetti MD, Sekine S, Kamiyama D, et al. A scalable strategy for high-throughput GFP tagging of endogenous human proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(25): E3501-E3508.
- [54] Chen ZH, Yu YP, Zuo ZH, et al. Targeting genomic rearrangements in tumor cells through Cas9-mediated insertion of a suicide gene. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(6): 543-550.
- [55] Ling XY, Xie BT, Gao XQ, et al. Improving the efficiency of precise genome editing with site-specific Cas9-oligonucleotide conjugates. *Sci Adv*, 2020, 6(15): eaaz0051.

- [56] Yu Y, Guo YJ, Tian QQ, et al. An efficient gene knock-in strategy using 5'-modified double-stranded DNA donors with short homology arms. *Nat Chem Biol*, 2020, 16(4): 387-390.
- [57] 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.
- [58] Grunebaum E, Cohen A, Roifman CM. Recent advances in understanding and managing adenosine deaminase and purine nucleoside phosphorylase deficiencies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2013, 13(6): 630-638.
- [59] 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.
- [60] Cheng TL, Li S, Yuan B, et al. Expanding C-T base editing toolkit with diversified cytidine deaminases. *Nat Commun*, 2019, 10: 3612.
- [61] Kim YB, Komor AC, Levy JM, et al. Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(4): 371-376.
- [62] Doman JL, Raguram A, Newby GA, et al. Evaluation and minimization of Cas9-independent off-target DNA editing by cytosine base editors. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(5): 620-628.
- [63] Xie JK, Ge WK, Li N, et al. Efficient base editing for multiple genes and loci in pigs using base editors. *Nat Commun*, 2019, 10: 2852.
- [64] Kim K, Ryu SM, Kim ST, et al. Highly efficient RNA-guided base editing in mouse embryos. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(5): 435-437.
- [65] Liu ZQ, Chen M, Chen SY, et al. Highly efficient RNA-guided base editing in rabbit. *Nat Commun*, 2018, 9: 2717.
- [66] Li XJ, Qian X, Wang B, et al. Programmable base editing of mutated *TERT* promoter inhibits brain tumour growth. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(3): 282-288.
- [67] Lee C, Jo DH, Hwang GH, et al. CRISPR-pass: gene rescue of nonsense mutations using adenine base editors. *Mol Ther*, 2019, 27(8): 1364-1371.
- [68] Villiger L, Grisch-Chan HM, Lindsay H, et al. Treatment of a metabolic liver disease by *in vivo* genome base editing in adult mice. *Nat Med*, 2018, 24(10): 1519-1525.
- [69] Liang PP, Ding CH, Sun HW, et al. Correction of β -thalassemia mutant by base editor in human embryos. *Protein Cell*, 2017, 8(11): 811-822.
- [70] Ryu SM, Koo T, Kim K, et al. Adenine base editing in mouse embryos and an adult mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(6): 536-539.
- [71] Grünewald J, Zhou RH, Lareau CA, et al. A dual-deaminase CRISPR base editor enables concurrent adenine and cytosine editing. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(7): 861-864.
- [72] Zhang XH, Zhu BY, Chen L, et al. Dual base editor catalyzes both cytosine and adenine base conversions in human cells. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(7): 856-860.
- [73] Zheng Y, Shen W, Zhang J, et al. CRISPR interference-based specific and efficient gene inactivation in the brain. *Nat Neurosci*, 2018, 21(3): 447-454.
- [74] Kemaladewi DU, Bassi PS, Erwood S, et al. A mutation-independent approach for muscular dystrophy *via* upregulation of a modifier gene. *Nature*, 2019, 572(7767): 125-130.
- [75] Matharu N, Rattanasopha S, Tamura S, et al. CRISPR-mediated activation of a promoter or enhancer rescues obesity caused by haploinsufficiency. *Science*, 2019, 363(6424): eaau0629.
- [76] Liao HK, Hatanaka F, Araoka T, et al. *In vivo* target gene activation *via* CRISPR/Cas9-mediated *trans*-epigenetic modulation. *Cell*, 2017, 171(7): 1495-1507.e15.
- [77] Chung JY, UL Ain Q, Song Y, et al. Targeted delivery of CRISPR interference system against *Fabp4* to white adipocytes ameliorates obesity, inflammation, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Genome Res*, 2019, 29(9): 1442-1452.
- [78] Liu XS, Wu H, Krzisch M, et al. Rescue of fragile X syndrome neurons by DNA methylation editing of the *FMRI* gene. *Cell*, 2018, 172(5): 979-992.e6.
- [79] Wang GC, Chow RD, Bai ZG, et al. Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPRa elicits potent antitumor immunity. *Nat Immunol*, 2019,

- 20(11): 1494-1505.
- [80] Bolukbasi MF, Gupta A, Wolfe SA. Creating and evaluating accurate CRISPR-Cas9 scalpels for genomic surgery. *Nat Methods*, 2016, 13(1): 41-50.
- [81] Doench JG, Fusi N, Sullender M, et al. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(2): 184-191.
- [82] Wang Y, Wang MR, Zheng T, et al. Specificity profiling of CRISPR system reveals greatly enhanced off-target gene editing. *Sci Rep*, 2020, 10: 2269.
- [83] Fu YF, 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.
- [84] Lin YN, Cradick TJ, Brown MT, et al. CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(11): 7473-7485.
- [85] Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 827-832.
- [86] Fu YF, Sander JD, Reyon D, et al. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(3): 279-284.
- [87] Cho SW, Kim S, Kim Y, et al. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res*, 2014, 24(1): 132-141.
- [88] 谢胜松, 张懿, 张利生, 等. CRISPR/Cas9 系统中 sgRNA 设计与脱靶效应评估. *遗传*, 2015, 37(11): 1125-1136.
Xie SS, Zhang Y, Zhang LS, et al. sgRNA design for the CRISPR/Cas9 system and evaluation of its off-target effects. *Hereditas (Beijing)*, 2015, 37(11): 1125-1136 (in Chinese).
- [89] Ryan DE, Taussig D, Steinfield I, et al. Improving CRISPR-Cas specificity with chemical modifications in single-guide RNAs. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(2): 792-803.
- [90] Chen JS, Dagdas YS, Kleinstiver BP, et al. Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy. *Nature*, 2017, 550(7676): 407-410.
- [91] Choi GCG, Zhou P, Yuen CTL, et al. Combinatorial mutagenesis en masse optimizes the genome editing activities of SpCas9. *Nat Methods*, 2019, 16(8): 722-730.
- [92] Bratovič M, Fonfara I, Chylinski K, et al. Bridge helix arginines play a critical role in Cas9 sensitivity to mismatches. *Nat Chem Biol*, 2020, 16(5): 587-595.
- [93] Ran FA, Hsu PD, Lin CY, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 2013, 154(6): 1380-1389.
- [94] Guilinger JP, Thompson DB, Liu DR. Fusion of catalytically inactive Cas9 to Fok I nuclease improves the specificity of genome modification. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(6): 577-582.
- [95] Tsai SQ, Wyvekens N, Khayter C, et al. Dimeric CRISPR RNA-guided Fok I nucleases for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(6): 569-576.
- [96] Bondy-Denomy J, Garcia B, Strum S, et al. Multiple mechanisms for CRISPR-Cas inhibition by anti-CRISPR proteins. *Nature*, 2015, 526(7571): 136-139.
- [97] Harrington LB, Doxzen KW, Ma EB, et al. A broad-spectrum inhibitor of CRISPR-Cas9. *Cell*, 2017, 170(6): 1224-1233.e15.
- [98] Maji B, Gangopadhyay SA, Lee M, et al. A high-throughput platform to identify small-molecule inhibitors of CRISPR-Cas9. *Cell*, 2019, 177(4): 1067-1079.e19.
- [99] Kundert K, Lucas JE, Watters KE, et al. Controlling CRISPR-Cas9 with ligand-activated and ligand-deactivated sgRNAs. *Nat Commun*, 2019, 10: 2127.
- [100] Liu YC, Zhan YH, Chen ZC, et al. Directing cellular information flow via CRISPR signal conductors. *Nat Methods*, 2016, 13(11): 938-944.
- [101] Kleinstiver BP, Prew MS, Tsai SQ, et al. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature*, 2015, 523(7561): 481-485.
- [102] Nishimasu H, Shi X, Ishiguro S, et al. Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space. *Science*, 2018, 361(6408): 1259-1262.
- [103] 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.

- [104] Miller SM, Wang TN, Randolph PB, et al. Continuous evolution of SpCas9 variants compatible with non-G PAMs. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(4): 471-481.
- [105] Walton RT, Christie KA, Whittaker MN, et al. Unconstrained genome targeting with near-PAMless engineered CRISPR-Cas9 variants. *Science*, 2020, 368(6488): 290-296.
- [106] Wang P, Zhang LM, Zheng WF, et al. Thermo-triggered release of CRISPR-Cas9 system by lipid-encapsulated gold nanoparticles for tumor therapy. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2018, 57(6): 1491-1496.
- [107] Chen G, Abdeen AA, Wang YY, et al. A biodegradable nanocapsule delivers a Cas9 ribonucleoprotein complex for *in vivo* genome editing. *Nat Nanotechnol*, 2019, 14(10): 974-980.
- [108] 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.
- [109] 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.
- [110] Alanis-Lobato G, Zohren J, McCarthy A, et al. Frequent loss-of-heterozygosity in CRISPR-Cas9-edited early human embryos[EB/OL]. [2020-08-12]. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.06.05.135913v1.full>.
- [111] Zuccaro MV, Xu J, Mitchell C, et al. Reading frame restoration at the EYS locus, and allele-specific chromosome removal after Cas9 cleavage in human embryos[EB/OL]. [2020-08-12]. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.06.17.149237v1.full>.
- [112] 科技伦理的底线不容突破[EB/OL]. [2021-03-24]. <http://scitech.people.com.cn/n1/2019/0726/c1007-31257810.html>.

(本文责编 陈宏宇)