

基因编辑技术及其在疾病治疗中的研究进展

牛煦然, 尹树明, 陈曦, 邵婷婷, 李大力

上海市调控生物学重点实验室, 华东师范大学生命科学学院, 上海 200241

摘要: 基因编辑是一种基于人工核酸酶的遗传操作技术, 能精确地对 DNA 或 RNA 进行高效改造。基因编辑除了在基础研究、生物育种和药物筛选等方面展现了巨大前景之外, 在疾病治疗(特别是基因遗传病)领域的前景与进展尤为引人注目。本文在介绍基因编辑技术的发展及其在疾病治疗中不同策略的基础上, 重点围绕遗传疾病的基因治疗研究, 综述了基因编辑技术(包括单碱基编辑和表观调控等技术)在血液系统、肝脏、肌肉和神经系统等疾病治疗的研究进展, 并对基因编辑治疗疾病的未来发展进行了展望。

关键词: 基因编辑; 基因治疗; 遗传病

Gene editing technology and its recent progress in disease therapy

Xuran Niu, Shuming Yin, Xi Chen, Tingting Shao, Dali Li

Shanghai Key Laboratory of Regulatory Biology, School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200241, China

Abstract: Gene editing is a genetic manipulation technology which utilizes bacterial nucleases to accurately and efficiently modify DNA or RNA. Gene editing has broad applications in basic research, breeding, and drug screening, and it is gaining validity and applicability to the therapy of many diseases especially genetic-based disease. In this review, we summarize the development of gene editing technology, its different strategies and applications in the treatment of disease, and the research of gene editing therapy for genetic diseases (including base editor and epigenetic regulation) in the treatment of disorders and diseases of the blood system, liver, muscle and nervous system. Finally, we discuss the future development prospects of gene editing therapy.

Keywords: gene editing; gene therapy; genetic diseases

1953 年, Watson 与 Crick 提出的 DNA 双螺旋结构拉开了现代分子生物学的序幕, 也打开了人类从 DNA 分子层面深入认识遗传疾病的大门。随着测

序和分析技术的不断发展, 目前已知的人类遗传病超过 6000 种, 其中 3200 种为单基因遗传病^[1]。虽然人们对遗传疾病的了解和诊断有了长足的发展,

收稿日期: 2019-04-16; 修回日期: 2019-05-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 81670470, 81873685)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos.81670470, 81873685)]

作者简介: 牛煦然, 本科在读, 专业方向: 生物科学。E-mail: 574569231@qq.com

通讯作者: 李大力, 博士, 研究员, 研究方向: 基因编辑。E-mail: dlli@bio.ecnu.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.19-102

网络出版时间: 2019/7/2 14:54:46

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20190702.1454.001.html>

但是对于这些疾病的治疗仍然举步维艰: 超过 95% 的遗传疾病都没有有效的治疗方法, 更谈不上治愈^[1]。相对于传统的小分子或者酶替代疗法需要不断给药持续治疗, 基因治疗有望一次治疗达到长期疗效, 是遗传疾病治愈的希望。近几年, 基因治疗领域蓬勃发展, 目前已经有 Luxturna、Glybera Strimvelis 等 3 个治疗罕见病的药物获批上市^[2~4], 预计在近年将有更多的药物获得批准, 应用于临床。然而, 传统的基因治疗方法存在着潜在的致癌风险, 治疗的时效性还有待更长时间的考验。基因编辑技术的出现, 将为基因治疗增添新的升级工具, 弥补传统基因疗法的不足, 有望真正实现一次治疗终身治愈的目标, 成为目前研究的热点。在未来, 采用基因编辑技术进行基因治疗, 也必将会在生物医学与临床治疗领域带来更为深刻的变革。本文即从基因编辑技术的发展沿革入手, 对近年来基因编辑在疾病治疗中的研究进展进行总结。

1 基因编辑技术的发展

近年来, 基于多种高效核酸酶的发现, 基因编

辑技术得到了快速发展和广泛应用。其中以人工核酸内切酶介导的基因组编辑技术发展最为迅速^[5], 主要包括 4 种: 大范围核酸酶技术(meganuclease)、锌指核酸酶技术(zinc finger nuclease, ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶技术(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)和成簇的规律间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)/CRISPR 相关蛋白(CRISPR-associated proteins, Cas)系统。通过人工核酸酶可以精确靶向诱导双链 DNA 断裂(double strand break, DSB), 在 DSB 产生之后, 细胞内将启动两种主要的修复机制^[6]: 在通常情况下, 细胞主要通过非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)的方式进行修复, NHEJ 可以在 DSB 位点有效的产生不同长度片段的插入或缺失(insertions and/or deletions, indel), 通常导致基因功能失活; 在存在同源序列的 DNA 模板的情况下, 细胞还会采取同源重组(homology-directed repair, HDR)的方式进行修复, 可以实现特定位点的精确插入、缺失或者碱基置换^[7](图 1)。然而, 相对于 ZFN 技术、TALEN 技术和 CRISPR/Cas9 技术, 2016 年诞生的单碱基编

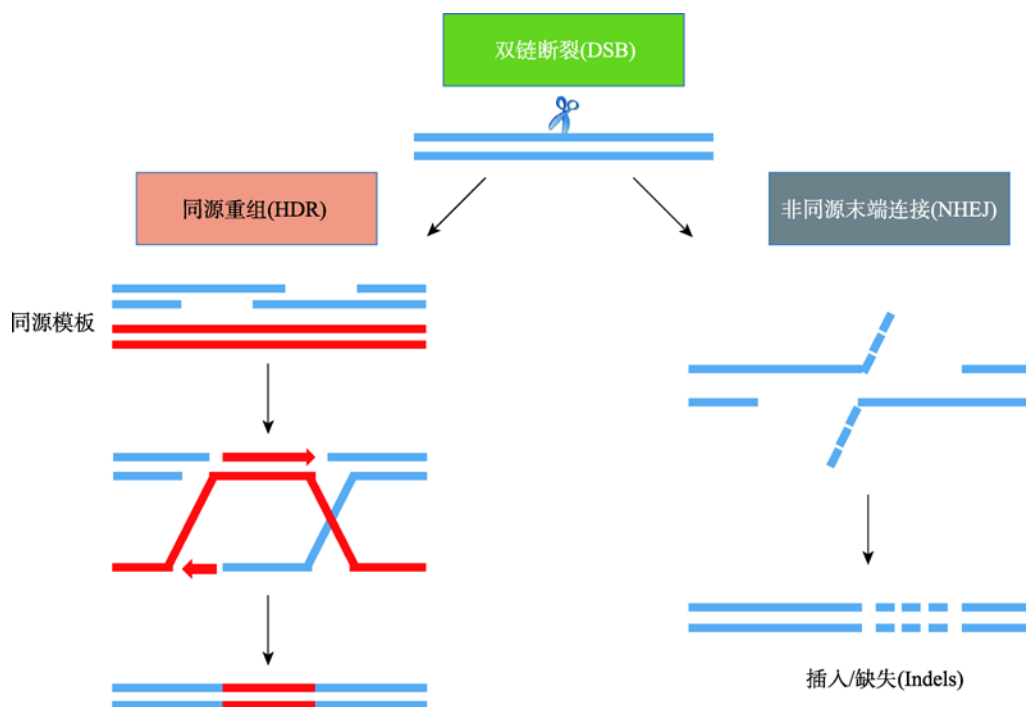


图 1 基因编辑原理

Fig. 1 Schematic of gene editing

辑技术(base editor, BE),可以在不需要同源模板的情况下实现精确的碱基替换,同时不会产生双链断裂,具有更安全、高效的特点,应用潜力大^[8-10]。与此同时,随着科学家对基因编辑工具认识的加深和不断改造,基因编辑工具的应用领域也从基因组编辑发展到了表观基因组编辑和转录组调控领域,开发出一系列表观基因组编辑工具和转录调控相关工具。这些工具展示了基因编辑技术的超强可塑性,增加了更多的应用场景,也在基因治疗中展现了优势。

1.1 大范围核酸酶技术

大范围核酸酶是早期的基因编辑工具,为一种具有较大切割位点(通常为 12~45 bp)的序列特异性核酸内切酶^[11]。在自然界中,大范围核酸酶以归巢内切核酸酶(homing endonuclease, HE)代表^[12]。目前,大范围核酸酶已经用于在细胞系和植物中诱导靶序列附近产生 DSB,以达到在基因组中敲除内源基因或敲入外源基因的目的,或者是矫正与单基因疾病相关的突变^[13]。在诸多核酸酶之中,它的编辑精度更高,自身编码基因也比较小(只有 1 kb 左右),能容易包装入 AAV 载体中。2018 年, *Nature Biotechnology* 杂志发表了一项用大范围核酸内切酶 I-CreI 靶向敲除非人类灵长类动物的 *PCSK9* 基因,成功降低了体内胆固醇的水平研究^[14]。但是,对大范围核酸酶诱导重组的应用长期以来受到天然大范围核酸酶种类的限制,以及大部分大范围核酸酶很难在人基因组上找到合适的位点,这都使得大范围核酸酶的广泛应用较为困难。

1.2 锌指核酸酶技术

锌指蛋白最早在 1984 年由科学家们从非洲爪蟾的转录因子中发现,后来逐步发展为锌指核酸酶技术^[15]。ZFN 主要包括用于识别和结合特定的 DNA 序列重复的锌指蛋白(zinc finger protein, ZFP)和来源于海床黄杆菌(*Flavobacterium okeanokoites*)的一种可以通过二聚体化非特异地切割 DNA 的核酸内切酶 *Fok I*^[16,17]。利用一对串联的锌指结合特异 DNA,将 *Fok I* 的两个亚基带到特定基因组位点,对 DNA 进行切割产生 DSB。识别特定 DNA 的锌指序列需

要通过文库筛选来确定,非常耗时耗力,也需要丰富的经验,一定程度上限制了其发展。此外,因为锌指核酸酶存在上下游 DNA 序列的依赖效应^[18-20],这进一步加大了筛选的难度,也由此可能产生更多的脱靶效应,引发细胞毒性,故而对 ZFN 的应用推广也产生了一定的阻碍。不可否认,ZFN 是最早开发的开创性技术,也是往临床推进最为深入的技术,为后续基因编辑技术的快速发展奠定了基础。

1.3 转录激活因子样效应物技术

1989 年,科学家们从植物病原体黄单胞菌属(*Xanthomonas*)中克隆出一种 *avrBs3* 蛋白,该蛋白质可以结合植物宿主基因组并激活转录^[21]。2007 年,这种特殊的分泌蛋白质被命名为转录激活因子样效应物 TALE^[22,23]。TALE 如何结合 DNA 的机制在 2009 年逐步被科学家们成功解析^[24,25]。2012 年,TALEN 技术正式出现,ZFN 技术随之被渐渐取代^[26]。与锌指核酸酶技术相似,TALEN 也由两部分组成,一部分是 TALE 蛋白所在的 DNA 的特异性识别和结合区域;另一部分是与 ZFN 相同的 *Fok I* 核酸酶^[27,28]。相比于 ZFN 而言,TALEN 的设计比较简单,只需要设计 1 个 TALE 分子就可以识别一个碱基,理论上可以靶向基因组任何区域^[29]。TALEN 技术的出现,在一定程度上解决了 ZFN 技术存在的脱靶问题,具有设计简单,特异性和活性更高的优点,成功地应用在小鼠、大鼠、果蝇和拟南芥等模式生物上,成为基因功能研究和基因治疗研究中有力的工具^[30-33]。

1.4 CRISPR/Cas 技术

1987 年,Nakata 研究组在分析大肠杆菌时偶然地发现在其基因组上的 *iap* 基因存在含有 29 个碱基的高度同源序列重复性,且这些重复序列被含 32 个碱基的序列间隔开^[34]。此后,类似的重复序列也不断在其他微生物中被发现。2002 年,这种重复序列被正式命名为 CRISPR,并且在重复序列附近发现了一系列保守的 CRISPR 相关基因(Cas)^[35]。2012 年,Gasiunas 等^[36]发现,使用单一引导 RNA(single-guide RNA, sgRNA)能和天然的 crRNA 和 tracrRNA 一样地有效介导 Cas9 靶向切割 DNA 片段,并逐步将 CRISPR/Cas 系统优化为更容易进行操作的 Cas9/

sgRNA 系统。

最早发现具有基因编辑功能和最广泛使用的 CRISPR/Cas9 是一种来源于酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的 Cas9(SpCas9)蛋白^[37], 由 RuvC 和 HNH 这两个重要结构域组成。RuvC 结构域负责切割靶向链, 而 HNH 负责切割与 sgRNA 互补配对的非靶向链, 切割位点通常位于 PAM (protospacer-adjacent motifs)序列(通常为 NGG)上游 3 nt 处。相比于传统的 ZFN 和 TALEN 技术, CRISPR/Cas9 技术更为简单, 只需要构建针对特定位点的 sgRNA, 而且效率也比前面几种技术更高, 在模型的构建和疾病治疗研究中发挥越来越重要的作用。当然, CRISPR/Cas9 系统仍然存在着一定的局限性, 这种局限性主要体现在功能发挥时系统对 DNA 上 PAM 序列的依赖性以及切割时潜在的脱靶效应^[38-40]。在 CRISPR/Cas9 系统中, Cas9 只在具有 PAM 序列且可以与 sgRNA 互补配对的靶序列发生切割。基于这些需要改善的方面, 研究人员开创性地发现了一些识别更多样 PAM 的 CRISPR/Cas 系统, 如: 识别 NNGRRT(R 代表嘌呤碱基)的 SaCas9^[41], 识别多 A/T 的 Cas12(Cpf1)系统^[42], 同时也对已有的 SpCas9 进行结构优化和改造, 开发出了以 NG 为 PAM 的 xCas9^[43]和 SpCas9-NG^[44]等。对于脱靶的问题, 科学家们根据 Cas9 结构特点设计出一系列精确性更高的 Cas9 突变体(如 eCas91.0、Cas9-HF1、HypaCas9 等)^[45,46]。研究证明, 这些优化或改造的 Cas9 可降低 50~1500 倍的脱靶率, 极大地解决了脱靶问题^[47]。

1.5 单碱基编辑技术

单碱基编辑技术(base editor, BE)是一种基于脱氨酶与 CRISPR/Cas9 系统融合形成的技术。2016 年哈佛大学 David Liu 实验室首次报道, 通过将 SpCas9 与胞嘧啶脱氨酶(cytidine deaminase, CyD, 如 APOBEC1)融合, 可以在一定的突变窗口内实现胞嘧啶(cytosine, C)到胸腺嘧啶(thymine, T)的单碱基转换(cytosine base editor, CBE)^[48]。随后多个实验室也发表了类似的工具, 并在这些工具的基础上进行了更为深入的改造与优化。Nishida 等^[49]将来源于七鳃鳗的胞嘧啶脱氨酶与 CRISPR/Cas9 和尿嘧啶糖苷酶抑制蛋白(uracil DNA glycosylase inhibitor, UGI)

融合, 可在哺乳动物细胞中实现 15%~55% 靶向突变。中国科学院上海生命科学研究院常兴课题组将人源胞嘧啶脱氨酶融合 dCas9 的 C 端(dCas9-AIDx)形成的 TAM (targeted AID-mediated mutagenesis)可通过诱变产生局部序列的多样化^[50]。2017 年 10 月底, David Liu 实验室在原有 BE 的基础上实现了腺嘌呤(adenine, A)到鸟嘌呤(guanine, G)的精确转换(adenine base editor, ABE)^[51], 为基因编辑提供了新的工具。相比于 CRISPR/Cas9 技术, BE 技术可以既不引入 DNA 双链断裂, 又不需要重组修复模板, 而且其效率远远高于由发生双链断裂引起的同源重组修复方式, 对于许多点突变造成的遗传疾病具有很大的应用潜能^[52]。

1.6 表观基因组编辑和转录调控

基因编辑工具的迅速发展使得在天然染色质环境中有针对性地进行表观基因组编辑和转录调控成为可能。目前, 表观遗传修饰和转录调控的设计主要基于核酸酶的结合运用, 其中以工程化缺陷型核酸酶(dCas9)的结合最为有效, 其设计原理在于把各种表观调控效应器融合到 dCas9 上, 利用核酸酶可以靶向识别并结合 DNA 的特性, 从而在特定位点上实现表观基因组的编辑。在常用的表观遗传编辑工具中, dCas9-KRAB^[53]和 dCas9-VP64^[54,55]分别是用于抑制和激活基因表达的调节因子。此外, dCas9-VPR^[56]和 dCas9-TV^[57]是比 dCas9-VP64 更有效的转录激活剂。这些反式调控结构域和蛋白是通过向启动子区域的 dCas9 靶向位点阻碍 RNA 聚合酶的结合或募集内源性转录复合物来发挥作用的。另一方面, Cas9 还可以与表观遗传修饰酶来进行融合, 直接催化 DNA 或者组蛋白的表观修饰, 调控基因的表达。dCas9-DNMT3A 已被证实可使靶向启动子上的 DNA 瞬时甲基化, 从而抑制基因的表达^[58]。相比之下, 使用 dCas9-TET1 则可实现启动子的快速和瞬时 DNA 去甲基化, 诱导靶基因的表达上调^[58,59]。此外, 通过 dCas9-PRDM9 和 dCas9-DOT1L 可以实现组蛋白稳定的甲基化, 以重新启动表观遗传相关沉默基因的表达^[60]。目前也有研究报道通过 dCas9-LSD1 诱导增强子的组蛋白脱甲基化, 可下调靶基因的表达^[61]。此外, 通过使用 dCas9-P300^[62]和 dCas9-

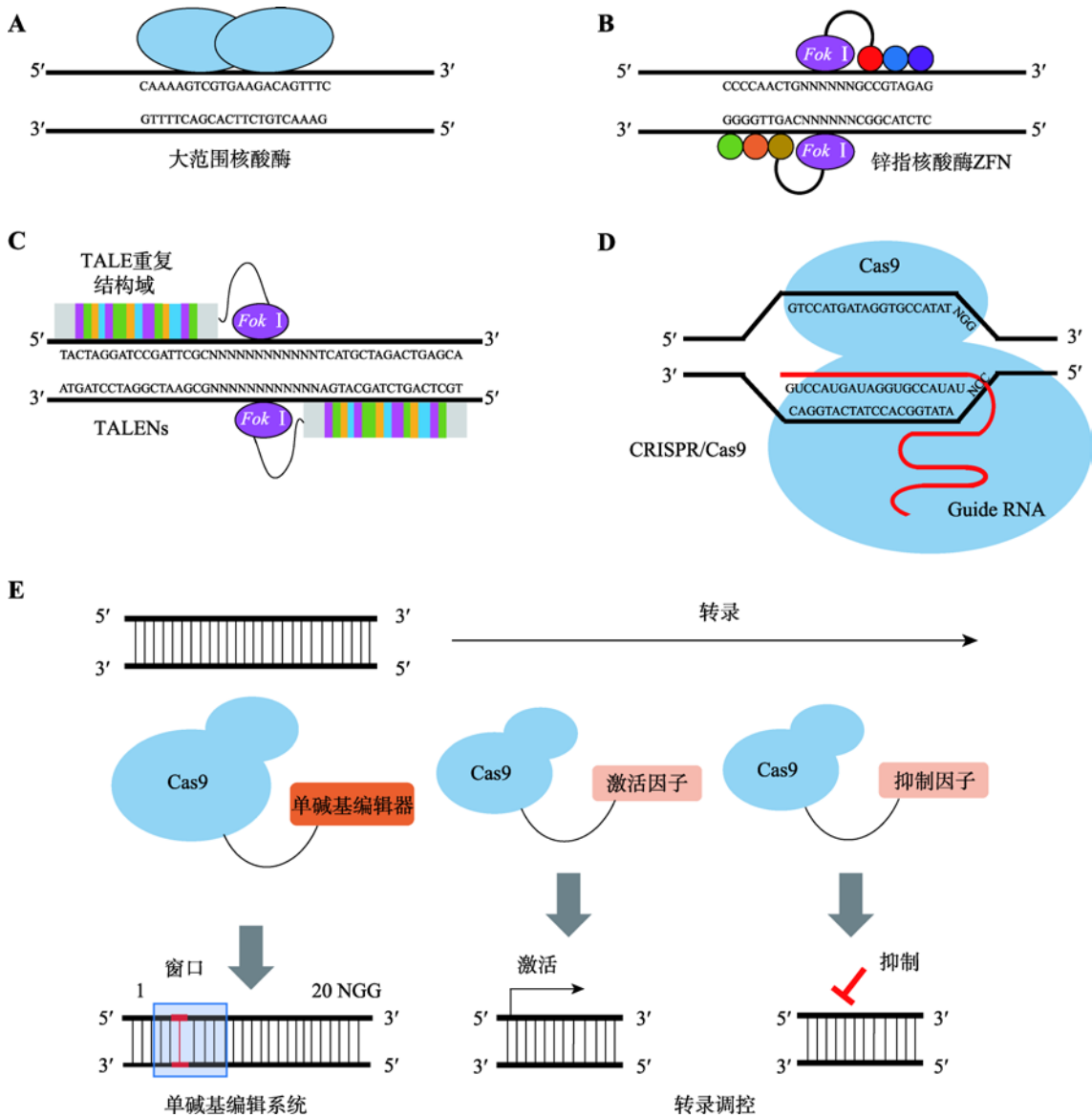


图 2 不同类型的基因编辑技术

Fig. 2 Different types of gene editing techniques

A: 大范围核酸酶技术 (图中蓝色部分为核酸酶蛋白); B: 锌指核酸酶技术, 重复的锌指蛋白作为基因组识别原件, *Fok I* 作为切割原件; C: TALEN 技术, TALE 重复结构域作为基因组识别原件, *Fok I* 作为切割原件; D: CRISPR/Cas9 技术 (蓝色部分为 Cas9 蛋白, 红色部分为 Guide RNA); E: 单碱基编辑与转录调控系统, 利用只具有识别活性的 dCas9 蛋白融合酶或调控原件, 对基因组进行编辑与操作。

HDAC3^[63], 在靶向增强子和启动子区域可实现组蛋白瞬时高效的乙酰化和脱乙酰化, 调控基因的表达。各种调控效应器同 dCas9 的结合极大地扩展了 CRISPR 在转录调控和表观基因组编辑的应用范围, 而相关研究也表明核酸酶的表观基因组编辑具有极高的安全性和特异性, 并且没有明显的脱靶效应^[52,64], 为体内表观基因修饰和治疗奠定了基础。

2 基因治疗的策略及其载体系统

基因疗法(gene therapeutics)的概念最早由美国科学家 Michael Bleas 于 1968 年提出。直到 1989 年, 美国的联邦食品与药品管理局(Food and Drug Administration, FDA)才首次同意了将载体导入的基因治疗方法用于晚期恶性黑色素瘤患者, 标志着人

类基因治疗(gene therapy)临床试验的开启。FDA 对基因治疗的定义是“通过各种手段修复缺陷基因,以实现减缓或者治愈疾病目的的技术”。可以看到,基因治疗主要是指将外源正常基因导入靶细胞,以纠正或补偿缺陷和异常基因引起的疾病,从而达到治疗目的。至今已有超过 2600 多项基因治疗的临床试验获批开展。2012 年,欧洲批准了格利贝拉(Glybera)作为第一个上市的基因药物,用于治疗罕见性遗传病——脂蛋白脂肪酶缺乏症(lipoprotein lipase deficiency, LPLD)。虽然该药物最后因为定价太高和需求不足而退出市场,但作为一个标志性的产品,代表着基因药物正式作为疾病治疗的新方法应用于临床。最近几年,基因治疗更是取得蓬勃发展。2016 年,基因治疗药物 Strimvelis 被欧洲药品管理局(European Medicines Agency, EMA)批准,用于治疗儿童腺苷脱氨酶(adenosine deaminase, ADA)缺乏性重度联合免疫缺陷症(ADA-severe combined immunodeficiency, ADA-SCID)。2017 年,来自美国 Spark 公司的具有跨时代意义的眼部罕见病基因治疗产品 Luxturna 获批上市,这也是 FDA 批准的首个基因治疗药物。另外,对于血友病、 β 地中海贫血、杜氏肌营养不良和 1 型脊髓性肌萎缩症(spinal muscular atrophy type 1, SMA1)等疾病而言,相应的基因治疗药物都在临床实验中取得了令人振奋的治疗效果,有望在近年获批上市,为相应疾病的治疗提供新的选择。

2.1 基因治疗的策略

长期以来,在科研和临床实践中,基因治疗的基本策略主要包括两类:一种是利用较为直接的方法对局部或全身注射含有修复基因片段的病毒或非病毒载体(*in vivo* therapy);另一种是将患者的体细胞(如造血干细胞)从体内分离,在体外进行培养并使用携带有正常基因片段的载体修复突变基因,最后通过注射的方法将改良后的细胞回输入患者体内(*ex vivo* therapy)以进行疾病的治疗^[65](图 3)。两种策略在不同组织器官的疾病治疗中各有侧重,为多种疾病的治疗提供了方法学支持。*ex vivo* 方法对于目的细胞(如造血干细胞)的遗传改造是在实验室中进行的,即使存在编辑效率较低的可能,但仍然可以通过实验筛选出正确改造的细胞,之后只需要进行扩大培养再回输回患者体内即可。而 *in vivo* 方法的整个编辑过程都是在体内进行,这就需要编辑方法和工具有较高活性;此外,在 *in vivo* 方法中,病毒载体注入人体之后,安全性是最关键的指标。关于治疗策略的安全性和有效性等问题将在下文做进一步讨论。

2.2 基因治疗的载体系统

由于基因治疗需要将相应的基因片段递送入人体或动物细胞中,因此想要进行基因治疗,必须要

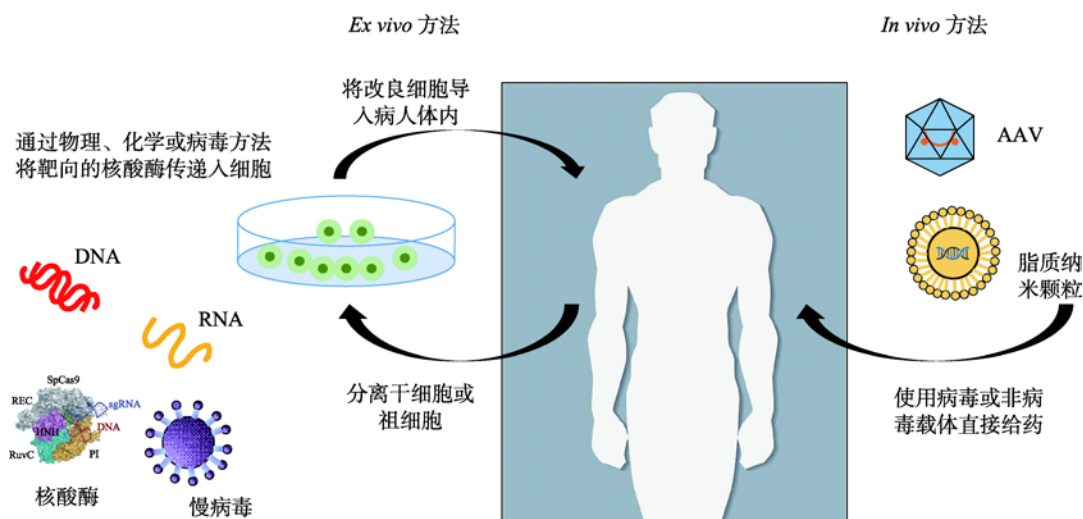


图 3 基因治疗策略

Fig.3 Strategies of gene therapy

有好的载体系统。所谓载体系统,主要是指递送外源基因片段的运输工具。目前基因治疗过程中用到的载体系统主要分为两类:一类是病毒类载体,另一类是非病毒类的载体。

2.2.1 病毒载体

病毒是一类能对人体细胞及其它动物细胞进行有效感染的微生物。由于其具有良好的基因递送效能,故而被科学家们改造成为进行基因治疗的主要递送工具。按照时间的发展,在基因治疗中使用最广泛的病毒载体包括逆转录病毒(retro virus, RV)和慢病毒(lentivirus, LV)、腺病毒(adeno virus, Adv)以及腺相关病毒(adeno associated virus, AAV)等载体。

逆转录病毒是最早应用于基因治疗的一类载体,是一种 RNA 病毒,其中以 RV 和 LV 最为常用。逆转录病毒可以把目的基因随机整合入宿主基因组,从而长期稳定表达目的基因。但由于逆转录病毒的随机整合特点,容易干扰宿主基因的正常表达,具有潜在的致癌风险。不过在重度联合免疫缺陷症与地中海贫血疾病的治疗中,逆转录病毒仍然表现出很好的治疗效果,且未报道出相应的副作用^[66,67]。

Adv 是一类无包膜的双链 DNA 病毒。在临床和科研中,主要使用的是 Adv5 型腺病毒载体。与上面所述的逆转录病毒不同,Adv 不会将基因片段整合入宿主基因组,属于非整合型的病毒载体。不过,Adv 在使用中容易引发较强烈的免疫反应,故而在使用中存在一定的限制^[68]。

AAV 是目前应用前景比较广泛的一类基因转运工具。与 Adv 相同,AAV 仍然属于非整合型的载体,递送入细胞的基因片段可以在染色体外稳定表达^[69]。不过,由于其导入基因以游离状态存在,故而在细胞分裂中容易丢失。且其衣壳蛋白对应的不同血清型所导致的免疫原性也可能使 AAV 介导的治疗效果大打折扣。

2.2.2 非病毒载体

非病毒载体的使用原理是采用人工合成的载体材料的物理化学性质来介导基因的转移。与病毒载体相比较,非病毒载体具有成本低、制备简单、便于大规模生产、安全性高、外源基因长度不受限制

等优点,在表达反义寡核苷酸等特殊外源基因片段中,有着传统病毒载体不可替代的作用。正在研究的非病毒载体主要包括脂质体、分子偶联受体、聚合物(聚-L-赖氨酸、聚乙烯亚胺等)、复合载体以及纳米粒子载体等^[70]。常用的基因转移脂质体包括阳离子、中性和阴离子脂质体,其中阳离子脂质体研究的最为广泛;而应用于基因转移的无机纳米粒子主要包括硅、碳纳米管、铁氧化物等,它们主要通过穿过细胞膜将药物或生物分子转运到生物体中而起到治疗疾病的作用^[70]。虽然它们仍存在转染效率较低等问题,但也在基因治疗领域扮演着越来越重要的角色。

3 基因编辑技术在基因治疗中的应用

3.1 基因敲除在基因治疗中的应用

基因敲除(knock out, KO)是基因编辑工具的一个重要功能,可以实现基因组 DNA 特异片段的删除,进而导致目标基因的失活或激活等。在众多的遗传疾病中,有不少疾病便是与基因的异常表达相关。通过基因编辑工具敲除异常表达的基因或删除突变基因的特定区域,是遗传疾病基因治疗的一大策略。从基因敲除的整体情况上看,基因敲除型基因治疗可以分为 3 种类型:第一类是基因的完全敲除;第二类是基因部分功能区域的敲除(如增强子区域);第三类是杂合子中显性突变基因的敲除。这三类敲除在不同疾病研究中各有应用,为基因治疗提供了丰富的策略。

基因完全敲除策略在代谢类疾病治疗中最为典型(如家族性高胆固醇血症和 I 型酪氨酸血症血症),通过完全敲除代谢过程中的负调控蛋白或阻断上流代谢通路,间接地治疗疾病。PCSK9 蛋白能促进低密度脂蛋白受体(low-density lipoprotein receptor, LDLR)的降解而提高血浆低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein-cholesterol, LDL-C)的水平,是降低胆固醇水平和治疗心血管疾病的重要靶点。研究表明利用 Cas9 敲除肝脏中 PCSK9 可使血液中低密度脂蛋白胆固醇水平下降 35%~40%,对家族性高胆固醇血症起到了良好的治疗效果^[71]。酪氨酸血

症是一种因延胡索酰乙酰乙酸水解酶(fuarylacetoacetate hydrolase, Fah)缺乏引起酪氨酸代谢异常,并引起一系列并发症的疾病。4-羟基苯丙酮酸双氧酶(4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, Hpd)是酪氨酸分解途径中位于上游的代谢酶,可将4-羟基苯丙酮酸代谢为尿黑酸,而尿黑酸可进一步代谢生成延胡索酰乙酰乙酸。研究者们利用Cas9敲除肝细胞中的Hpd,从而降低进入酪氨酸分解下游代谢途径的尿黑酸,可将严重的I型酪氨酸血症转化为良性的III型酪氨酸血症,起到疾病的治疗作用^[72]。

基因部分功能区域敲除策略被经常应用于血液疾病和肌营养不良症(duchenne muscular dystrophy, DMD)的治疗。 β 地中海贫血是临床上常见的贫血疾病。地中海贫血又称珠蛋白生成障碍性贫血,是由于构成 β 珠蛋白的基因缺失或突变,导致构成血红蛋白的 α 链和 β 链珠蛋白的合成比例失衡,而造成红细胞寿命缩短的一种溶血性贫血。 β 地中海贫血的独特之处在于, β 珠蛋白功能或表达上的缺陷可以通过诱导 γ 珠蛋白的上调来进行补偿^[73]。 γ 珠蛋白是一种在胎儿发育期间表达但在出生后沉默的特殊珠蛋白。 γ 珠蛋白在成人人体内表达下降的一大原因是细胞内存在一种些转录抑制因子,它可以抑制 γ 珠蛋白表达,其中以BCL11A分子研究最为透彻^[74]。因此,研究者们创新性地提出敲除BCL11A基因作为治疗 β 地中海贫血的方法。然而,后续研究观察到在所有造血细胞系中如果不存在BCL11A对于非红细胞样细胞是有害的^[75]。有趣的是,科学家们在BCL11A的基因座上发现了一种增强子元件,可特异性地增强红细胞中的BCL11A的表达^[76,77]。因此,研究人员通过基因编辑技术敲除增强子元件从而起到抑制BCL11A表达的作用,能够在红细胞谱系细胞中实现 γ -珠蛋白的上调^[76-78]。同样,研究人员也通过敲除BCL11A的结合位点来解除BCL11A对 γ -珠蛋白表达的抑制作用,从而提高 γ -珠蛋白的表达^[79]。肌营养不良症由肌营养不良蛋白基因(Dmd)发生移码突变引起,并编码不正常的蛋白。不过,科学家们使用基因编辑工具敲除功能突变的一个或多个外显子,产生片段缩短的mRNA,该mRNA仍可翻译成有正常功能的蛋白质^[80-82],该方案有望用以解决大部分DMD患者群体的疾病治疗问题。

功能获得型突变(gain-of-function mutations)是许多显性遗传病的病因。对于杂合个体而言,失活一条染色体上的显性基因即可起到疾病治疗的效果。以亨廷顿舞蹈症(Huntington's disease)为例,美国哈佛医学院Jong-Min Lee实验室利用Cas9失活突变基因的研究对于这类显性遗传病的治疗而言具有相当重要的指导意义,由于很多基因在序列上存在多个突变位点,所以治疗前对患者基因突变位点的单核苷酸多态(single nucleotide polymorphism, SNP)检测也为这类疾病的精准治疗提供了前提^[83]。2018年,David Liu实验室利用脂质体递送一种Cas9-gRNA复合体的核糖核蛋白(ribonucleotide protein, RNP)用以失活发生显性突变的Tmc1(transmembrane channel-like gene family 1)基因,对贝多芬模型小鼠的耳聋疾病进行了治疗,缓解了小鼠失聪的症状^[84]。

3.2 基因敲入在基因治疗中的应用

与基因敲除相对应,基因敲入(knock in, KI)是基因治疗的另一种策略,应用于因关键基因突变失活而导致的遗传疾病的治疗。

利用同源重组的方式进行基因敲入是使用最为广泛的一种传统策略。通过同源重组方式进行基因治疗可分为两类:点突变修复和大片段(cDNA)敲入。根据临床病例及相关测序结果统计,由于点突变导致的疾病占人类遗传疾病总数的2/3^[52],因此通过精准的基因编辑工具进行点突变修复来治疗遗传疾病最为有益。以肝脏疾病为例,研究人员在小鼠模型中分别通过质粒、AAV和纳米材料递送CRISPR/Cas9系统和修复模板进行体内基因编辑治疗I型遗传性酪氨酸血症,结果显示都能完全治愈患病小鼠^[85]。本实验室在大鼠模型上通过递送nCas9进行在体治疗I型遗传性酪氨酸血症,相比于Cas9,nCas9不仅可以治愈患病大鼠,同时能够有效地降低脱靶^[86]。虽然对于I型遗传性酪氨酸血症来说,修复的细胞具有扩增优势,因此只需要修复不到1%的细胞就可以治愈疾病,而对于大多数肝脏类疾病并不适用。但是该类研究是证明在肝脏中用CRISPR/Cas9可以有效进行体内基因编辑的一个里程碑。而对肝细胞没有生长优势的疾病(如血友病),本实验室也在B型血友病小鼠中利用CRISPR/Cas9技术修复突变的

FIX 基因, 结果表明只需修复肝细胞中 0.6% 的 *FIX* 基因突变就有显著疗效^[87]。同时, *Nature Biotechnology* 报道通过两个 AAV 分别递送 SaCas9 和修复模板治疗因鸟氨酸转氨甲酰酶(ornithine transaminase, OTC) 缺乏的高血氨症, 在幼鼠的肝细胞中可以达到 10% 的修复效率, 能够有效治愈疾病, 但是在成年鼠中重组效率只有不到 2%, 没有治疗效果^[88]。这也提示成年动物肝细胞同源重组效率较低, 还有很大改进的空间。

然而, 事实上还有许多病人并不是由于单碱基突变导致的疾病, 往往由于不同位置的多个突变或大片段缺失或插入, 甚至是基因结构改变等原因导致疾病产生。而对于患这类疾病的病人, 大片段(cDNA)敲入的策略毫无疑问是最好的方法, 尤其是在基因组的一些安全位点或高表达基因的 3' UTR 处进行敲入。2011 年, Li 等^[89]首先利用 ZFN 结合 AAV 载体, 将 *FIX* cDNA 通过尾静脉注射导入到小鼠体内并实现了有效的整合, 这一研究已经进入临床试验阶段, 用于 B 型血友病新生儿的治疗。但是无论是通过点突变修复, 还是大片段敲入进行基因治疗, 都依赖于细胞的同源重组机制, 而同源重组仅只发生于细胞周期的 S/G₂ 期, 故只能在分裂细胞或器官中实现有效的疾病基因治疗, 此外, 由于同源重组效率较低, 这都成了限制同源重组进行基因治疗的主要障碍^[90]。

因此, 科学家在想办法提高同源重组效率的同时, 也在思考如何利用不依赖细胞周期的非同末端连接的机制来进行基因治疗。2016 年, 科学家新发现了一种非同末端连接优化后的非同源依赖的靶向整合(homology independent targeted integration, HITI)技术^[91], 相比于 HDR, HITI 第一次在非分裂细胞中成功实现了高效的外源基因靶向敲入, 并用于视网膜色素变性大鼠模型的修复。结果表明, HITI 介导的体内基因敲入效率可达 10%, 对视网膜色素变性起到了良好的治疗效果^[91]。2017 年, 中国科学院神经科学研究所杨辉实验室设计出一种长同源序列末端连接(homology-mediated end-joining, HMEJ)介导的定点基因整合方式, 这是一种基于 CRISPR/Cas9 系统, 利用 sgRNA 靶向位点和长同源臂(约 800 bp)的供体载体来实现高效的精确整合的技术^[92],

并利用其导入 *Fah* 基因, 进行酪氨酸血症的治疗研究, 具有一定的疗效^[93]。

3.3 单碱基编辑系统在基因治疗中的应用

自 BE 系统出现之后, 对于它的应用拓展一直以来就是研究者们关注的方向。由于 BE 系统在不造成双链断裂的前提下能引入精确的碱基转换, 避免了 DSB 造成的靶点和非靶点序列的缺失、插入等突变, 这对于基因治疗而言无疑是一个绝佳的工具。

因为 BE 系统可以实现其窗口内 C 到 T 或者 A 到 G 的定点突变, 故而很容易实现在开放阅读框内遗传密码子的改变(错义突变)或提前产生终止密码子。如果使得基因上提前出现终止密码子(TAA、TGA 或 TAG), 即可实现相应基因的敲除^[94,95]。2018 年 10 月, *Nature Medicine* 在线发表通过单碱基编辑技术来治疗肝脏类代谢疾病的研究^[96], 研究人员分别通过 AAV 递送 CBE 工具靶向肝细胞中 *PCSK9* 基因, 提前产生终止密码子, 从而降低肝细胞的 *PCSK9* 表达, 成功在小鼠模型中降低了胆固醇含量; 同样通过靶向提前终止 *Fah* 的上游基因 *Hpd* 的表达, 阻止酪氨酸代谢过程中有毒物质的产生, 成功治愈了 I 型遗传性酪氨酸血症。

除了通过产生终止密码子进行基因的敲除, BE 技术还可以用以进行突变基因的修复, 从而达到疾病治疗的目的。韩国首尔国立大学 Jin-Soo Kim 实验室将利用反式剪接腺相关病毒载体将 ABE 系统导入到成年 DMD 小鼠的肌肉中, 纠正了 *Dmd* 基因 20 号外显子上的一个无义突变, 恢复了 17% 的肌营养不良蛋白表达, 明显改善了患病小鼠的肌肉功能^[97]。而 2018 年, *Nature Medicine* 发表的另一项研究表明 CBE 工具可以治愈患苯丙酮尿症的成年小鼠模型, 并且修复效率在 RNA 水平上达到 63%^[98]。这样振奋人心的结果对此类没有肝细胞生长优势的疾病的治疗带来了希望, 同时也说明单碱基编辑技术在成体疾病的治疗上具有极大临床应用潜能。

3.4 表观遗传调控在基因治疗中的应用

基因组表观遗传修饰的异常与许多疾病的发生发展密切相关, 如代谢紊乱、心血管疾病和癌症等等。基于蛋白编码的基因研究是不足以解释这一类

疾病的发生机理, 这些疾病的发病机制主要是基因和环境共同作用的结果。转录调控和表观遗传修饰改变的可逆性为治疗这类疾病提供了新的希望。基因定点修饰技术的发展更为其精准治疗增加了可能。

目前利用转录调控和表观遗传定点修饰技术在体内治疗表观遗传异常引起疾病的研究还屈指可数。2017年, Liao等^[99]采用了一种gRNA融合MS2-P65-HSF1(MPH)转录激活复合物的策略, 将截短的gRNA(dgRNA)和MPH包装到两个单独的AAV载体中, 共同递送到表达dCas9的转基因小鼠中。通过靶向激活相应的功能性基因成功地修复了I型糖尿病、急性肾损伤和肌营养不良的疾病表型。同时另一项突破性的工作则使用一种SunTag(dCas9-10xGCN4)系统融合多个拷贝的转录激活蛋白(p65-HSF1), 构建了一种Cre依赖性的SunTag-p65-HSF1(SPH)转基因小鼠模型。使用AAV8将Cre和sgRNAs递送到SPH转基因小鼠中, 通过激活内源性神经源性转录因子的表达, 在小鼠体内成功地实现了星形胶质细胞直接转化为功能性的神经元^[100]。这一研究表明, 在不需要使用外源重编程因子或转录因子的前提下, 通过转录调控的CRISPR系统可以实现特定细胞的重编程或不同细胞类型之间的转分化, 为体外细胞基因治疗遗传疾病提供了新的策略。

2018年12月, *Science* 在线发表了一篇使用CRISPRa系统在小鼠中成功修复一种因单倍剂量不足引起的肥胖^[101]。研究人员通过AAV在SIM1基因或MC4R基因部分功能丧失的小鼠脑部递送dCas9-vp64和sgRNA的方式成功激活了SIM1或MC4R蛋白的表达, 成功抑制了肥胖的表型。这一策略给罹患单倍体剂量不足引起的疾病患者带来转机。

基因中CpG岛中的5' C经常突变引起高甲基化、羟甲基化等修饰, 研究表明这些异常修饰会影响基因的表达调控, 最终引起疾病^[102]。脆性X综合征(fragile X syndrome, FXS)即是一种由FMR1基因5' UTR区中CGG三核苷酸重复序列扩增突变并高甲基化, 使FMR基因沉默而导致的疾病。最近的一项研究通过利用dCas9融合Tet甲基胞嘧啶双加氧酶1(Tet methylcytosine dioxygenase 1, Tet1)转染FXS iPSCs细胞系, 成功靶向诱导FMR基因5' UTR CpG

岛去甲基化, 为这些因异常甲基化引起的疾病的治疗奠定了基础^[103]。

基于CRISPR的基因组转录调控和表观遗传修饰的优点在于能够调控基因的表达而不会造成永久性的DNA损伤, 因而不会产生有害突变和脱靶效应, 并且表观遗传疗法可以通过同时调节多个基因活性来提供更好的治疗效果, 进一步的研究可弥补基因治疗存在的不足, 是基因治疗研究的新热点。

4 问题与展望

4.1 基因编辑治疗所面临的问题

虽然采用基因编辑技术进行基因治疗在基础研究领域已经取得了不少突破性的进展, 可是目前在临床应用方面仍然存在几大困难与挑战。

首先是治疗的安全性。进行外源基因递送时采用的整合型载体(如LV载体)产生的可随细胞分裂而保留的插入突变和病毒载体本身所产生的免疫反应(如AAV衣壳蛋白引起的免疫排斥)是基因治疗在发展过程中备受讨论的风险问题, 同时基于各种基因编辑技术的基因治疗存在脱靶问题也使受众产生担忧。除此之外, 2018年6月发表在*Nature Medicine*的两篇文章指出^[104,105], 在某些情况下, CRISPR介导的基因组编辑可以导致p53介导的应激反应和细胞周期停滞现象, 强调人们有必要从更多角度去理解影响体内和体外可以有效进行基因组编辑的因素, 也侧面显示出基因编辑技术仍存在一些需要人们去深入思考的潜在问题(如是否存在潜在的致癌风险)。2019年3月, 中国科学家杨辉与高彩霞也在*Science*上“背靠背”发文, 发现CBE系统分别在小鼠胚胎和水稻中导致较多的脱靶性单核苷酸突变^[106,107], 这也启示人们在利用BE系统展开相关应用尤其是临床应用之前必须做好足够的安全性评估, 以避免大量脱靶导致的严重安全性问题。

其次, 就治疗的有效性而言, 载体的递送效率直接影响到治疗本身的效率。这种递送效率包括载体对外源基因本身携带的能力, 对细胞的亲和性以及最终的感染效率等3个方面。在进行基因编辑治疗时靶点的活性和编辑的效率对于治疗的有效性也

不容忽视。

最后,基因治疗的伦理也是不容忽视的问题^[108]。争议颇多的生殖细胞的编辑长期以来就受到科学家和社会学家的广泛反对,而在现有的科技与社会背景下,对于胚胎的基因编辑仍然也饱受争议。少数研究者认为对于胚胎 DNA 的修饰或编辑可以加深人们对于人类早期发育的理解,研究人员同时希望在较长时间之后,对于胚胎的实验研究可以在临床中用于修复致病的基因突变,进而避免将遗传性疾病传给下一代。但是大部分伦理学家和许多研究者仍然担心这些技术会被用于非医学目的。包括我国在内的许多国家禁止对胚胎的编辑研究,只允许在非生殖性的体细胞中进行编辑^[109]。但是,对于体细胞的编辑也应当小心谨慎,避免可能的潜在问题(如给治疗者带来严重的附加疾病)出现^[110-112]。

4.2 基因编辑治疗的发展前景

基因治疗从诞生到现在,已经逐步发展成为临床领域的重要治疗方式,且在治疗方法和药物开发方面取得了重大进展。3 个治疗罕见病的药物已经走入了遗传病患者的生活之中,且还有不少药物正在临床试验中接受着检验,可以预想到,随着社会需要的增强和相关药企的愈发重视,在未来还会有更多的药物获得批准,走向临床。目前,在新兴技术的驱动下,国际上已经出现了以 CRISPR/Cas9 技术为核心的三大基因编辑公司: Editas Medicine、CRISPR Therapeutics 和 Intellia Therapeutics。这三大基因编辑公司均致力于重大遗传疾病和肿瘤的基因治疗药物的研发,旨在攻克一系列人类重大疾病。2017 年底,患有亨特氏综合征的美国男子布莱恩·马德(Brian Madeux)在加州大学旧金山分校贝尼奥夫儿童医院接受了一次大胆的治疗:通过 AAV 递送基因编辑工具 ZFN 进行体内基因编辑来治疗疾病,这是世界上首次通过体内基因编辑来治疗遗传疾病的报道,更加说明基因编辑对于遗传疾病,尤其是肝脏类代谢疾病的治疗具有极其重要的临床应用潜能^[113]。基因编辑技术在近年来也和肿瘤的免疫治疗相结合^[114-116],为人类的疾病治疗提供了更多更新的选择。再回到技术本身,虽然 CBE 系统在研究中出现了较高的脱靶性,但是 ABE 系统仍然被证明具

有较好的保真性^[106,107]。此外,碱基编辑器由于不产生 DSB,故而也跳过了 p53 等风险因素,可能具有更好的安全性。在未来的基础医学实践中,碱基编辑器或许会发挥其特有的优势,创造更多的成果。

截止目前,基因编辑技术已经在基础科研和临床应用研究中取得了重大突破与进展,并不断创造着社会经济价值。随着现代医学的进步和个体化治疗的推进,基因编辑治疗的广泛化、个体化与最优化也将进一步发展,并在未来更多地走入患者的治疗与生活中。尽管目前对于基因治疗还有许多技术难题有待解决,但可以相信随着人类基因表达调控机制的阐明,以及转基因技术的发展和转基因方法的完善,采用基因编辑技术进行的基因治疗方式必将成为 21 世纪人类攻克疑难病症的一种常规治疗手段,为维护人类健康做出重要贡献。

参考文献(References):

- [1] Chu SY, Weng CY. Introduction to genetic/rare disease and the application of genetic counseling. *Hu Li Za Zhi*, 2017, 64(5): 11-17.
褚思义, 翁纯英. 遗传/罕见病简介及遗传咨询的应用. *护理杂志*, 2017, 64(5): 11-17. [DOI]
- [2] Darrow JJ. Luxturna: FDA documents reveal the value of a costly gene therapy. *Drug Discov Today*, 2019, 24(4): 949-954. [DOI]
- [3] Han X, Ni W. Cost-Effectiveness analysis of glybera for the treatment of lipoprotein lipase deficiency. *Value Health*, 2015, 18(7): A756. [DOI]
- [4] Schimmer J, Breazzano S. Investor outlook: rising from the ashes; GSK's European approval of strimvelis for ADA-SCID. *Hum Gene Ther Clin Dev*, 2016, 27(2): 57-61. [DOI]
- [5] Gupta SK, Shukla P. Gene editing for cell engineering: trends and applications. *Crit Rev Biotechnol*, 2017, 37(5): 672-684. [DOI]
- [6] Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H, Yamaguchi-Iwai Y, Shinohara A, Takeda S. 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. [DOI]

- [7] Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2003, 4(9): 712–720. [DOI]
- [8] Joung JK, Sander JD. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2012, 14(1): 49–55. [DOI]
- [9] Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(4): 347–355. [DOI]
- [10] Komor AC, Badran AH, Liu DR. CRISPR-Based technologies for the manipulation of eukaryotic genomes. *Cell*, 2017, 168(1–2): 20–36. [DOI]
- [11] Marcaida MJ, Prieto J, Redondo P. Crystal structure of I-DmOI in complex with its target DNA provides new insights into meganuclease engineering. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(44): 16888–16893. [DOI]
- [12] Smith J, Grizot S, Arnould S, Duclert A, Epinat JC, Chames P, Prieto J, Redondo P, Blanco FJ, Bravo J, Montoya G, Pâques F, Duchateau P. A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(22): e149. [DOI]
- [13] Silva G, Poirot L, Galetto R, Smith J, Montoya G, Duchateau P, Pâques F. Meganucleases and other tools for targeted genome engineering: Perspectives and challenges for gene therapy. *Curr Gene Ther*, 2011, 11(1): 11–27. [DOI]
- [14] Wang L, Smith J, Breton C, Clark P, Zhang J, Ying L, Che Y, Lape J, Bell P, Calcedo R, Buza EL, Savelliev A, Bartsevich VV, He Z, White J, Li M, Jantz D, Wilson JM. Meganuclease targeting of PCSK9 in macaque liver leads to stable reduction in serum cholesterol. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(8): 717–725. [DOI]
- [15] Mani M, Kandavelou K, Dy FJ, Durai S, Chandrasegaran S. Design, engineering, and characterization of zinc finger nucleases. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 335(2): 447–457. [DOI]
- [16] Carroll D. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics*, 2011, 188(4): 773–782. [DOI]
- [17] 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. [DOI]
- [18] Ramirez CL, Foley JE, Wright DA, Müller-Lerch F, Rahman SH, Cornu TI, Winfrey RJ, Sander JD, Fu F, Townsend JA, Cathomen T, Voytas DF, Joung JK. Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers. *Nat Methods*, 2008, 5(5): 374–375. [DOI]
- [19] Lam KN, van Bakel H, Cote AG, van der Ven A, Hughes TR. Sequence specificity is obtained from the majority of modular C2H2 Zinc-finger arrays. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(11): 4680–4690. [DOI]
- [20] Ul Ain Q, Chung JY, Kim YH. Current and future delivery systems for engineered nucleases: ZFN, TALEN and RGEN. *J Control Release*, 2014, 205: 120–127. [DOI]
- [21] 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. [DOI]
- [22] Kay S, Hahn S, Marois E, Hause G, Bonas U. A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science*, 2007, 318(5850): 648–651. [DOI]
- [23] Sugio A, Yang B, Zhu T, White FF. Two type III effector genes of *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* control the induction of the host genes *OsTFIIA 1* and *OsTFXI* during bacterial blight of rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(25): 10720–10725. [DOI]
- [24] Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, Lahaye T, Nickstadt A, Bonas U. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 2009, 326(5959): 1509–1512. [DOI]
- [25] Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 2009, 326(5959): 1501. [DOI]
- [26] Bedell VM, Wang Y, Campbell JM, Poshusta TL, Starker CG, Krug RG 2nd, Tan W, Penheiter SG, Ma AC, Leung AY, Fahrenkrug SC, Carlson DF, Voytas DF, Clark KJ, Essner JJ, Ekker SC. *In vivo* genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature*, 2012, 491(7422): 114–118. [DOI]
- [27] Tan WS, Carlson DF, Walton MW, Fahrenkrug SC, Hackett PB. Precision editing of large animal genomes. *Adv Genet*, 2012, 80: 37–97. [DOI]
- [28] Joung JK, Sander JD. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(1): 49–55. [DOI]
- [29] Lee HB, Sundberg BN, Sigafos AN, Clark KJ. Genome engineering with TALE and CRISPR systems in neuroscience. *Front Genet*, 2016, 7: 47. [DOI]
- [30] Qiu Z, Liu M, Chen Z, Shao Y, Pan H, Wei G, Yu C,

- Zhang L, Li X, Wang P, Fan HY, Du B, Liu B, Liu M, Li D. High-efficiency and heritable gene targeting in mouse by transcription activator-like effector nucleases. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(11): e120. [DOI]
- [31] Tong C, Huang G, Ashton C, Wu H, Yan H, Ying QL. Rapid and cost-effective gene targeting in rat embryonic stem cells by TALENs. *J Genet Genomics*, 2012, 39(6): 275–280. [DOI]
- [32] Liu J, Li C, Yu Z, Huang P, Wu H, Wei C, Zhu N, Shen Y, Chen Y, Zhang B, Deng WM, Jiao R. Efficient and specific modifications of the *Drosophila* genome by means of an easy TALEN strategy. *J Genet Genomics*, 2012, 39(5): 209–215. [DOI]
- [33] Christian M, Qi Y, Zhang Y, Voytas DF. Targeted mutagenesis of *Arabidopsis thaliana* using engineered TAL effector nucleases. *G3 (Bethesda)*, 2013, 3(10): 1697–1705. [DOI]
- [34] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. 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. [DOI]
- [35] Jansen R, Embden JD, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol*, 2002, 43(6): 1565–1575. [DOI]
- [36] Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(39): E2579–2586. [DOI]
- [37] Fonfara I, Le Rhun A, Chylinski K, Makarova KS, Lécivain AL, Bzdrenga J, Koonin EV, Charpentier E. 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. [DOI]
- [38] Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, Li Y, Fine EJ, Wu X, Shalem O, Cradick TJ, Marraffini LA, Bao G, Zhang F. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 827–832. [DOI]
- [39] Pattanayak V, Lin S, Guilinger JP, Ma E, Doudna JA, Liu DR. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 839–843. [DOI]
- [40] Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, Sander JD. High frequency off target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 822–826. [DOI]
- [41] Ran FA, Cong L, Yan WX, Scott DA, Gootenberg JS, Kriz AJ, Zetsche B, Shalem O, Wu X, Makarova KS, Koonin EV, Sharp PA, Zhang F. *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*, 2015, 520(7546): 186–191. [DOI]
- [42] Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, Volz SE, Joung J, van der Oost J, Regev A, Koonin EV, Zhang F. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, 2015, 163(3): 759–771. [DOI]
- [43] Hu JH, Miller SM, Geurts MH, Tang W, Chen L, Sun N, Zeina CM, Gao X, Rees HA, Lin Z, Liu DR. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature*, 2018, 556(7699): 57–63. [DOI]
- [44] Nishimasu H, Shi X, Ishiguro S, Gao L, Hirano S, Okazaki S, Noda T, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Mori H, Oura S, Holmes B, Tanaka M, Seki M, Hirano H, Aburatani H, Ishitani R, Ikawa M, Yachie N, Zhang F, Nureki O. Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space. *Science*, 2018, 361(6408): 1259–1262. [DOI]
- [45] Singh D, Wang Y, Mallon J, Yang O, Fei J, Poddar A, Ceylan D, Bailey S, Ha T. Mechanisms of improved specificity of engineered Cas9s revealed by single-molecule FRET analysis. *Nat Struct Mol Biol*, 2018, 25(4): 347–354. [DOI]
- [46] Chen JS, Dagdas YS, Kleinstiver BP, Welch MM, Sousa AA, Harrington LB, Sternberg SH, Joung JK, Yildiz A, Doudna JA. Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy. *Nature*, 2017, 550(7676): 407–410. [DOI]
- [47] Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, Scott DA, Inoue A, Matoba S, Zhang Y, Zhang F. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 2013, 154(6): 1380–1389. [DOI]
- [48] Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 2016, 533(7603): 420–424. [DOI]
- [49] Nishida K, Arazoe T, Yachie N, Banno S, Kakimoto M, Tabata M, Mochizuki M, Miyabe A, Araki M, Hara KY, Shimatani Z, Kondo A. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science*, 2016, 353(6305): aaf8729. [DOI]

- [50] Ma Y, Zhang J, Yin W, Zhang Z, Song Y, Chang X. Targeted AID-mediated mutagenesis (TAM) enables efficient genomic diversification in mammalian cells. *Nat Methods*, 2016, 13(12): 1029–1035. [DOI]
- [51] Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, Packer MS, Badran AH, Bryson DI, Liu DR. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 2017, 551(7681): 464–471. [DOI]
- [52] Wei Y, Zhang XH, Li DL. The “new favorite” of gene editing technology—single base editors. *Hereditas (Beijing)*, 2017, 39(12): 1115–1121.
魏瑜, 张晓辉, 李大力. 基因编辑之“新宠”—单碱基基因组编辑系统. *遗传*, 2017, 39(12): 1115–1121. [DOI]
- [53] Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu Z, Brar GA, Torres SE, Stern-Ginossar N, Brandman O, Whitehead EH, Doudna JA, Lim WA, Weissman JS, Qi LS. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, 2013, 154(2): 442–451. [DOI]
- [54] Maeder ML, Linder SJ, Cascio VM, Fu Y, Ho QH, Joung JK. CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nat Methods*, 2013, 10(10): 977–979. [DOI]
- [55] Perez-Pinera P, Kocak DD, Vockley CM, Adler AF, Kabadi AM, Polstein LR, Thakore PI, Glass KA, Ousterout DG, Leong KW, Guilak F, Crawford GE, Reddy TE, Gersbach CA. RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9- based transcription factors. *Nat Methods*, 2013, 10(10): 973–976. [DOI]
- [56] Chavez A, Scheiman J, Vora S, Pruitt BW, Tuttle M, P R Iyer E, Lin S, Kiani S, Guzman CD, Wiegand DJ, Ter-Ovanesyan D, Braff JL, Davidsohn N, Housden BE, Perrimon N, Weiss R, Aach J, Collins JJ, Church GM. Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nat Methods*, 2015, 12(4): 326–328. [DOI]
- [57] Li Z, Zhang D, Xiong X, Yan B, Xie W, Sheen J, Li JF. A potent Cas9-derived gene activator for plant and mammalian cells. *Nat Plants*, 2017, 3(12): 930–936. [DOI]
- [58] Liu XS, Wu H, Ji X, Stelzer Y, Wu X, Czauderna S, Shu J, Dadon D, Young RA, Jaenisch R. Editing DNA methylation in the mammalian genome. *Cell*, 2016, 167(1): 233–247. [DOI]
- [59] Liu P, Chen M, Liu Y, Qi LS, Ding S. CRISPR-based chromatin remodeling of the endogenous Oct4 or Sox2 locus enables reprogramming to pluripotency. *Cell Stem Cell*, 2018, 22(2): 252–261. [DOI]
- [60] Cano-Rodriguez D, Gjaltema RA, Jilderda LJ, Jellema P, Dokter-Fokkens J, Ruiters MH, Rots MG. Writing of H3K4Me3 overcomes epigenetic silencing in a sustained but context-dependent manner. *Nat Commun*, 2016, 7: 12284. [DOI]
- [61] Kearns NA, Pham H, Tabak B, Genga RM, Silverstein NJ, Garber M, Maehr R. Functional annotation of native enhancers with a Cas9-histone demethylase fusion. *Nat Methods*, 2015, 12(5): 401–403. [DOI]
- [62] Hilton IB, D'Ippolito AM, Vockley CM, Thakore PI, Crawford GE, Reddy TE, Gersbach CA. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(5): 510–517. [DOI]
- [63] Kwon DY, Zhao YT, Lamonica JM, Zhou Z. Locus-specific histone deacetylation using a synthetic CRISPR-Cas9-based HDAC. *Nat Commun*, 2017, 8: 15315. [DOI]
- [64] Mendenhall EM, Williamson KE, Reyon D, Zou JY, Ram O, Joung JK, Bernstein BE. Locus-specific editing of histone modifications at endogenous enhancers. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(12): 1133–1136. [DOI]
- [65] Naldini L. Gene therapy returns to centre stage. *Nature*, 2015, 526(7573): 351–360. [DOI]
- [66] Sinn PL, Sauter SL, McCray PB. Gene therapy progress and prospects: development of improved lentiviral and retroviral vectors--design, biosafety, and production. *Gene Ther*, 2005, 12(14): 1089–1098. [DOI]
- [67] Cavazzana-Calvo M, Payen E, Negre O, Wang G, Hehir K, Fusil F, Down J, Denaro M, Brady T, Westerman K, Cavallese R, Gillet-Legrand B, Caccavelli L, Sgarra R, Maouche-Chrétien L, Bernaudin F, Girot R, Dorazio R, Mulder GJ, Polack A, Bank A, Soulier J, Larghero J, Kabbara N, Dalle B, Gourmel B, Socie G, Chrétien S, Cartier N, Aubourg P, Fischer A, Cornetta K, Galacteros F, Beuzard Y, Gluckman E, Bushman F, Hacein-Bey-Abina S, Leboulch P. Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human β -thalassaemia. *Nature*, 2010, 467(7313): 318–322. [DOI]
- [68] Wickham TJ. Targeting adenovirus. *Gene Ther*, 2000, 7(2): 110–114. [DOI]
- [69] Kotterman MA, Schaffer DV. Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nat Rev Genet*, 2014, 15(7): 445–451. [DOI]
- [70] Jin S, Ye K. Nanoparticle-Mediated drug delivery and gene therapy. *Biotechnol Prog*, 2007, 23(1): 32–41. [DOI]
- [71] Ding Q, Strong A, Patel KM, Ng SL, Gosis BS, Regan SN, Cowan CA, Rader DJ, Musunuru K. Permanent

- alteration of PCSK9 with *in vivo* CRISPR-Cas9 genome editing. *Circ Res*, 2014, 115(5): 488–492. [DOI]
- [72] Pankowicz FP, Barzi M, Legras X, Hubert L, Mi T, Tomolonis JA, Ravishankar M, Sun Q, Yang D, Borowiak M, Sumazin P, Elsea SH, Bissig-Choisat B, Bissig KD. Reprogramming metabolic pathways *in vivo* with CRISPR/Cas9 genome editing to treat hereditary tyrosinaemia. *Nat Commun*, 2016, 7: 12642. [DOI]
- [73] Forget BG. Molecular basis of hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Ann Ny Acad Sci*, 1998, 850: 38–44. [DOI]
- [74] Thein SL. Molecular basis of β thalassemia and potential therapeutic targets. *Blood Cell Mol Dis*, 2017, 70: 54–65. [DOI]
- [75] Tsang JC, Yu Y, Burke S, Buettner F, Wang C, Kolodziejczyk AA, Teichmann SA, Lu L, Liu P. Single-cell transcriptomic reconstruction reveals cell cycle and multi-lineage differentiation defects in Bcl11a-deficient hematopoietic stem cells. *Genome Biol*, 2015, 16: 178. [DOI]
- [76] Bauer DE, Kamran SC, Lessard S, Xu J, Fujiwara Y, Lin C, Shao Z, Canver MC, Smith EC, Pinello L, Sabo PJ, Vierstra J, Voit RA, Yuan GC, Porteus MH, Stamatoyannopoulos JA, Lettre G, Orkin SH. An erythroid enhancer of BCL11A subject to genetic variation determines fetal hemoglobin level. *Science*, 2013, 342(6155): 253–257. [DOI]
- [77] Canver MC, Smith EC, Sher F, Pinello L, Sanjana NE, Shalem O, Chen DD, Schupp PG, Vinjamur DS, Garcia SP, Luc S, Kurita R, Nakamura Y, Fujiwara Y, Maeda T, Yuan GC, Zhang F, Orkin SH, Bauer DE. BCL11A enhancer dissection by Cas9-mediated *in situ* saturating mutagenesis. *Nature*, 2015, 527(7577): 192–197. [DOI]
- [78] Vierstra J, Reik A, Chang KH, Stehling-Sun S, Zhou Y, Hinkley SJ, Paschon DE, Zhang L, Psatha N, Bendana YR, O'Neil CM, Song AH, Mich AK, Liu PQ, Lee G, Bauer DE, Holmes MC, Orkin SH, Papayannopoulou T, Stamatoyannopoulos G, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, Stamatoyannopoulos JA. Functional footprinting of regulatory DNA. *Nat Methods*, 2015, 12(10): 927–930. [DOI]
- [79] Martyn GE, Wienert B, Yang L, Shah M, Norton LJ, Burdach J, Kurita R, Nakamura Y, Pearson RCM, Funnell APW, Quinlan KGR, Crossley M. Natural regulatory mutations elevate the fetal globin gene via disruption of BCL11A or ZBTB7A binding. *Nat Genet*, 2018, 50(4): 498–503. [DOI]
- [80] Ousterout DG, Kabadi AM, Thakore PI, Perez-Pinera P, Brown MT, Majoros WH, Reddy TE, Gersbach CA. Correction of dystrophin expression in cells from duchenne muscular dystrophy patients through genomic excision of exon 51 by zinc finger nucleases. *Mol Ther*, 2015, 23(3): 523–532. [DOI]
- [81] Ousterout DG, Kabadi AM, Thakore PI, Majoros WH, Reddy TE, Gersbach CA. Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for correction of dystrophin mutations that cause Duchenne muscular dystrophy. *Nat Commun*, 2015, 6: 6244. [DOI]
- [82] Li HL, Fujimoto N, Sasakawa N, Shirai S, Ohkame T, Sakuma T, Tanaka M, Amano N, Watanabe A, Sakurai H, Yamamoto T, Yamanaka S, Hotta A. Precise correction of the dystrophin gene in duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem Cell Reports*, 2015, 4(1): 143–154. [DOI]
- [83] Shin JW, Kim KH, Chao MJ, Atwal RS, Gillis T, MacDonald ME, Gusella JF, Lee JM. Permanent inactivation of Huntington's disease mutation by personalized allele-specific CRISPR/Cas9. *Hum Mol Genet*, 2016, 25(20): 4566–4576. [DOI]
- [84] Gao X, Tao Y, Lamas V, Huang M, Yeh WH, Pan B, Hu YJ, Hu JH, Thompson DB, Shu Y, Li Y, Wang H, Yang S, Xu Q, Polley DB, Liberman MC, Kong WJ, Holt JR, Chen ZY, Liu DR. Treatment of autosomal dominant hearing loss by *in vivo* delivery of genome editing agents. *Nature*, 2018, 553(7687): 217–221. [DOI]
- [85] Yin H, Xue W, Chen S, Bogorad RL, Benedetti E, Grompe M, Kotliansky V, Sharp PA, Jacks T, Anderson DG. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(6): 551–553. [DOI]
- [86] Shao Y, Wang L, Guo N, Wang S, Yang L, Li Y, Wang M, Yin S, Han H, Zeng L, Zhang L, Hui L, Ding Q, Zhang J, Geng H, Liu M, Li D. Cas9-nickase-mediated genome editing corrects hereditary tyrosinemia in rats. *J Biol Chem*, 2018, 293(18): 6883–6892. [DOI]
- [87] Guan Y, Ma Y, Li Q, Sun Z, Ma L, Wu L, Wang L, Zeng L, Shao Y, Chen Y, Ma N, Lu W, Hu K, Han H, Yu Y, Huang Y, Liu M, Li D. CRISPR/Cas9-mediated somatic correction of a novel coagulator factor IX gene mutation ameliorates hemophilia in mouse. *EMBO Mol Med*, 2016, 8(5): 477–488. [DOI]
- [88] Yang Y, Wang L, Bell P, McMenamin D, He Z, White J, Yu H, Xu C, Morizono H, Musunuru K, Batshaw ML,

- Wilson JM. A dual AAV system enables the Cas9-mediated correction of a metabolic liver disease in newborn mice. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(3): 334–338. [DOI]
- [89] Li H, Haurigot V, Doyon Y, Li T, Wong SY, Bhagwat AS, Malani N, Anguela XM, Sharma R, Ivanciu L, Murphy SL, Finn JD, Khazi FR, Zhou S, Paschon DE, Rebar EJ, Bushman FD, Gregory PD, Holmes MC, High KA. *In vivo* genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia. *Nature*, 2011, 475(7355): 217–221. [DOI]
- [90] Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819–823. [DOI]
- [91] Suzuki K, Tsunekawa Y, Hernandez-Benitez R, Wu J, Zhu J, Kim EJ, Hatanaka F, Yamamoto M, Araoka T, Li Z, Kurita M, Hishida T, Li M, Aizawa E, Guo S, Chen S, Goebel A, Soligalla RD, Qu J, Jiang T, Fu X, Jafari M, Esteban CR, Berggren WT, Lajara J, Nuñez-Delicado E, Guillen P, Campistol JM, Matsuzaki F, Liu GH, Magistretti P, Zhang K, Callaway EM, Zhang K, Belmonte JC. *In vivo* genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature*, 2016, 540(7631): 144–149. [DOI]
- [92] Yao X, Wang X, Hu X, Liu Z, Liu J, Zhou H, Shen X, Wei Y, Huang Z, Ying W, Wang Y, Nie YH, Zhang CC, Li S, Cheng L, Wang Q, Wu Y, Huang P, Sun Q, Shi L, Yang H. Homology-mediated end joining-based targeted integration using CRISPR/Cas9. *Cell Res*, 2017, 27(6): 801–814. [DOI]
- [93] Yao X, Wang X, Liu J, Shi L, Huang P, Yang H. CRISPR/Cas9-mediated targeted integration *in vivo* using a homology-mediated end joining-based strategy. *J Vis Exp*, 2018(133). [DOI]
- [94] Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 2016, 533(7603): 420–424. [DOI]
- [95] Billon P, Bryant EE, Joseph SA, Nambiar TS, Hayward SB, Rothstein R, Ciccio A. CRISPR-mediated base editing enables efficient disruption of eukaryotic genes through induction of STOP codons. *Mol Cell*, 2017, 67(6): 1068–1079.e4. [DOI]
- [96] Rossidis AC, Stratigis JD, Chadwick AC, Hartman HA, Ahn NJ, Li H, Singh K, Coons BE, Li L, Lv W, Zoltick PW, Alapati D, Zacharias W, Jain R, Morrissey EE, Musunuru K, Peranteau WH. In utero CRISPR-mediated therapeutic editing of metabolic genes. *Nat Med*, 2018, 24(10): 1513–1518. [DOI]
- [97] Ryu SM, Koo T, Kim K, Lim K, Baek G, Kim ST, Kim HS, Kim DE, Lee H, Chung E, Kim JS. Adenine base editing in mouse embryos and an adult mouse model of duchenne muscular dystrophy. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(6): 536–539. [DOI]
- [98] Villiger L, Grisch-Chan HM, Lindsay H, Ringnalda F, Pogliano CB, Allegri G, Fingerhut R, Häberle J, Matos J, Robinson MD, Thöny B, Schwank G. Treatment of a metabolic liver disease by *in vivo* genome base editing in adult mice. *Nat Med*, 2018, 24(10): 1519–1525. [DOI]
- [99] Liao HK, Hatanaka F, Araoka T, Reddy P, Wu MZ, Sui Y, Yamauchi T, Sakurai M, O'Keefe DD, Núñez-Delicado E, Guillen P, Campistol JM, Wu CJ, Lu LF, Esteban CR, Izpisua Belmonte JC. *In vivo* target gene activation via CRISPR/Cas9-mediated trans-epigenetic modulation. *Cell*, 2017, 171(7): 1495–1507.e15. [DOI]
- [100] Zhou H, Liu J, Zhou C, Gao N, Rao Z, Li H, Hu X, Li C, Yao X, Shen X, Sun Y, Wei Y, Liu F, Ying W, Zhang J, Tang C, Zhang X, Xu H, Shi L, Cheng L, Huang P, Yang H. *In vivo* simultaneous transcriptional activation of multiple genes in the brain using CRISPR-dCas9-activator transgenic mice. *Nat Neurosci*, 2018, 21(3): 440–446. [DOI]
- [101] Matharu N, Rattanasopha S, Tamura S, Maliskova L, Wang Y, Bernard A, Hardin A, Eckalbar WL, Vaisse C, Ahituv N. CRISPR-mediated activation of a promoter or enhancer rescues obesity caused by haploinsufficiency. *Science*, 2018, 363(6424): 231–243. [DOI]
- [102] Xu Y, Wu F, Tan L, Kong L, Xiong L, Deng J, Barbera AJ, Zheng L, Zhang H, Huang S, Min J, Nicholson T, Chen T, Xu G, Shi Y, Zhang K, Shi YG. Genome-wide regulation of 5hmC, 5mC, and gene expression by Tet1 hydroxylase in mouse embryonic stem cells. *Mol Cell*, 2011, 42(4): 451–464. [DOI]
- [103] Liu XS, Wu H, Krzisch M, Wu X, Graef J, Muffat J, Hnisz D, Li CH, Yuan B, Xu C, Li Y, Vershkov D, Cacace A, Young RA, Jaenisch R. Rescue of fragile X syndrome neurons by DNA methylation editing of the *FMR1* gene. *Cell*, 2018, 172(5): 979–992.e6. [DOI]
- [104] Haapaniemi E, Botla S, Persson J, Schmierer B, Taipale J. CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. *Nat Med*, 2018, 24(7): 927–930. [DOI]
- [105] Ihry RJ, Worringer KA, Salick MR, Frias E, Ho D, Theriault K, Kommineni S, Chen J, Sondey M, Ye C,

- Randhawa R, Kulkarni T, Yang Z, McAllister G, Russ C, Reece-Hoyes J, Forrester W, Hoffman GR, Dolmetsch R, Kaykas A. P53 inhibits CRISPR-Cas9 engineering in human pluripotent stem cells. *Nat Med*, 2018, 24(7): 939–946. [DOI]
- [106] Zuo E, Sun Y, Wei W, Yuan T, Ying W, Sun H, Yuan L, Steinmetz LM, Li Y, Yang H. Cytosine base editor generates substantial off-target single-nucleotide variants in mouse embryos. *Science*, 2019, 364(6437): 289–292. [DOI]
- [107] Jin S, Zong Y, Gao Q, Zhu Z, Wang Y, Qin P, Liang C, Wang D, Qiu JL, Zhang F, Gao C. Cytosine, but not adenine, base editors induce genome-wide off-target mutations in rice. *Science*, 2019, 364(6437): 292–295. [DOI]
- [108] Chu JY. Ethical issues that cannot be ignored in the development of genetics research. *Hereditas(Beijing)*, 2019, 41(5): 447–450.
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. [DOI]
- [109] David C. Japan set to allow gene editing in human embryos. *Nature*, news, 2018-10-03. [DOI]
- [110] Woods NB, Bottero V, Schmidt M, von Kalle C, Verma IM. Gene therapy: therapeutic gene causing lymphoma. *Nature*, 2006, 440(7088): 1123. [DOI]
- [111] Mavilio F, Ferrari G. Genetic modification of somatic stem cells. *EMBO Rep*, 2008, 9(1S): S64–S69. [DOI]
- [112] Lappé M. Ethical issues in manipulating the human germ line. *J Med Philos*, 1991, 16(6): 621–639. [DOI]
- [113] Jocelyn K. A human has been injected with gene-editing tools to cure his disabling disease. Here's what you need to know. *Science*, news, 2017-11-15. [DOI]
- [114] Boissel S, Jarjour J, Astrakhan A, Adey A, Gouble A, Duchateau P, Shendure J, Stoddard BL, Certo MT, Baker D, Scharenberg AM. MegaTALs: a rare-cleaving nuclease architecture for therapeutic genome engineering. *Nucleic Acids Res*, 2013, 42(4): 2591–2601. [DOI]
- [115] Beane JD, Lee G, Zheng Z, Mendel M, Abate-Daga D, Bharathan M, Black M, Gandhi N, Yu Z, Chandran S, Giedlin M, Ando D, Miller J, Paschon D, Guschin D, Rebar EJ, Reik A, Holmes MC, Gregory PD, Restifo NP, Rosenberg SA, Morgan RA, Feldman SA. Clinical scale zinc finger nuclease-mediated gene editing of PD-1 in tumor infiltrating lymphocytes for the treatment of metastatic melanoma. *Mol Ther*, 2015, 23(8): 1380–1390. [DOI]
- [116] Reik A, Holmes MC, Zhou Y, Mendel M, Liu PQ, Lee G, Paschon D, Rebar E, Ando D, DiGiusto D, Gregory PD, Jensen MC. Targeted killing of glioblastoma multiforme *in vivo* by IL-13 zetakine redirected CTLs made glucocorticoid resistant with zinc finger nucleases. *Blood*, 2007, 110: 2597. [DOI]

(责任编辑: 谷峰)