

DOI: 10.13376/j.cblls/2016053

文章编号: 1004-0374(2016)04-0420-07

· 特约综述 ·



周琪院士点评基因编辑工作

首先, 祝贺中山大学黄军就博士入选 *Nature* 杂志评选的 2015 年度全球十大科学人物。2015 年 4 月, 其研究团队首次利用基因编辑技术开展人早期胚胎的疾病治疗研究, 文章发表后立即引起国内外媒体的广泛关注。但是, 其中一些负面报道引发了对这项工作乃至中国科研伦理监管的质疑。实际上, 我们国家对早期胚胎的基因编辑研究有相应的伦理规范。这项研究经过了严格的伦理审查, 完全符合我国相关研究规范, 其研究内容和方法也会对人胚胎发育及其调控机制等领域产生重要影响, 是一项值得关注的、正面的研究工作。面对全球范围内相关的伦理讨论, 受科技部委托, 中国科学院“干细胞与再生医学研究”先导专项和中国细胞生物学学会干细胞生物学会共同组织了科技管理、伦理、生殖发育研究、辅助生殖、基因编辑技术研发、干细胞研究、动物模型、科技出版等领域的 20 余位专家进行研讨并达成共识, 建议国家和社会对基因编辑领域给予高度重视, 通过重点布局, 积极推动基因编辑技术研发及有重大医学转化前景的研究与应用, 同时通过规范管理为该领域的健康发展创造良好的国际和社会环境。2015 年 12 月初, 中国科学院与美国国家科学院、美国国家医学院和英国皇家学会于美国华盛顿共同举办了人类基因编辑国际峰会, 中方组委会成员积极参与了会议的组织 and 协调工作, 并借助会议平台介绍了我国在基因编辑领域的最新进展, 有力宣传了我国在该领域的科研管理制度和伦理规范, 澄清了国际上对我国人胚胎基因编辑研究的一些误解, 提高了我国科技界在这一领域的国际形象和影响力。希望经过不懈努力, 中国学术界能够不断提高在基因编辑研究领域的国际地位, 做出更多世界瞩目的重要工作, 使中国在世界范围内树立科研自信成为中国科学的常态。



黄军就, 博士, 中山大学生命科学学院基因工程教育部重点实验室和广东省生殖医学重点实验室副教授, 主要从事干细胞和早期胚胎基因组稳定性和衰老的调控及机理研究。在 *Stem Cells*、*Aging Cell*、*Cell Research*、*Nature* 等国际著名杂志发表细胞衰老和再生以及哺乳动物早期胚胎发育相关研究论文 25 篇, 总引用次数超 600 次。全球范围内首次尝试在人类胚胎中基因编辑修复地中海贫血遗传致病基因, 工作被 *Nature*、*Science*、中央电视台《新闻 30 分》等全球 100 多家媒体作为热点报道。2015 年被 *Nature* 评为全球年度十大科学人物, 被中国与全球化智库 (CCG) 评为“2015 年中国留学人员创新创业 50 人”。

收稿日期: 2016-04-06

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项(16lgzd13)

*通信作者: E-mail: hjunjiu@mail.sysu.edu.cn

推开人类胚胎基因研究的神秘大门

梁普平, 黄军就*

(中山大学生命科学学院, 基因工程教育部重点实验室和广东省生殖医学重点实验室, 广州 510006)

摘要: 人类基因组测序成功后, 人们翻开了隐藏自身秘密的蓝图, 而如何正确地解读和利用该蓝图成为全球科学家关注的焦点。基因编辑技术的飞跃式发展为基因组功能研究提供了关键性工具。目前常用的基因编辑技术包括 ZFN (zinc finger nuclease)、TALEN (transcription activator-like effector nuclease) 和 CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR-associated 9) 这三种系统, 而 CRISPR/Cas9 系统以其简单、高效和低成本等特点, 在极短的时间内被广泛地应用于从细菌到人等各个物种中, 为深入认识基因功能和治疗遗传性疾病带来了曙光。目前, 人们已经利用 CRISPR/Cas9 系统成功地在动物受精卵中进行基因编辑, 从而揭示动物胚胎发育的调控机制。此外, 通过在受精卵中对遗传疾病的突变位点进行编辑, 人们已经获得基因校正的正常的动物。大量的研究结果显示, 人类的胚胎发育机制有别于模式动物; 此外, 还有上千种单基因突变导致的遗传疾病在成年后无法进行有效的治疗。为了探讨 CRISPR/Cas9 系统是否能应用于人类早期胚胎发育调控机制的研究及遗传性疾病突变的有效修复, 通过尝试利用生殖临床中自然产生的、因无法正常发育而被废弃的三原核受精卵作为模型, 研究了 CRISPR/Cas9 系统在人类早期胚胎中对中国南方常见的地中海贫血突变位点的编辑效率以及存在的技术风险。研究结果显示 CRISPR/Cas9 系统可以在人三原核受精卵中编辑突变位点, 但目前的技术还存在脱靶效应、胚胎镶嵌性和同源重组效率低等问题。该研究工作推动了国际人类基因编辑峰会的召开, 最终, 科学界达成的共识认为在人类体细胞、胚胎及生殖细胞中进行基因编辑技术的基础研究是极其重要的。针对这一全球关注的重大科学研究事件进行回顾与展望。

关键词: 人类胚胎; 基因编辑; CRISPR/Cas9; 三原核受精卵

中图分类号: Q25; Q3 **文献标志码:** A

Open the secret door of gene study in human embryos

LIANG Pu-Ping, HUANG Jun-Jiu*

(Key Laboratory of Gene Engineering of the Ministry of Education and Guangdong Province Key Laboratory of Reproductive Medicine, School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: The success of human genome sequencing uncovered the blueprint of our lives. However, how to annotate and utilize this genomic information becomes a central issue for the scientists all over the world. Thanks to the rapid development of gene editing technology, including zinc finger nuclease (ZFN), transcription activator-like effector nuclease (TALEN), and clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated 9 (Cas9) system, the functional study on human genome has made great progress in recent years. Among them, CRISPR/Cas9 system is the most widely used genome editing tool that has been applied in a variety of species for ever since its debut, due to its simplicity, high efficiency and low cost. These advantages enable CRISPR/Cas9 system to be the most promising technology that helps to understand gene function thoroughly and wipe out genetic disease completely. Scientists have already tried to use CRISPR/Cas9 for studying the regulation mechanism of embryo development by genome editing, such as successfully correcting disease mutations in animal zygotes. However, human embryo development, as revealed by extensive studies, is quite different from animal models. In addition, thousands of human genetic diseases caused by single gene mutation cannot be cured at present. Therefore, we aim to explore the feasibility of studying human early embryo development and correcting disease mutations via CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human zygotes. To achieve this aim, we chose nonviable tripronuclear zygotes as the research model and tried to study the editing efficiency and technical risks of correcting β -thalassemia disease mutation, which is widely distributed among people in South China area. Our results showed that CRISPR/Cas9 can edit mutant gene efficiently in human tripronuclear zygotes. However,

notable off-target cleavages of Cas9 have also been observed. In addition, we found that gene-edited embryos are mosaic and the efficiency of homology-directed repair is low. Our work promoted the convening of international summit on Human Gene-Editing. During the meeting, scientists around the world reached a consensus that basic research on gene editing is extremely important for editing genetic sequences in human somatic cells, embryos and germ cells. Herein, we reviewed this worldwide-concerned science event.

Key words: human embryo; gene editing; CRISPR/Cas9; trippronuclear zygotes

1953年, James Watson 和 Francis Crick 发现的 DNA 双螺旋结构使得人类首次认识到生命载体的形态^[1]。随着基因组测序技术的快速发展,人们兴奋地认为通过全基因组测序就能揭示人类生命的奥秘。但在2001年人类基因组计划实施成功后,我们发现通过基因组测序,人类只是掌握了蕴藏生命奥秘的“密码本”,而该密码本只是由四种简单的脱氧核糖核苷酸 A、T、C、G 通过不同排列和修饰构成的。人们还是无法理解人是如何从一个受精卵细胞发育到由约 10^{13} 个细胞构成、包含复杂组织和器官结构的高级生命体,甚至无法深入地探究单个基因在个体发育中的功能和探讨是否可以通过修正基因信息从而治疗目前医学无法根治的遗传性疾病。近年来飞速发展的基因编辑工具,包括 ZFN、TALEN 和 CRISPR/Cas9 系统,为研究基因功能和建立遗传疾病模型带来了前所未有的机遇。CRISPR/Cas9 系统以其简单、高效和低成本等优势,自2013年张峰和 George Church 发表论文显示其在哺乳动物细胞中高效编辑基因后,被迅速地应用到各种模式动物、植物和微生物中进行基因功能的研究^[2-7]。CRISPR/Cas9 是一种由 RNA 指导 (gRNA) 特异识别靶向基因, Cas9 核酸酶对靶点进行切割的编辑技术,其起源是细菌和古细菌为应对病毒不断攻击而演化来的获得性免疫防御机制。利用该技术,我国科学家做出了许多世界瞩目的重要工作,包括周琪院士、刘明耀教授和李大力研究员团队首次制备基因修饰大鼠^[8-9],周琪院士团队首次制备了基因修饰猪^[10],沙家豪研究员、季维智研究员、黄行许教授合作和周琪院士参与首次制备基因修饰猴子等^[11]。李劲松研究员团队进一步利用 CRISPR/Cas9 系统在小鼠受精卵中修正了白内障致病基因^[12],为治疗遗传性疾病提供了重要的研究基础。

基因修饰模式动物的建立极大地促进了人们对基因功能的认识,但大量的研究结果显示,人类的发育过程和基因调控机制与现今常用的动物模型还存在显著的差异。如人类早期胚胎基因组的激活时间和胚胎发育过程都有自身的特点。据报道,100

个受精卵,只有约 50 个可进入早期囊泡阶段,约 25 个能成功着床,最终有约 13 个可发育超过 3 个月^[13]。而不同物种早期胚胎发育和调控的差异性也是科学界一直难以分离培养真正的猪胚胎干细胞和牛胚胎干细胞的原因之一,也是目前胚胎干细胞领域想弄清楚为什么同样从囊胚期分离的胚胎干细胞,人的胚胎干细胞是处于始发态 (Primed) 而小鼠胚胎干细胞则处于原始态 (Naive)。此外,在人类中有 3 000 多个基因的突变会导致 4 000 多种遗传性疾病的发生,而许多遗传疾病在成年人中无法通过药物进行有效的干预和治疗。随着基因编辑技术的发展,尤其是 CRISPR/Cas9 技术的出现,是否有可能利用基因编辑技术在早期胚胎中进行基因修饰,从而研究早期发育中关键基因的调控功能和通过修正突变位点避免遗传疾病的发生?

试管婴儿技术自 1978 年发展至今,造福了成千上万个家庭。由于环境等因素的影响,现今利用该技术获得后代的人群越来越多。在试管婴儿临床中,2%~5% 的卵子由于异常受精而形成了三原核受精卵。三原核受精卵一般可以进行若干次的细胞分裂,但极少部分能发育到囊胚阶段,由于无法发育成正常的胎儿,一般在试管婴儿临床中被丢弃^[14]。从科学研究的角度来看,三原核受精卵由于没有伦理问题,是一种模拟正常早期胚胎发育的极佳材料。因此,CRISPR/Cas9 技术和三原核受精卵模型的结合为本课题组探究早期胚胎发育奥秘提供了新的机会。

1 全球首次人类胚胎致病基因编辑工作回顾

地中海贫血是对广东、广西地区影响最严重的致命性遗传性疾病(携带率分别为 8.3% 和 2.6%),已经成为患者家庭及社会的沉重负担。地中海贫血主要由于编码 α 或 β 球蛋白的基因异常突变,从而引发红细胞功能异常,这也是早期南方人群对抗疟疾感染的自然筛选结果。重型地中海贫血会导致患儿死亡,部分中间型患者在几岁到十几岁的时候也会死亡,除了长期输血和骨髓移植外,目前临床尚

没有其他有效的治疗方法。移植前基因诊断技术 (preimplantation genetic diagnosis, PGD) 是目前帮助地中海贫血患者获得健康后代的主要手段, 因此, 本生殖中心在地中海贫血的 PGD 领域有着悠久的历史。当时国际上也有声音说: 基因编辑技术是否可以用于治疗一些遗传疾病? 本课题组认为存在这种可能性, 但风险未知。所以, 当时希望以地中海贫血这个疾病作为基础研究的切入点, 利用废弃的三原核受精卵作为模型, 研究利用基因编辑技术在早期胚胎修饰地中海贫血致病基因的可能性和风险。本研究于 2013 年下半年形成清晰和合理的思路和方案, 2013 年 12 月根据中国《人类辅助生殖技术管理办法》和《人胚胎干细胞研究伦理指导原则》的要求经过相关的医学伦理委员会的伦理审查获得批准实施。

临床中, β -地中海贫血症主要是由于 *HBB* 基因的突变导致^[15]。*HBB* 基因位于 11 号染色体的 β 球蛋白基因簇中, 该基因簇中还包含了 *HBE*、*HBG2*、*HBG1*、*HBD* 四个基因, 其中 *HBD* 的碱基序列与 *HBB* 的序列高度相似。在广东省, 最常见的 *HBB* 突变有 CD14/15 (+G)、CD17 (AAG> TAG) 和 CD41/42 (-TTCT) 位点突变^[16]。通过细胞实验, 本课题组设计和筛选了能在人 293T 细胞中特异打靶和介导精准同源修复的 gRNA 和单链 DNA 修复模板。然后, 将 GFP mRNA、*Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpCas9) mRNA、gRNA 和单链 DNA 修复模板共注射到 86 个人三原核受精卵中。注射 24 h 后, 发现有 71 个胚胎存活。注射 48 h 后, 将 59 个 GFP 荧光阳性的 1~8 细胞期的胚胎收集起来, 并对其进行全基因组扩增和 *HBB* 打靶位点的序列分析。本课题组成功地将 54 个胚胎的 *HBB* 位点扩增出来, 其中 28 个胚胎的 *HBB* 靶位点得到有效的修改, 但只有 4 个胚胎 (14.3%) 中的部分卵裂球细胞的 *HBB* 位点能够以单链 DNA 为模板精确地修饰 *HBB* (2%~12%)。另外, 7 个胚胎 (25%) 中部分卵裂球细胞基因组 *HBB* 位点与 *HBD* 位点之间发生了同源重组修饰。而大部分的胚胎 (19 个, 67.9%) 仅仅通过非同源末端连接的方式修饰了 *HBB* 位点。这些数据表明, 本研究首次证明了在人类早期胚胎中, CRISPR/Cas9 系统能高效地打靶目标基因, 但修饰机制主要以非同源重组为主, 部分同源性内源基因序列以及人工设计的单链 DNA 模板能介导同源重组修饰, 但效率不高; 由于 Cas9 蛋白和 gRNA 的半衰期较长, 使得其在受精卵第一次有丝分裂后

依然能够保持核酸酶活性, 容易在卵裂后的不同卵裂球中对基因组靶基因进行切割从而产生不同的修饰, 形成镶嵌性的胚胎, 即马赛克现象 (Mosaicism)^[17-18]; 通过外显子测序和 T7 内切核酸酶实验发现, 目前的 CRISPR/Cas9 系统在早期胚胎中打靶还存在明显脱靶效应, 在 293T 细胞中通过 T7 内切核酸酶实验没有发现脱靶效应^[18]。这些结果提示了目前的 CRISPR/SpCas9 系统虽然能介导致病的遗传基因的精准修饰, 但目前的体系还存在效率低和脱靶等重大风险^[18]。对于在 293T 细胞中未检测到脱靶, 而在三原核胚胎中出现脱靶效应, 本课题组认为有可能存在以下三点原因。(1) 导入三原核受精卵中的 gRNA-Cas9 蛋白复合物的浓度高于 293T 细胞。在前面的研究中, 2 μ g 质粒被转染到 $\sim 2 \times 10^6$ 个 293T 细胞中, 而后面的研究是通过显微注射将 100 ng/ μ L Cas9 mRNA 和 20 ng/ μ L gRNA 注射到人三原核受精卵中。(2) 三原核受精卵本身的内在特征导致更容易脱靶。由于三原核受精卵是 3 倍体, 并且在分裂的过程中基因组也不能保持稳定, 表观遗传学上也与细胞系以及正常胚胎不同^[19-20], 这都可能导致 CRISPR/Cas9 的脱靶增加。(3) 野生型 SpCas9 的特异性不够。最近, 张锋和 Keith Joung 课题组分别在 *Science* 和 *Nature* 上发布了特异性更高的 eSpCas9 和 SpCas9-HF1, 这两个 Cas9 的突变体通过降低与 DNA 的非特异性结合, 从而提高 CRISPR/Cas9 的特异性^[21-22]。

通过对 *HBB* 与 *HBD* 的重组模式的分析, 本课题组发现, *HBB* 与 *HBD* 在同源重组的时候, 并没有发生交叉互换, 说明在三原核受精卵中, 同源重组主要是通过无交叉互换的机制进行^[23]。当 *HBB* 位点与单链 DNA 模板之间发生同源重组时, 部分 *HBB* 位点只复制了来自于单链 DNA 模板的 6 个沉默突变中的 4 个。这些数据提示, *HBB* 位点与单链 DNA 模板之间的同源重组很有可能是通过合成依赖性的链退火机制 (synthesis-dependent strand annealing, SDSA) 进行^[23-24]。这些结果有助于深入了解在早期胚胎中同源重组修复的机制。

2 研究工作在全球科学界和社会反响

本研究工作分别在 2014 年 9 月和 11 月投稿到 *Nature* 和 *Science* 杂志, 最后在 2015 年 4 月投稿到由高等教育出版社、中国科学院北京生命科学研究院和中国生物物理学会联合创办, 饶子和院士担任主编的国际期刊 *Protein & Cell* 杂志并被发表。由

于在 2015 年 3 月, *MIT Technology Review* 发表了一篇名为“Engineering the Perfect Baby”的文章, 国际顶尖学术期刊 *Nature* 和 *Science* 杂志皆发表评论性文章, 呼吁科学家们暂时不要进行人类胚胎 DNA 编辑的研究^[25-26]。因此, 科学界和社会大众对本课题组 2015 年 4 月发表的文章非常关注。*Nature* 科技记者通过周琪院士联系本课题组介绍工作情况, 本课题组认为发表在三原核胚胎中的研究数据能让大家更直接地了解在胚胎中对致病基因进行基因编辑的可能性和存在的重大风险。哈佛医学院干细胞生物学家 George Daley 在 *Nature* 新闻评论说: “我相信这是第一次报告将 CRISPR/Cas9 应用于人类植入前胚胎, 就其本身而论这项研究是一个里程碑的事件。对于那些认为已做好准备测试这一技术来清除致病基因的医生而言, 这一研究应该是向他们发出的一个严正警告”。2015 年 4 月, *Nature* 杂志再次发表社论, 称“当下正是对‘编辑人类生殖细胞’这一议题展开公开辩论的大好时机”, 鼓励包括科学界、生物伦理学界、监管机构和民间团体共同讨论编辑人类基因组技术^[27]。随后, 包括 *Nature*、*Science*、*New York Times*、*MIT Technology Review*、*BBC*、新华网、人民网、科技日报、凤凰网和广州日报等全球 100 多家媒体对本课题组的工作进行了热点报道和讨论。论文的网络影响力 (Altmetric score) 统计分析显示, 该研究在历史发表的 400 多万篇论文中排名第 143 位, 在 2015 年所发表的约 14 万篇论文中排名第 17 位。

2015 年 12 月初, 世界上基因研究领域的顶尖学者聚集在华盛顿, 召开了为期 3 天的由美国国家科学院、美国国家医学院、中国科学院和英国皇家学会共同举办的人类基因编辑国际峰会^[28]。参与峰会的学者通过充分的科学讨论, 最后对人类基因编辑得出以下共识。在适当的法律规范、伦理准则的规制下, 深入的基础和临床前研究应该从以下几个方面进行: (1) 在人类细胞中编辑基因序列的技术的研究; (2) 临床应用所带来的潜在益处和风险的研究; (3) 人类胚胎及生殖细胞的生物学研究。同时, 对基因编辑的早期人类胚胎以及生殖细胞不得用于妊娠达成共识^[28-30]。我国参会的周琪院士指出, 针对本课题组研究的提问, 国际峰会主席 David Baltimore 主动站出来回答说: “首先中国的这项工作符合中国的法律, 符合中国的管理条例, 也是符合中国的伦理管理条例的”, 是正当合理合法的, 所以类似的工作在声明里是不受禁止的。该会议也

是自 1975 年, 阿西洛玛 (Asilomar) 会议围绕 DNA 重组技术的生物安全性展开了激烈的讨论后, 科学界自发组织的第二次全球范围内对新型革命性科学技术的科学研究讨论。2015 年底, *Nature* 杂志因为该工作的重要性, 将黄军就博士评选为全球年度十大科学人物^[31]。*Nature* 的特约主编 Helen Pearson 表示: “经 *Nature* 记者和编辑大量讨论后选定的这十个来自全球各地的人, 他们在从气候变化到基因编辑再到研究可重复性等一系列话题中起到了重要的作用。”

2016 年 2 月 1 日, 英国人类生育与胚胎学管理局 (Human Fertilisation and Embryology Authority, HFEA) 批准 Francis Crick 研究所的分子生物学家 Kathy Niakan 领导的团队用 CRISPR/Cas9 编辑人类胚胎, 用于早期胚胎发育调控研究, 为深入了解健康人类胚胎受精和发育机制, 提高体外受精 (*in vitro* fertilization, IVF) 成功率和减少流产提供理论基础。*Nature*、*Science* 等国际媒体做了重点报道, 这也意味着“人类胚胎编辑”科学研究的时代即将开启^[32]。2016 年 4 月 6 号, 广州医科大学的范勇课题组报道, 利用 CRISPR/Cas9 和单链 DNA 在人三原核胚胎中修饰艾滋病病毒 (HIV) 的主要受体之一 CCR5 蛋白的基因, 并获得了在北欧人中才存在的 CCR5 Δ 32 突变型等位基因胚胎。尽管他们的研究也发现了经过修饰的胚胎存在马赛克现象, 但也为人类抵抗 HIV 感染提供了新的潜在途径^[33]。

3 人类胚胎编辑研究困难与挑战

首先, 国际峰会表示各国有权在其管辖范围内监管人类胚胎和生殖细胞相关基因编辑的基础研究活动, 但需要各国对人类胚胎编辑研究方面的政策和伦理准则进行细化。科学界和社会大众在面对试管婴儿技术、胚胎克隆技术、人兽混合胚胎研究技术和“三亲线粒体”婴儿等等影响重大的前沿科学技术的伦理边界问题都有着非常丰富的经验并制定了相关的政策方针, 从而保证新技术能在最大程度上为增加人类的知识和改善人类的健康做贡献。在国际社会的共同努力下, 相信胚胎编辑技术也必将遵循着合理的方向健康地发展。

此外, 人类胚胎编辑技术在治疗遗传性疾病的适用症方面还有待深入的探讨。本课题组对地中海贫血遗传突变位点修复情况的研究发现, 内源相似度高的序列会被作为模板进行修复, 增加新的不确定突变。约翰·霍普金斯大学的医学史学家 Nathaniel

Comfort 指出, 如果在胚胎中删掉如 CCR5 基因, 虽然可以让后代免疫艾滋病病毒, 但也让他们死于西尼罗河病毒的风险升高 13 倍^[34]。这些例子表明无论是修复遗传性突变或是沉默特定疾病相关的高风险基因, 由于对基因在胚胎中的同源重组机制以及基因在个体发育的系统水平的影响尚不清楚, 因此还无法判断其风险。目前比较有可能尝试的疾病是双亲都是由基因突变(如 *GJB2*、*GJB3* 等基因)导致的纯合隐性遗传突变耳聋患者^[35-36]。如果相同基因突变的聋哑人一起组织家庭, 其后代必然是纯合的耳聋患者。先天性耳聋严重影响了患者的生存质量, 而目前尚无有效的治疗方法。随着技术的进步, 如果受精卵基因编辑的效率和安全性得到显著的提升, 将来也许可以通过该方法使得这些患者的后代恢复听力, 化解他们的病痛和心理上的伤痛。此外, 虽然 PGD 技术可以筛选出健康的胚胎, 但如果双方都是疾病基因携带者的话, 理论上获得没有遗传疾病基因携带的正常胚胎的概率只有 25%, 但是由于种种未被揭示的原因, 就算是正常的胚胎在体外受精以及在体内的发育效率都很低。哈佛大学医学院的 George Daley 举例说, 基因缺陷导致一些 NEMO 缺陷综合征患儿的免疫系统异常衰弱。年龄较大的患儿家属会尝试再生一个健康的孩子, 用其部分骨髓细胞来治疗患儿。George Daley 及其同事在 8 个患儿家庭中尝试利用 PGD 技术获得健康宝宝, 但尽管每个家庭平均尝试了 5 次 IVF, 仅有一家生出了宝宝^[34]。这也说明植入前遗传学诊断也不是解决遗传病和获得健康后代的万能药^[34]。

尽管基因编辑胚胎的方法在将来能为部分遗传病适应症的患者带来曙光, 但目前基因编辑技术系统还远远没有达到临床前实验的要求。首先, 本课题组的文章显示目前的 CRISPR/Cas 系统在早期胚胎中还存在严重的脱靶效应, 这是因为 CRISPR/Cas9 作为细菌和古细菌的获得性免疫系统^[37], 需要对 RNA-DNA 的错配有一定的容忍度, 才能适应噬菌体基因组的变异。最近, 张锋课题组和 Keith Joung 课题组分别通过定点突变改造 Cas9 蛋白的方法, 获得了在人细胞中靶向特异性更高的突变核酸酶, 但这些酶在人类早期胚胎系统中是否同样有着高特异性, 还需要更多的研究^[21-22]。其次是由于 Cas9 mRNA 和蛋白能在胚胎中稳定地存在一段时间, 随着细胞分裂的进行, Cas9 酶在不同胚胎卵裂球中对基因组靶基因的切割和修复的情况不同, 从而形成镶嵌性的胚胎。只有通过精准地控制酶活性

的时间, 实现仅仅在单细胞中的基因修饰才能避免镶嵌性胚胎的产生。最后, 胚胎中 DNA 损伤修复机制中, 同源重组的效率不高, 从而妨碍了利用该原理定点修复遗传突变位点的应用。已有的报道显示, 可以通过抑制非同源重组的机制和促进同源重组的发生来提高同源重组效率^[38-39], 但这些方法目前还没有在人类胚胎系统中得以证实。

4 人类胚胎编辑研究展望

华盛顿人类基因编辑峰会以及英国批准人类胚胎基因编辑研究等事件, 都说明了基因编辑技术在人类细胞及胚胎中的研究将促进人类对自身发育奥秘的理解, 促进人类健康, 改善人类福祉。利用基因编辑技术可以快速地了解重要调控基因在人类着床前胚胎的调控功能和机制, 如关键性的调控基因 Oct4、Sox2 等的角色, 端粒是如何在早期囊胚发育过程中通过重组机制延伸从而保证人类个体的寿命长度, 早期胚胎第一次细胞分化发生的调控机制等。此外, 通过基因编辑技术, 可以模拟新生突变 (*de novo mutation*) 的发生, 深入地理解重大遗传性疾病发生发展的机制以及在着床前胚胎中 DNA 修复的调控方式。最后, 针对遗传疾病致病基因的靶向修复研究, 为未来利用基因编辑技术治疗遗传性疾病和降低特定疾病的致病风险储备技术和积累经验。目前已经成功地推开人类胚胎基因研究的神秘大门, 后面需要整个国际社会和科学界的努力, 为探索生命的奥秘以及造福人类社会贡献力量。

[参 考 文 献]

- [1] Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 1953, 171: 737-38
- [2] Chang N, Sun C, Gao L, et al. Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos. *Cell Res*, 2013, 23: 465-72
- [3] Ding Q, Regan SN, Xia Y, et al. Enhanced efficiency of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with CRISPRs. *Cell Stem Cell*, 2013, 12: 393-4
- [4] Friedland AE, Tzur YB, Esvelt KM, et al. Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. *Nat Methods*, 2013, 10: 741-3
- [5] Hwang WY, Fu Y, Reyon D, et al. Heritable and precise zebrafish genome editing using a CRISPR-Cas system. *PLoS One*, 2013, 8: e68708
- [6] Jiang W, Bikard D, Cox D, et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 233-9
- [7] Li JF, Norville JE, Aach J, et al. Multiplex and homologous

- recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 688-91
- [8] Li D, Qiu Z, Shao Y, et al. Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 681-3
- [9] Li W, Teng F, Li T, et al. Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 684-6
- [10] Hai T, Teng F, Guo R, et al. One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. *Cell Res*, 2014, 24: 372-5
- [11] Niu Y, Shen B, Cui Y, et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*, 2014, 156: 836-43
- [12] Wu Y, Liang D, Wang Y, et al. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell*, 2013, 13: 659-62
- [13] Jones GM, Trounson AO, Lolatgis N, et al. Factors affecting the success of human blastocyst development and pregnancy following in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril*, 1998, 70: 1022-9
- [14] Munne S, Cohen J. Chromosome abnormalities in human embryos. *Hum Reprod Update*, 1998, 4: 842-55
- [15] Schechter AN. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood*, 2008, 112: 3927-38
- [16] Cao A, Galanello R. Beta-thalassemia. *Genet Med*, 2010, 12: 61-76
- [17] Wang H, Yang H, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, 153: 910-8
- [18] Liang P, Xu Y, Zhang X, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human trippronuclear zygotes. *Protein Cell*, 2015, 6: 363-72
- [19] Chen X, Fan Y, Long X, et al. Similar DNA methylation and histone H3 lysine 9 dimethylation patterns in trippronuclear and corrected bipronuclear human zygotes. *J Reprod Dev*, 2010, 56: 324-9
- [20] Xu Y, Zhang JJ, Grifo JA, et al. DNA methylation patterns in human trippronucleate zygotes. *Mol Hum Reprod*, 2005, 11: 167-71
- [21] Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*, 2016, 529: 490-5
- [22] Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, et al. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*, 2016, 351: 84-8
- [23] Ciccica A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell*, 2010, 40: 179-204
- [24] Moynahan ME, Jasin M. Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11: 196-207
- [25] Baltimore BD, Berg P, Botchan M, et al. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science*, 2015, 348: 36-8
- [26] Lanphier E, Urnov F, Haecker SE, et al. Don't edit the human germ line. *Nature*, 2015, 519: 410-1
- [27] Cyranoski D, Reardon S. Embryo editing sparks epic debate. *Nature*, 2015, 520: 593-4
- [28] Reardon S. Global summit reveals divergent views on human gene editing. *Nature*, 2015, 528: 173
- [29] Committee on Science, Technology, and Law; Policy and Global Affairs; National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. International summit on human gene editing: A global discussion. Washington (DC): National Academies Press (US), 2016
- [30] Travis J. Embryo editing to make babies would be 'irresponsible,' says DNA summit statement. *Science*, 2015
- [31] Tollefson J, Cyranoski D, Witze A, et al. 365 days: Nature's 10. *Nature*, 2015, 528: 459-67
- [32] Callaway E. UK scientists gain licence to edit genes in human embryos. *Nature*, 2016, 530: 18
- [33] Kang X, He W, Huang Y, et al. Introducing precise genetic modifications into human 3PN embryos by CRISPR/Cas-mediated genome editing. *J Assist Reprod Genet*, 2016[Epub ahead of print]
- [34] Yong E. What can you actually do with your fancy gene-editing technology? *The Atlantic*, 2015, 12
- [35] Kelley PM, Harris DJ, Comer BC, et al. Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *Am J Hum Genet*, 1998, 62: 792-9
- [36] Lopez-Bigas N, Olive M, Rabionet R, et al. Connexin 31 (GJB3) is expressed in the peripheral and auditory nerves and causes neuropathy and hearing impairment. *Hum Mol Genet*, 2001, 10: 947-52
- [37] Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, 2010, 327: 167-70
- [38] Chu VT, Weber T, Wefers B, et al. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 543-8
- [39] Maruyama T, Dougan SK, Truttmann MC, et al. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 538-42