

综 述

基因编辑技术在疾病治疗中的研究进展*

杨春艳 王 磊 穆登彩 李芳芳 沈 昊 郑尚永**

(云南大学医学院 昆明 650091)

摘要 基因编辑是一项旨在对基因组进行定点修饰的新技术,为基因功能分析提供了更强大的工具。现在研究人员可以很容易地利用锌指核酸酶(zinc-finger nuclease, ZFN)、转录激活类效应核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)、规律成簇的间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)等基因编辑技术来操纵目标基因,这些技术革新了基因功能分析和医学治疗领域。对基因编辑技术的种类、原理进行综述,重点介绍 CRISPR 基因编辑技术在疾病治疗中的研究进展,并对基因编辑技术的未来进行了展望。

关键词 基因编辑 CRISPR ZFN TALEN 疾病治疗

中图分类号 Q354

人类基因组计划于 1990 年启动,2003 年完成,旨在发现所有人类基因的序列并研究其功能,以及研究基因突变对人类疾病的影响。目前许多基因疾病没有治疗方法,医生只能通过药物或放化疗来减轻症状而不能消除疾病,因此需要开展广泛的研究以发现有效的基因治疗方法^[1]。近年来,科学家们一直在寻找更精确的方法对特定基因进行敲除或靶向修饰,以便更准确、更深入地了解疾病的发病机制,探索基因的功能,找到治疗重大疾病和遗传疾病的有效方法。过去使用的许多方法虽然为许多基因的功能鉴定提供了很大的帮助,但已不能满足不断扩大的基因功能研究的需要^[2]。令人鼓舞的是,近十年来出现的基因编辑技术为克服上述困难开辟了新途径,由于 CRISPR/Cas9 优于其他基因编辑技术,科学家可以达到更高的准确度,包括设计简单、靶向效率高以及能够在多个序列中同时进行修改,具有广泛的发展前景和应用价值,吸引了世界各地的研究人员的广泛关注。

自定义设计的核酸酶主要被分为三类,包括 ZFNs、TALENs 和 CRISPR/Cas9^[3]。这些方法都是对基因的

特定序列进行编辑。在过去的几十年里,基因工程领域的许多努力都是为了提高我们对生命过程的理解,从而使设计新的诊断和治疗方法成为可能。从转基因到基因打靶,胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)、诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)和通过核酸酶进行的基因编辑,极大地促进了这些希望的实现,在某些领域,如癌症、遗传病、血液病等,基因治疗的梦想可能即将实现,这无疑将改善人类的生活,并可能实现个性化治疗^[4]。

1 基因编辑技术的分类及原理

1.1 ZFN 技术

锌指核酸酶(ZFN)是第一个普遍使用的基因编辑技术。ZFN 是由一系列锌指结构单元与 Fok I 核酸酶活性区结合而成,具有识别和切割特定 DNA 序列的能力。ZFN 识别不同 DNA 序列的机制在于锌指蛋白元件的类型和基序。锌指结构是蛋白质结构单元,其与 DNA 分子相互作用,由大约 30 个氨基酸组成。四个氨基酸残基(Cys-)或两个半胱氨酸残基(Cys-)和两个组氨酸残基(His-)是保守的氨基酸,它们与锌离子相结合^[5]。Fok I 要具有酶切活性需要形成二聚体。在设计 ZFN 时,Fok I 需要突变,使之不能形成同源二聚体。

收稿日期:2019-04-03 修回日期:2019-05-15

* 国家自然科学基金(81860494)资助项目

**通讯作者,电子邮箱:shangyong@ynu.edu.cn.

当 5~6bp 的 spacers 隔在两个结合不同目标序列突变的 Fok I 中时,就可以形成异源二聚体从而具有酶切功能,此设计的一个优点是增加 ZFN 的特异性识别。FokI 酶与 II 型限制酶的切割不同,这意味着它在识别位点外切割 DNA。ZFNs 作为一种工具,有助于开发新的人类疾病模型和基因治疗策略等。有研究表明,ZFN 通过靶向长末端重复序列(long terminal repeats, LTRs),一种新的、可替代的根除 HIV-1 感染的抗逆转录病毒策略,能够特异和有效地从感染晚期的人 T 细胞中切除 HIV-1 前病毒 DNA^[6]。

1.2 TALEN 技术

革兰氏阴性菌感染植物后,会分泌转录因子,即转录激活因子样效应因子(transcription activation-like effector,TALEs)^[7]。当这种 DNA 结合蛋白的序列以与 ZFNs 相同的方式与 Fok I 亚基结合时,就会产生一类具有高度特异性的基因编辑核酸酶,也就是 TALENs^[8]。与基因组中的特定序列结合的 TALE 具有 33~35 个串联重复序列,每个重复序列都可以识别基因组中的特定 DNA 碱基对。这些串联重复序列是相似的。TALEN 识别模块的氨基酸除了第 12、13 位外其余都是保守的,因此第 12、13 位氨基酸被称为重复可变双残基(repeat variable diresidue,RVD),正是这两种氨基酸决定了 TALEN 结合 DNA 的核苷酸类型。FokI 内切酶亚基与 TALENs 靶序列结合所需区域为 12~20bp,这个区域叫作间隔^[7]。TALEN 利用黄杆菌(*Xanthomonas*)的 TALEs 的 DNA 序列识别模块作为 DNA 序列特异性鉴定的基础^[9]。到目前为止,TALENs 已经被用于对多种生物的基因组序列进行有目的的改变,包括人类、老鼠、蠕虫、斑马鱼、猪和酵母。因此,这一过程被认为是一种适用于建立模型系统以寻找基于基因组工程的治疗策略的技术^[10]。

1.3 CRISPR 技术

1987 年首次在大肠杆菌基因组中发现一种已知的重复碱基序列,称为 CRISPR^[11]。CRISPR 是一种最基本的对基因进行修补的非常精确的方法。CRISPR 系统分为 3 类(I~III),I 类和 III 类在细菌和古生菌中均有发现,含有多个 Cas 蛋白,II 类仅在细菌中存在,只包括一个 Cas 蛋白^[12]。2012 年,研究人员改进了这个系统,发现任何 DNA(不仅是细菌)都有这种能力,这个过程在人类身上也有效。CRISPR 系统由三部分构成:CRISPR 的主体 CRISPR 基因座(CRISPR locus),基因座上游的一段前导序列(leader sequence,LS)以及

CRISPR 功能相关的基因(CRISPR-associated genes,Cas genes)^[13]。CRISPR 阵列包含一组重复序列,它们之间具有间隔序列。Cas 复合物切割的侵入性短片段基因组作为新的间隔序列添加至 CRISPR 阵列。因此,当再次面对之前的噬菌体时,它就会破坏病毒的入侵。CRISPR/Cas9 技术要想成功工作,就意味着 Cas9 要识别必须被切割的区域,且必须在侵入生物体基因组(如噬菌体)的靶向原始间隔序列之后,再被一个称为原间隔邻近基序(protospacer adjacent motif,PAM)的序列处理^[14]。为了简化 II 型系统的使用,通过基因工程设计了一种名为“单导 RNA”(single guide RNA,sgRNA)的双 RNA 结构,该结构由 CRISPR RNA(crRNA)和反式激活 CRISPR RNA(tracrRNA)两部分组成。Cas9 与 tracrRNA 结合,并由 crRNA 引导朝向目标序列^[15]。该方法的靶点特异性是由 RNA 决定的而非蛋白质决定的。因此,这项技术更加简单和便宜。此外,与 ZFN 和 TALEN 相比,CRISPR/Cas9 具有设计简单、效率高和多重突变的优点,是目前最便捷的基因组编辑技术之一(表 1)。

1.4 其他

除了上述基因编辑技术外,2018 年卡内基梅隆大学和耶鲁大学的研究人员发现了 PNA(peptide nucleic acids,PNAs)基因编辑技术,他们利用该技术成功治愈了小鼠遗传疾病,并指出治疗没有脱靶效应^[16]。通过此基因编辑技术的早期干预可以纠正遗传缺陷,有助于器官的发展以及用于功能性疾病的治疗。这项技术以前也用于治疗 β 地中海贫血^[17]。此外还有一些衍生的 CRISPR 技术,如 NmeCas9 系统^[18]、CHAnGE 技术^[19]、EvolvR 系统^[20]、CRISPR-GO 系统^[21]、CRISPR-STIP 技术^[22]等,这些新兴的衍生技术在疾病治疗方面也有着很大的应用前景。当然在 CRISPR 的舞台上,Cas9 不再是唯一的主角,其他的 Cas 蛋白也越来越受到人们的关注(表 2)。

2 CRISPR/Cas9 在疾病治疗中的研究进展

2.1 癌症治疗

由于基因组和表观遗传学的改变使致癌基因激活或抑癌基因失活,从而导致了癌症的发生。近年来,针对癌症的有效治疗方法已经出现,以改善患者的预后。手术、放疗、化疗等方法已被用于缓解癌症的恶化,使患者受益最多可达 5 年。然而,有害的副作用和毒性增加了死亡率,大大降低了生活质量^[23],因此了解肿瘤

表1 ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9 的区别

Table1 The difference between ZFN,TALEN,CRISPR/Cas9

	ZFN	TALEN	CRISPR/Cas9
DNA 结合	锌指蛋白	TALE 蛋白	指导 RNA
DNA 切割	Fok I	Fok I	Cas9
DNA 识别范围	18 ~ 36bp	30 ~ 40bp	22bp
	锌指模块	TALE 模块	DNA-RNA 碱基
识别序列	含有 G 碱基的序列如下: 5'-GNNGNNGNN-3'	从 5'-T 开始, 以 A-3'结尾的序列	紧接着是相邻的原间隔基序 5'-NGG-3'
剪切位点	单次单个	单次单个	可同时剪切多个位点
优点	靶向结合的高效率 靶向传递基因效率高 蛋白质尺寸(<1kb)	高特异性 1bp 的精确识别 相对容易选择目标区域 蛋白质尺寸(>3kb)	自由选择目标区域 指导 RNA 的简单合成 多路复用能力 靶向效率高 蛋白质尺寸(>3kb)
局限	难选序列 上下文依赖性 既昂贵又费时 脱靶效应 有毒副性	不适用于甲基 既昂贵又费时 脱靶低 低毒性 低通量	PAM 序列依赖性 脱靶效应 嵌合体现象 低同源重组率

表2 各种 Cas 蛋白的区别

Table2 Differences of various Cas proteins

Cas 蛋白	CRISPR 系统	指导 RNA	目标识别序列
Cas9	II 型	crRNA + tracrRNA	G-rich PAM
dCas9	II 型	crRNA + tracrRNA	G-rich PAM
Cpf1 (Cas12a)	V 型	crRNA	T-rich PAM
C2c2(Cas13a)	VI-A 型	crRNA + tracrRNA	Except G-rich
Cas3	I 型	crRNA	T-rich PAM
dCas13a	VI-A 型	crRNA + tracrRNA	Except G-rich
Cas13b	VI-B 型	crRNA	PFS ^①
Cas10(Csm1)	III 型	crRNA	AT-rich PAM

①PFS:Protospacer flanking sequence

生物学对开发新的抗癌治疗方法具有重要意义。目前科学家正在使用 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术来促进癌症生物学的发现,通过高通量筛选,CRISPR/Cas9 介导的疾病模型可用于癌基因、药物靶标和肿瘤抗性的临床前验证。张峰和诺贝尔奖得主(Nobel laureate) Phillip Sharp 成功地利用 CRISPR/Cas9 构建了小鼠模型,以模拟癌症突变的有害影响^[24],它们的系统是在肿瘤抑癌基因中引入功能缺失和原癌基因中引入功能获得的能力,从而有助于因果基因突变的筛选。这些应用使得 CRISPR/Cas9 这一技术在致病基因突变中的编辑和表观基因组学的研究中显示出了前所未有的有效

性。同时,其在体内和体外细胞中的应用正在鼓励科学界寻求更有力的基因治疗方法,并在临床设置基因组编辑治疗^[25]。

CRISPR/Cas9 介导的诱导型 degron 标签(Degron KI)的敲入能抑制蛋白质的功能,具有诱导性、特异性和等位基因特异性^[26]。这种方法使我们对癌细胞系中的 EZH2 和 PI3K α 抑制剂有了更好的了解。Degron KI 系统还帮助确定推定的致癌基因 *SF3B1* 热点突变和剪接变体之间的联系^[27]。CRISPR/Cas9 已被用于研究包括 *CD74-ROS1* 易位、*MLA-ALK* 和 *KIF5B-RET* 倒位在内的基因组重排,这些都是肺癌的驱动因素^[28]。

CRISPR/Cas9 介导的基因组工程也被用于产生携带染色体易位的细胞系,这些细胞系提供了关于急性髓系白血病(acute myelocytic leukemia, AML)和尤文氏肉瘤早期病理信息^[29]。使用 CRISPR/Cas9 去除 *C4BPB* 基因可以治疗 AML,因为该基因主要编码 AML 蛋白^[30]。CRISPR 介导的乳腺癌细胞中 *HER2* 基因的编辑揭示了一种新的 *HER2* 靶向机制,它取代了临床药物赫赛汀^[31]。免疫疗法也越来越成为当今癌症治疗的基石^[32]。CRISPR/Cas9 已被用于破坏多个基因座以生成通用 CAR-T 供体细胞。Fas 受体 CD95 与配体结合后可诱导 T 细胞凋亡和 CAR-T 功能。因此,CRISPR/Cas9 产生的 Fas 敲除 CAR-T 细胞在小鼠中显示出改善肿瘤细胞死亡和延长生存的作用^[33]。另一研究显示,基于 CRISPR/Cas9 的体内筛选能鉴定出蛋白酪氨酸磷酸酶非受体 2 型(PTPN2)作为一种新的肿瘤免疫治疗靶点^[34]。

2.2 遗传性疾病的治疗

遗传性疾病的治疗仍然是医学中的挑战之一,大多数基因疾病很少能被治愈,而且只有在致病突变纠正为野生型序列的情况下才能治愈。遗传学的进展揭示了许多遗传疾病背后的分子机制,CRISPR/Cas9 方法已经成为人们广泛理解的阻止甚至治愈遗传疾病的手段^[35]。近年来,CRISPR/Cas9 方法在 DMD 小鼠模型 DMD-MDX 小鼠中被反复报道^[36-37]。将 AAV-Cas9 和 AAV-gRNA cassettes 注入免疫缺陷的幼鼠体内,随着其肌肉的生长和肌源性细胞的增殖,这种基因组编辑使肌营养不良蛋白在全身肌肉组织中重新表达^[38]。也可以将 CRISPR/Cas9 通过腺相关病毒传递直接进入 DMD 小鼠肌肉细胞。一旦分娩,CRISPR/Cas9 切除突变外显子,产生一个切除的肌营养不良蛋白。接受这种治疗的 DMD 小鼠表现出更好的肌肉力量,没有脱靶效应^[39]。同样,人类遗传疾病小鼠模型的研究也正朝着大型动物的方向发展,在犬类 DMD 模型中,通过 CRISPR/Cas9 对 2% ~ 3% 的肌营养不良蛋白进行编辑,取得了比 MDX 小鼠更接近人类疾病的表型成功。除此之外,CRISPR/Cas9 也被报道用于灵长类动物的 DMD^[40]。

在由 *F9* 和 *F8* 编码基因突变引起的血友病 B(因子 IX 缺乏症)和血友病 A(因子 VIII 缺乏症)的 X 连锁疾病中,有研究显示,将裸鼠 Cas9 sgRNA 和供体 DNA 注入体外生殖系细胞以及成年血友病小鼠体内,可以被用来纠正因子 IX 缺陷^[41]。表达 SaCas9 和 sgRNA 的

AAV 载体被传递给成年和新生儿血友病小鼠后,能够恢复足够水平的 IX 因子^[42]。最近的一项研究表明,CRISPR/Cas9 用于纠正血友病 A 患者 iPSCs 的染色体倒位。从这些纠正过的 iPSCs 分化出来的内皮细胞能够表达 *F8* 基因功能,并且能够纠正在其他致死敲除小鼠模型的缺陷^[43]。因此,基因治疗已成为纠正潜在蛋白质缺乏的主要研究领域。此外, α -1 抗胰蛋白酶(简称 α 1-AT)缺乏也能通过基因编辑进行治疗, α 1-AT 是一种涉及肝脏和肺的遗传疾病,*SERPINA1* 基因突变导致肝脏中 α 1-AT 蛋白缺失导致肝损伤,蛋白酶/抗蛋白酶的失衡可导致肺气肿^[44]。最近,CRISPR/Cas9 被用于将 α 1-AT 基因整合到小鼠肝脏 ROSA26 的“安全港”位点,这种“敲入”方法在体内模型中实现了基因表达,指出将基因敲入安全港是纠正长期顽固性疾病的一个有希望的策略^[45]。另一项研究中,CRISPR 被用于将 AAV8CRISPR 系统地传递到 *hSERPINA1* 第 2 外显子上,导致肝细胞聚集体减少,实现了对 Z 突变(Glu342Lys)的适度纠正,证实了基因编辑疗法在同时纠正与 α 1-AT 缺乏相关的肝和肺疾病症状方面的潜力^[46]。总之,CRISPR/Cas9 系统可以作为纠正或减轻遗传疾病的有效工具。

2.3 神经退行性疾病的治疗

最常见的神经退行性疾病主要分为选择性和老年性。常见的神经退行性疾病如 HD、AD、PD、脊髓性肌萎缩症(spinal muscular atrophy, SMA)和肌萎缩侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)^[47]。在美国等发达国家,各种神经退行性疾病的患病率相对来说更高(约 700 万次)^[48]。到目前为止,还没有有效的治疗这些疾病的方法。然而,细胞模型的产生将有助于获得关于这些疾病发病机制的信息,并将有助于药物筛选。最近探索的一种可能的治疗这些疾病的方法是利用干细胞进行细胞替换。在未来的应用中,可以使用基因编辑技术来开发治疗神经退行性疾病的治疗方法,CRISPR/Cas9 已经被用来改变或产生基因突变,并为特定的神经退行性疾病建模^[49]。在高等动物中,很难产生大型动物疾病模型,因此需要细胞模型。此外,缺乏从大型动物身上提取的 ESC 系是基因操作的一个主要障碍^[47],基因编辑技术在神经退行性疾病的最新进展使探索大型动物模型成为可能。CRISPR/Cas9 系统可以用来产生突变,阻碍开放阅读框,使基因失活。因此,利用 CRISPR/Cas9 可以很容易地研究由动物特定基因功能障碍引起的神经退行性疾病。评估不同类

型细胞的镶嵌突变也可用 CRISPR/Cas9。CRISPR/Cas9 可以针对胚胎中的每一个基因,这对于建立神经退行性疾病的动物模型是有利的。这项技术在大型动物模型中也特别有用,如起源于 *PARKIN* 和 *PINK1* 基因突变的 PD^[47]。

在动物模型中,CRISPR/Cas9 可用于靶向沉默候选基因^[47]。这可能使我们能够模拟在 PD 患者中观察到的突变。神经退行性疾病也可以源自突变的细胞毒蛋白,PD 和 HD 分别是由 α -synuclein 和异常扩展的 CAG 序列导致 huntingtin 蛋白突变引起的^[47]。在哺乳动物细胞中使用 CRISPR/Cas9 技术可以有效地生成这些蛋白质,而其他工具,如非同源性末端连接(non-homologous end joining, NHEJ),可以用来增加它们的产量^[50]。CRISPR/Cas9 在人类免疫治疗方面也有很有前景的结果,人类 ALS 通常由 *C9ORF72* 基因引起,该基因编码二肽重复(dipeptide repeat, DPR)蛋白。因此,识别 *C9ORF72* 编码的 DPRs 的抑制子和增强子可以利用基于 CRISPR/Cas9 的人类基因组敲除筛选技术。利用这项技术,许多修饰基因被识别出来,其中一种调节剂 TMX2 改善了 *C9ORF72* ALS 患者的内质网应激,导致神经元显著存活^[51]。

2.4 HIV 的治疗

1981 年报告了第一例人类免疫缺陷病毒(HIV)感染病例。自那时以来,HIV 已影响到全球 3 500 多万人,成为了一个主要的公共卫生问题^[52]。虽然抗逆转录病毒治疗(ART)可以减轻 HIV-1 的症状,但不能实现完全康复。治疗的主要障碍是 HIV 持续存在于宿主体内,这是抗逆转录病毒疗法无法消除的。HIV 的 DNA 被吸收到宿主的基因组中,形成了有组织的病毒库。删除或中和病毒 DNA 可以消除 HIV 的持续存在^[53]。为了消除休眠病毒库,重点研究能够阻断病毒 DNA 并显示最小药物毒性的个性化治疗是很重要的^[54]。CRISPR/Cas9 基因编辑系统可以通过 sgRNA 引导的方法去除 DNA^[55]。这种由 CRISPR/Cas9 去除前病毒 DNA 的技术也有助于在其他疾病中灭活病毒基因。CRISPR/Cas9 通过 sgRNA 实现 HIV 前病毒 DNA 的去除,并且 sgRNA 可以在潜伏感染中靶向病毒 LTR U3 区域中的储存位点。除了使原病毒 DNA 失活和防止感染细胞复制外,CRISPR/Cas9 还可以提供对复发性 HIV 感染的耐药性,并可针对 HIV 基因组内的多个位点^[56]。Cas9 蛋白可以在人的造血干祖细胞(hematopoietic stem and progenitor cells, HSPCs)中持续

存在。然后,HSPCs 可以分化成单核细胞和巨噬细胞,而不会产生副作用。CRISPR/Cas9 也可用于具有 piggy-Bac 转座子供体序列的 iPSCs 中 *CCR5D32* 的自然缺失。

一个 HIV-GFP Jurkat 细胞株(JLat10.6)也被用来测试 CRISPR/Cas9 系统在沉默 HIV-1 DNA 方面的有效性^[57]。该研究结果表明,CRISPR/Cas9 对 JLat10.6 细胞株 HIV-1 原病毒 DNA 具有有效的靶向性和沉默作用。这激发了将 gRNA 与目标病毒 DNA 序列相匹配的想法。近年来,lncRNAs 作为抑制 NEF 基因表达 HIV-1 原病毒的新工具被检测出来。NEF lncRNA 高表达可引起病毒抑制,低表达则相反。5'LTR 区域可能是 CRISPR/Cas9 基因组编辑系统的合适靶点^[54]。一些抗病毒疗法可以用来控制病毒感染。然而,病毒在血液中是无法追踪的,这是一个主要问题。最近的研究表明,CRISPR/Cas9 基因编辑系统可以作为一种新的抗病毒工具,通过靶向病毒编码区域。该系统可用于阻断 HIV-1 感染的同化和进展,消除隐藏的病毒库,并提供对 HIV-1 的持久免疫^[58]。

2.5 心血管疾病治疗

心血管疾病是美国发病率和死亡率的主要原因,占美国死亡人数的 1/3^[59]。尽管采用了多种药物、设备和手术等治疗方法,但随着时间的推移,许多患者病情恶化,出现难治性症状。考虑到这些趋势对医疗、经济和生活质量的影响,需要对心血管疾病采取新的治疗策略,特别是那些旨在减少住院的治疗策略。目前大多数心血管疾病的临床试验采用基于 CRISPR/Cas9 的体外治疗方法。治疗血脂异常(如高胆固醇血症)的疗法也有望利用体内基因组编辑开发^[60]。*PCSK9* 在人体中自然产生的功能缺失突变可导致血液中低密度脂蛋白胆固醇水平的降低,从而为预防冠心病提供保护。因此,如果 *PCSK9* 在肝脏中被成功破坏,它应该能够模拟这些有益突变的效果。在早期的研究中使用动物模型来验证,CRISPR/Cas9 通过注射病毒载体靶向成年小鼠肝脏中的 *Pcsk9*^[61]。

基因组编辑也适用于早期胚胎,特别是合子阶段。胚胎基因组编辑的目标是纠正有害突变,以避免致病性疾病在生活中出现。由于大多数遗传性心血管疾病是由显性突变引起的,单基因纠正就可以预防这种疾病的发生^[62]。因此,遗传性心血管疾病为基于胚胎基因组编辑的基因治疗的可行性提供了一个有吸引力的模型。因此,遗传性心血管疾病为基于胚胎基因组编

辑的基因治疗的可行性提供了一个有吸引力的模型。基于该概念,使用引起家族性肥厚性心肌病的肌球蛋白结合蛋白 C3 (MYBPC3) 突变,评估了基于 CRISPR/Cas9 的基因纠正在人类胚胎中的有效性。值得注意的是,显著减少了包含修正的 MYBPC3 基因和突变的 MYBPC3 基因的嵌合体胚胎的形成,提高了基因组编辑的治疗适用性^[63]。这展示了在研究环境下对人类胚胎进行种系基因组编辑的技术可行性。然而,在临床实现之前,有必要对伦理和安全问题进行进一步的讨论^[64]。

4 展 望

基于 CRISPR 的技术已经被证明是科学进步不可或缺。这是因为它在理解基因如何工作的基本问题的基础研究以及开发治疗癌症等复杂疾病的生物疗法方面具有广泛的适用性。然而,与这项技术相关的一些挑战仍然需要解决。例如,CRISPR/Cas9 病毒载体存在很多缺陷,因此人们对开发非病毒递送策略,由固体脂质纳米粒^[65]、金纳米粒^[66]、阳离子聚合物^[67]、脂质过氧化氢(lipofectamine)^[68]组成的载体均已被研究用于 Cas9 和 gRNA 的非病毒传递,并已能够在体内有效灭活多种组织中的基因。已经开发出了 Cas9、gRNA (s) 和 dDNA (称为 CRISPR-Cas9-Gold) 复合物的金纳米颗粒,其能够在肌肉组织的体内产生同源重组修复(homology-directed repair, HDR), HDR 效率为 5%。与病毒载体相比,CRISPR-Cas9-Gold 也能够减轻免疫识别(无 AAV),并且具有较低的脱靶效应(Cas9 基因无连续表达)^[69]。此外,金黄色葡萄球菌和化脓性链球菌的 Cas9 可使人类感染疾病已被证明。克服这一问题的一个可能策略是重新设计 Cas9 或使用一种能够逃避宿主免疫反应的不同细菌蛋白。这项技术也存在伦理问题,随着 2018 年 11 月“CRISPR 婴儿”的诞生,科学家们必须共同应对 CRISPR 的挑战,这一挑战可能会带来基因不平等的时代及其长期影响。尽管这些挑战依然存在,但基于 CRISPR 的技术有着巨大的潜力,并且是基因组编辑工具箱中的一个重要补充,可用于开发能够改善患者未来结局的生物疗法。

CRISPR/Cas9 的临床进展目前严重依赖于二维细胞培养和啮齿动物模型(两者都与人类组织存在显著差异)。NHEJ 和 HDR 在人体细胞和组织中的检测和优化 CRISPR/Cas9 还需要更多的进展,器官芯片在这方面提供了巨大的机会。对于 T 细胞和免疫治疗来

说,最关键的问题是识别针对大量未使用 CAR 靶向表面蛋白的癌症的靶向肿瘤特异性抗原。造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)的转导仍然是一个相对复杂的过程,需要大量的载体才能产生大量的临床修饰 CD34⁺ 细胞。这可能会增加每位患者的成本并限制其可用性。因此在 CD34⁺ 细胞异质群体之外进一步富集 HSC 是减少载体需求的一种方法^[70]。有报道称,一些小分子可以增加 CD34⁺ 细胞的慢病毒载体转导,甚至可以减少每个细胞的载体数量,这些所谓的“转导增强剂”正在临床试验中进行评估^[71]。总之,CRISPR/Cas9 领域正在蓬勃发展,这种科学方法具有巨大的治疗潜力,而且还预示着一个医学的新时代。

参考文献

- [1] Prakash V, Moore M, Yanez-Munoz R J. Current progress in therapeutic gene editing for monogenic diseases. *Mol Ther*, 2016, 24(3):465-474.
- [2] 朱玉昌, 郑小江, 胡一兵. 基因编辑技术的方法、原理及应用. *生物医学*, 2015, 5(3):32-41.
Zhu Y C, Zhen X J, Hu Y B. Methods, principles and applications of gene editing technology. *Hans Journal of Biomedicine*, 2015, 5(3):32-41.
- [3] Cai M, Yang Y. Targeted genome editing tools for disease modeling and gene therapy. *Curr Gene Ther*, 2014, 14(1):2-9.
- [4] Kc M, Steer C J. A new era of gene editing for the treatment of human diseases. *Swiss Med Wkly*, 2019, 149:w20021. DOI:10.4414/sm.w.2019.20021.
- [5] Klug A. The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation. *Annu Rev Biochem*, 2010, 43(1):1-21.
- [6] Ji H Y, Lu P P, Liu B C, et al. Zinc-finger nucleases induced by HIV-1 tat excise HIV-1 from the host genome in infected and latently infected cells. *Mol Ther-Nucl Acids*, 2018, 12:67-74.
- [7] Miller J C, Tan S, Qiao G, et al. A tale nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(2):143-148.
- [8] Boch J, Bonas U. Xanthomonas avrBs3 family-type iii effectors: Discovery and function. *Annu Rev Phytopathol*, 2010, 48(1):419-436.
- [9] Gaj T, Gersbach C A, Barbas C F. ZFN, talen, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol*, 2013, 31(7):397-405.
- [10] Zarei A, Razban V, Hosseini S E, et al. Creating cell and animal models of human disease by genome editing using CRISPR/Cas9. *J Gene Med*, 2019, 21:e3082. doi:10.1002/jgm.3082.

- [11] Kieckhafer J E, Maina F, Wells R G, et al. Liver cancer gene discovery using gene targeting, sleeping beauty, and CRISPR/Cas9//Jordi B, Gregory J G. *Seminars in Liver Disease*. New York:Thieme Medical Publishers,2019:1-13.
- [12] Chylinski K, Le Rhun A, Charpentier E. The tracrna and cas9 families of type ii CRISPR-Cas immunity systems. *Rna Biol*, 2013,10(5):726-737.
- [13] 蒋伟, 黎满香, 田世成, 等. Crispr 系统结构与功能研究进展. *动物医学进展*, 2012,33(10):82-86.
Jiang W, Li M X, Tian S C, et al. Advances in the research on the structure and function of CRISPR system. *Advances in Animal Medicine*, 2012, 33(10): 82-86.
- [14] Shah S A, Erdmann S, Mojica F J, et al. Protospacer recognition motifs: Mixed identities and functional diversity. *RNA Biol*, 2013,10(5):891-899.
- [15] Charpentier E, Richter H, van der Oost J, et al. Biogenesis pathways of rna guides in archaeal and bacterial CRISPR-Cas adaptive immunity. *Fems Microbiol Rev*, 2015, 39(3): 428-441.
- [16] Ricciardi A S, Quijano E, Putman R, et al. Peptide nucleic acids as a tool for site-specific gene editing. *Molecules*, 2018,23(3):632-647.
- [17] Bahal R, Ali McNeer N, Quijano E, et al. *In vivo* correction of anaemia in beta-thalassemic mice by gamma-globin-mediated gene editing with nanoparticle delivery. *Nat Commun*, 2016,7(1): 13304-13318.
- [18] Rousseau B A, Hou Z G, Gramelspacher M J, et al. Programmable rna cleavage and recognition by a natural CRISPR-Cas9 system from *neisseria meningitidis*. *Mol Cell*, 2018, 69(5):906-914.
- [19] Bao Z H, Hamedirad M, Xue P, et al. Genome-scale engineering of *saccharomyces cerevisiae* with single-nucleotide precision. *Nature Biotechnology*, 2018,36(6):505-508.
- [20] Halperin S O, Tou C J, Wong E B, et al. Crispr-guided DNA polymerases enable diversification of all nucleotides in a tunable window. *Nature*, 2018,560(7717):248-252.
- [21] Wang H F, Xu X S, Nguyen C M, et al. CRISPR-mediated programmable 3d genome positioning and nuclear organization. *Cell*, 2018,175(5):1405-1418.
- [22] Gapinske M, Luu A, Winter J, et al. Crispr-skip: Programmable gene splicing with single base editors. *Genome Biology*, 2018,19(1):107-118.
- [23] Ran F A, Hsu P D, Wright J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*, 2013,8(11):2281-2308.
- [24] Platt R J, Chen SD, Zhou Y, et al. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell*, 2014,159(2): 440-455.
- [25] Mittal R D. Gene editing in clinical practice: Where are we. *Indian J Clin Biochem*, 2019,34(1):19-25.
- [26] Ghosh D, Venkataramani P, Nandi S, et al. CRISPR-Cas9 a boon or bane: The bumpy road ahead to cancer therapeutics. *Cancer Cell Int*, 2019,19(1):12-22.
- [27] Zhou Q, Derti A, Ruddy D, et al. A chemical genetics approach for the functional assessment of novel cancer genes. *Cancer Res*, 2015,75(10):1949-1958.
- [28] Choi P S, Meyerson M. Targeted genomic rearrangements using CRISPR/Cas technology. *Nat Commun*, 2014, 5(1): 3728-3734.
- [29] Torres R, Martin M C, Garcia A, et al. Engineering human tumour-associated chromosomal translocations with the rna-guided CRISPR-Cas9 system. *Nat Commun*, 2014,5(1):3964-3972.
- [30] Cho S W, Kim S, Kim J M, et al. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 rna-guided endonuclease. *Nat Biotechnol*, 2013,31(3):230-232.
- [31] Wang H, Sun W. CRISPR-mediated targeting of her2 inhibits cell proliferation through a dominant negative mutation. *Cancer Lett*, 2017,385:137-143.
- [32] Cheng B B, Yuan W E, Su J, et al. Recent advances in small molecule based cancer immunotherapy. *Eur J Med Chem*, 2018, 157:582-598.
- [33] Ren J T, Zhang X H, Liu X J, et al. A versatile system for rapid multiplex genome-edited Car t cell generation. *Oncotarget*, 2017,8(10):17002-17011.
- [34] Manguso R T, Pope H W, Zimmer M D, et al. *In vivo* CRISPR screening identifies ptpn2 as a cancer immunotherapy target. *Nature*, 2017,547(7664):413.
- [35] Conboy I, Murthy N, Etienne J, et al. Making gene editing a therapeutic reality. *F1000 Research*, 2018,7:1970.
- [36] Tabebordbar M, Zhu K, Cheng J K W, et al. *In vivo* gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science*, 2016,351(6271):407-411.
- [37] Nelson C E, Hakim C H, Ousterout D G, et al. *In vivo* genome editing improves muscle function in a mouse model of duchenne muscular dystrophy. *Science*, 2016,351(6271):403-407.
- [38] Amoasii L, Hildyard J C W, Li H, et al. Gene editing restores dystrophin expression in a canine model of duchenne muscular dystrophy. *Science*, 2018,362(6410):86-90.
- [39] Amoasii L, Long C Z, Li H, et al. Single-cut genome editing restores dystrophin expression in a new mouse model of muscular dystrophy. *Sci Transl Med*, 2017, 9(418): ean8081.
- [40] Chen Y C, Zheng Y H, Kang Y, et al. Functional disruption of the dystrophin gene in rhesus monkey using CRISPR/Cas9. *Hum Mol Genet*, 2015,24(13):3764-3774.
- [41] Huai C, Jia C, Sun R, et al. CRISPR/Cas9-mediated somatic

- and germline gene correction to restore hemostasis in hemophilia b mice. *Hum Genet*, 2017,136(7):875-883.
- [42] Ohmori T, Nagao Y, Mizukami H, et al. CRISPR/Cas9-mediated genome editing via postnatal administration of aav vector cures haemophilia b mice. *Sci Rep*, 2017,7(1):4159.
- [43] Rangarajan S, Walsh L, Lester W, et al. Aav5-factor *viii* gene transfer in severe hemophilia a. *N Engl J Med*, 2017,377(26):2519-2530.
- [44] Chiuchio M J, Crystal R G. Gene therapy for alpha-1 antitrypsin deficiency lung disease. *Annals of the American Thoracic Society*, 2016,13(4):S352-S369.
- [45] Stephens C J, Kashentseva E, Everett W, et al. Targeted *in vivo* knock-in of human alpha-1-antitrypsin cDNA using adenoviral delivery of CRISPR/Cas9. *Gene Ther*, 2018,25(2):139-156.
- [46] Shen S, Sanchez M E, Blomenkamp K, et al. Amelioration of alpha-1 antitrypsin deficiency diseases with genome editing in transgenic mice. *Human Gene Therapy*, 2018,29(8):861-873.
- [47] Tu Z C, Yang W L, Yan S, et al. CRISPR/Cas9: A powerful genetic engineering tool for establishing large animal models of neurodegenerative diseases. *Mol Neurodegener*, 2015,10(1):35-43.
- [48] Jung Y W, Hysolli E, Kim K Y, et al. Human induced pluripotent stem cells and neurodegenerative disease: Prospects for novel therapies. *Curr Opin Neurol*, 2012,25(2):125-130.
- [49] Ross C A, Akimov S S. Human-induced pluripotent stem cells: Potential for neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet*, 2014,23(R1):R17-R26.
- [50] Maruyama T, Dougan S K, Truttmann M C, et al. Corrigendum: Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nat Biotechnol*, 2016,34(2):210.
- [51] Kramer N J, Haney M S, Morgens D W, et al. CRISPR-Cas9 screens in human cells and primary neurons identify modifiers of c9orf72 dipeptide-repeat-protein toxicity. *Nat Genet*, 2018,50(4):603-612.
- [52] Bezerra L M D. Global report: Unaided report on the global aids epidemic; 2010. Geneva Switzerland Unaided, 2012,27(7):553-556.
- [53] Donahue D A, Wainberg M A. Cellular and molecular mechanisms involved in the establishment of HIV-1 latency. *Retrovirology*, 2013,10(1):11.
- [54] Saayman S, Ali S A, Morris K V, et al. The therapeutic application of CRISPR/Cas9 technologies for HIV. *Expert Opin Biol Ther*, 2015,15(6):819-830.
- [55] Zhu W, Lei R, Le Duff Y, et al. The CRISPR/Cas9 system inactivates latent HIV-1 proviral DNA. *Retrovirology*, 2015,12(1):22.
- [56] Ebina H, Misawa N, Kanemura Y, et al. Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Sci Rep*, 2013,3(8):2510.
- [57] Liao H K, Gu Y, Diaz A, et al. Use of the CRISPR/Cas9 system as an intracellular defense against HIV-1 infection in human cells. *Nat Commun*, 2015,6(1):6413-6423.
- [58] Saha S K, Saikot F K, Rahman M S, et al. Programmable molecular scissors: Applications of a new tool for genome editing in biotech. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019,14:212-238.
- [59] Hammoudi N, Ishikawa K, Hajjar R J. Adeno-associated virus-mediated gene therapy in cardiovascular disease. *Curr Opin Cardiol*, 2015,30(3):228-234.
- [60] Chadwick A C, Musunuru K. CRISPR-Cas9 genome editing for treatment of atherogenic dyslipidemia. *Arterioscl Throm Vas*, 2018,38(1):12-18.
- [61] Ran F A, Cong L, Yan W X, et al. *In vivo* genome editing using staphylococcus aureus Cas9. *Nature*, 2015,520(7546):186-198.
- [62] Sabatine M S, Giugliano R P, Keech A C, et al. Evolocumab and clinical outcomes in patients with cardiovascular disease. *New Engl J Med*, 2017,376(18):1713-1722.
- [63] Ma H, Marti-Gutierrez N, Park S W, et al. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature*, 2017,548(7668):413-419.
- [64] Ormond K E, Mortlock D P, Scholes D T, et al. Human germline genome editing. *American Journal of Human Genetics*, 2017,101(2):167-176.
- [65] Yin H, Song C Q, Suresh S, et al. Structure-guided chemical modification of guide rna enables potent non-viral *in vivo* genome editing. *Nat Biotechnol*, 2017,35(12):1179-1187.
- [66] Zuris J A, Thompson D B, Shu Y, et al. Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing *in vitro* and *in vivo*. *Nat Biotechnol*, 2015,33(1):73-80.
- [67] Wujin S, Wenyan J, Hall J M, et al. Self-assembled DNA nanoclews for the efficient delivery of CRISPR-Cas9 for genome editing. *Angewandte Chemie*, 2015,54(41):12029-12033.
- [68] Zuris J A, Thompson D B, Shu Y, et al. Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing *in vitro* and *in vivo*. *Nat Biotechnol*, 2015,33(1):73-80.
- [69] Lee K, Conboy M, Park H M, et al. Nanoparticle delivery of Cas9 ribonucleoprotein and donor DNA *in vivo* induces homology-directed DNA repair. *Nat Biomed Eng*, 2017,1(11):889-901.
- [70] Carolina P, Daniela C, Francesco P, et al. Cyclosporin a and rapamycin relieve distinct lentiviral restriction blocks in hematopoietic stem and progenitor cells. *Molecular Therapy the Journal of the American Society of Gene Therapy*, 2015,23(2):352-362.

[71] Kohn D B. Gene therapy for blood diseases. Curr Opin

Biotechnol, 2018,60C:39-45.

Advances of Gene Editing in Disease Treatment

YANG Chun-yan WANG Lei MU Deng-cai LI Fang-fang SHEN Hao ZHENG Shang-yong

(School of Medicine, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract Gene editing is a new technology of precise gene modification which provides a powerful tool for gene function analyses. Currently, these methods such as zinc-finger nuclease (ZFN), transcription activator-like effector nuclease (TALEN) and clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) are available for researchers to operate target genes. Also fields like gene function analyses and medical therapy have been innovated. The types and principles of gene editing technology are summarized. The research progress of CRISPR gene editing technology in the treatment of diseases was highlighted. In the end, the future research of gene editing technology is prospected.

Key words Gene editing CRISPR ZFN TALEN Disease treatment