

DOI: 10.13376/j.cbbs/2018122

文章编号: 1004-0374(2018)09-1019-11



于建荣, 研究员, 中国科学院上海生命科学信息中心主任、上海市科技情报学会副理事长、上海市图书馆行业协会副会长等, 主要从事生命科学及相关学科领域的战略情报和学科情报研究。近三年来, 作为项目负责人和课题负责人承担科技部、中国科协、中国科学院、上海市科委等相关部委的项目/课题十余项, 作为主要研究人员参与项目/课题十余项。

CRISPR基因编辑技术发展态势分析

王慧媛¹, 范月蕾¹, 褚鑫², 于建荣^{1*}

(1 中国科学院上海生命科学信息中心, 上海 200031; 2 中国科学院重大科技任务局, 北京 100864)

摘要: 近年来, 以 CRISPR 为代表的基因组编辑技术发展迅速, 围绕该技术的一系列基础和应用研究成为全球研究热点。现基于 Web of Science 信息检索平台中的 SCI-Expanded 来源数据库, 结合文献计量、重要进展以及相关的伦理讨论, 对 CRISPR 为代表的基因组编辑技术发展态势进行分析, 为相关研究提供参考。

关键词: 基因编辑; CRISPR; 文献计量; 伦理

中图分类号: G353; Q78 **文献标志码:** A

Trends and development analysis of genome editing technology focusd on CRISPR

WANG Hui-Yuan¹, FAN Yue-Lei¹, CHU Xin², YU Jian-Rong^{1*}

(1 Shanghai Information Center of Life Science, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China;

2 Bureau of Major R&D Programs, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100864, China)

Abstract: In recent years, new genome editing technologies based on novel and efficient DNA targets have been widely applied in different biological and life science research area, especially the clustered regulatory interspaced short palindromic repeats CRISPR/Cas-based RNA-guided DNA endonucleases (CRISPR/Cas). In this paper, based on SCI-Expanded database in Web of Science, trend and development of genome editing technology research focused on CRISPR are analyzed through bibliometric methods.

Key words: genome editing; CRISPR; bibliometric; ethic

自 2013 年首次报道 CRISPR/Cas9 系统在哺乳动物基因编辑中的应用以来, 以 CRISPR 为代表的

基因编辑技术受到了源源不断的高度关注。在过去的 5 年里, “魔剪” CRISPR 以其廉价、快捷、便利

收稿日期: 2018-06-20

基金项目: 中国科学院学部研究项目“基因编辑伦理问题研究(Y719I2A001)”

*通信作者: E-mail: jryu@sibs.ac.cn

的优势，迅速席卷全球各地实验室，为生命科学研究领域带来了暴风骤雨般的改变。CRISPR 技术分别在 2012、2013 和 2015 年 3 次入选 *Science* 评选的“世界十大科学突破”，相关研究人员被视为诺贝尔奖的有力竞争者。科学家 Jennifer Doudna 和 Emmanuelle Charpentier 因发现 CRISPR/Cas9 系统于 2015 年 4 月入选美国《时代周刊》发布的 2015 年全球最具影响力 100 人名单；此后，又分别于 2016 年获得美国沃伦·阿尔珀特奖基金会 (Warren Alpert Prize Foundation) 颁发的沃伦·阿尔珀特奖，于 2017 年获得日本国际科学技术财团颁发的“日本国际奖”。2017 年 8 月，美国最著名的医学大奖 Albany Medical Center Prize in Medicine and Biomedical Research 2017 年获奖名单揭晓，包括张锋、Jennifer Doudna、Emmanuelle Charpentier 在内的 5 位科学家获奖。

1 CRISPR 基因编辑技术发展及其重要意义

CRISPR 是一类广泛分布于细菌和古菌基因组中的重复结构。研究表明，CRISPR 与一系列相关蛋白、前导序列一起，能为原核生物提供对抗噬菌体等外源基因的获得性免疫能力。这种结构的作用机理可能与真核生物的 RNA 干扰过程类似，最早于 1987 年在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) K12 的 *iap* 基因侧翼序列中被发现^[1]。21 世纪初，CRISPR 位点附近高度保守的 Cas 基因 (CRISPR-associated genes) 引起了研究者关注。Cas 基因是一类基因家族，编码的蛋白具有核酸结合功能和核酸酶、聚合酶、解旋酶等活性。2005 年，得益于病毒、质粒测序数据的日益丰富，通过对测序数据的系统分析，研究者推测间隔序列可能与外来的病毒、质粒有关。通过一系列的研究，人们认识到 Cas 基因可以与 CRISPR 序列协同作用，使细菌对病毒具有获得性免疫功能，而间隔序列则编码引导 Cas 蛋白定位的向导 RNA 的部分区段。2007 年 3 月，Rodolphe 等^[2]发现，CRISPR 与 Cas 构成的 CRISPR/Cas 系统能够使细菌抵抗噬菌体，从而免受病毒和质粒侵害。之后，研究人员逐步探明了 CRISPR/Cas 系统详细的免疫机制，为 CRISPR/Cas 系统发展成为通用的 RNA 介导的可编程 DNA 核酸内切酶铺平了道路^[3]。2012 年 8 月，加州大学伯克利分校的 Jennifer Doudna 和德国马普学会的 Emmanuelle Charpentier 领导的研究团队在 *Science* 杂志上发表文章正式提出，利用 RNA 介导 CRISPR/Cas9 系统可实现基因编辑，

CRISPR/Cas9 系统可作为基因编辑工具^[4]。2013 年初，麻省理工大学张锋研究团队的研究成果首次证明了 CRISPR/Cas 系统能用于哺乳动物细胞基因的编辑^[5-6]。随后，CRISPR/Cas 基因编辑技术成为生物技术领域最大“宠儿”，科学家纷纷在细菌、斑马鱼、小鼠、哺乳动物以及水稻和小麦^[7]等各种生物系统中验证其有效性，并实现了对猴基因的精确编辑，提示了该技术进行人基因编辑的可能性^[8]。2015 年，CRISPR 技术首次应用于人类胚胎，引起了极大的伦理与安全问题讨论^[9]。2016 年 10 月，全球首个 CRISPR 技术的人体临床试验在中国启动。2017 年 6 月，美国 NIH 也批准了临床试验课题，利用 CRISPR/Cas9 技术来编辑患者体内提取的免疫 T 细胞基因，用以治疗癌症。截至目前，该技术的相关研究与应用仍然如火如荼地进行，已经有大量科学研究证实其在快速解析基因功能及基因间的相互作用、定向育种、构建疾病模型等方面效果显著，尤其是在基因治疗和疾病研究方面显示出强大的应用潜力。

1.1 从技术角度，CRISPR 相比同类型技术具有显著优势

相比于 ZFN 与 TALEN 等以往的基因编辑技术，CRISPR 具有无法替代的优势，包括良好的特异性、可用位置更多、使用范围广、更具有可拓展性、使用方便、步骤简单、成本低廉等。CRISPR 是细菌中天然存在的 RNA 干扰系统，非人工核酸酶技术，仅需构建与靶序列互补的短 RNA，简单、廉价、剪切效率高；对靶位点序列的要求最低，适用性好；适用于多基因、高通量的操作；能对生殖细胞进行改造。同时，利用 CRISPR 技术开发的最终产品中不存在外源 DNA，也就不会生成外源蛋白质。当用于农业领域的作物育种时，育种效率大为提高，与转基因技术需要引入外源 DNA 不属于同一个概念，美国农业部也认为这类通过 CRISPR/Cas 育种技术开发的下一代产品不属于“应当受美国农业部生物技术法规服务局监管的范畴”，因而在技术的市场推广上更加便利。

1.2 从产业角度，CRISPR 展现出巨大的应用潜力与市场前景

CRISPR 技术具有商业化应用潜力，已在农业、工业、医疗等多个领域发挥重要的作用。许多市场研究公司都对包括 CRISPR/Cas 在内的基因编辑技术的市场前景进行了预测，应用领域包括人类治疗、研究工具开发、作物改良及原料、食品开发等。

Research and Markets 的报告预计,2015—2022 年间,基因编辑市场的复合年增长率将达到 31.1%,北美市场将占据基因编辑技术最大的市场;其次是亚洲,有赖于“政府在研究、经济繁荣、尽早采用新技术、宽松的监管环境”;基于研究的监管环境和经济危机下缓慢的增长速度,欧洲预计是第三大应用市场^[10]。Markets and Markets 市场研究公司预计,全球基因编辑市场将从 2016 年的 28.4 亿美元增长到 2019 年的 55.4 亿美元,复合年增长率为 14.3%^[11]。美国市场研究公司 Grand View Research 公司也于 2017 年 2 月发布报告称,全球基因编辑市场到 2050 年将达到 81 亿美元。到 2019 年,CRISPR 技术将是基因编辑技术市场中发展最快也是市场覆盖最广的技术^[12]。

1.3 从社会角度,CRISPR 将为更多人提供更健康、更优质的产品

CRISPR 基因编辑技术在健康、农业等多个领域都展现出巨大的应用潜力,合理使用基因编辑技术可以获取很多更高性能,适宜人类使用的产品。在健康领域,利用 CRISPR 技术已经取得诸多突破,包括构建衰老模型^[13]、编辑艾滋病病毒^[14]、剪切乙型肝炎病毒^[15]等,有望形成更有效的疾病治疗方法或药物。2016 年,美国正式批准 CRISPR 技术用于人体基因编辑。我国四川大学华西医院卢铀教授团队开启了全球首个 CRISPR 技术的临床试验,用于肺癌治疗。在农业领域,CRISPR 提供了一种用来改变基因的简单、精确的方法,可以创造抗病性和耐旱性等特征。中国科学院遗传发育研究所高彩霞团队利用 CRISPR 技术培育抗菌小麦,提高小麦产量;英国也有研究团队利用该技术调整大麦基因,帮助控制种子的发芽,培育抗旱品种。CRISPR 技术用于植物改造可以规避与转基因生物相关的漫长而代价昂贵的监管过程,因而越来越多地被研究实验室、小型公司所应用。

1.4 从国家角度,CRISPR 将是我国打造科技强国的“必争之地”

基因编辑作为一项新兴技术,是我国和发达国家同步,甚至部分引领全球技术发展的重要领域。我国在 CRISPR 基因编辑技术领域的论文量占全球论文量的近 20%,多项研究成果在领域内具有重大影响。CRISPR 基因编辑技术在靶向修饰的精度与效率、降低脱靶效应等方面仍有很大改进与完善的空间,在将其真正用于疾病治疗等应用前,还有很多问题需要解决。如果能够把握基因编辑技术的创

新机遇,持续投入,鼓励、支持科研人员开展源头技术探索,创建原创性、具有自主知识产权的基因编辑技术,便有机会占据全球基因编辑的研发高地。同时,我国已经率先开展了基因编辑技术的临床研究工作,并在基因编辑技术的伦理和监管方面积极参与和开展研讨,探索新兴技术促管措施,有望在国际生命科学伦理和安全讨论中拥有更多的话语权。

2 CRISPR 基因编辑技术获得大量资助

CRISPR 基因编辑技术引发的技术变革引起了各国政府的重视。美国、中国都加大了对该技术的科研投入,以促进该技术的发展和运用。

2.1 美国设立 CRISPR 基因编辑技术相关大型研究计划

美国对于 CRISPR 基因编辑技术的重视体现在 NIH 的研究资助上。如图 1 所示,NIH 资助的 CRISPR 相关项目数量从 2011 财年的 7 个增加到 2016 财年的 1 222 个,资助金额从 2011 财年的 510 万美元增加到 2016 财年的 6.03 亿美元^[16]。

2018 年 1 月,NIH 宣布将开展体细胞基因组编辑计划(somatic cell genome editing)^[17],将在未来 6 年内为研究人员提供 1.9 亿美元的资助,主要内容包括改进靶向患者基因编辑工具的传递机制,开发新的和改进的基因编辑器,开发检测动物和人类细胞中基因编辑工具的安全性和有效性的检测方法,以及组装含有基因的编辑工具包,由此产生的知识、方法和工具将与科学界共享等。

2.2 我国加大了对基因编辑技术的科研投入

在 CRISPR 技术横空出世之后,我国也非常重视对基因组编辑技术的布局和资助,国家自然科学基金资助的相关项目数量和金额逐年增长(图 2)。

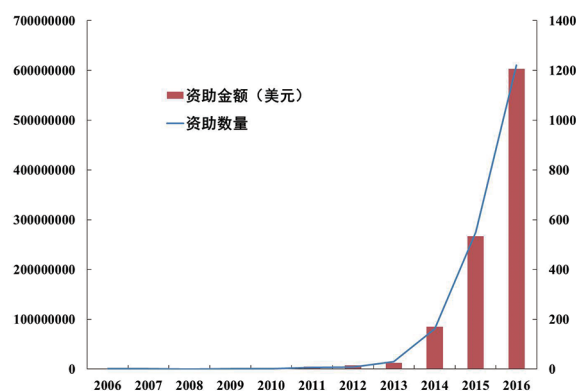


图1 NIH 2006—2016年间资助的CRISPR 相关研究数量及金额(美元)

2014年,国家自然科学基金共资助了31个CRISPR技术相关项目,总获批金额1300万元左右。2015年,国家自然科学基金共资助57项CRISPR技术相关项目,较2014年明显上升,获批总金额超过了3100万元,是2014年的2倍多。中国科学院上海生命科学研究院李劲松研究员的项目“孤雄单倍体胚胎干细胞携带CRISPR/Cas9文库用于筛选胚胎发育关键因子的研究”获资助金额达278万元,列于所有项目之首。2016年获资助的CRISPR技术相关项目共计80个,总金额超过3200万元。其中,获批金额最高的项目是复旦大学李华伟教授主导的“腺相关病毒介导的CRISPR/Cas9基因组定点编辑技术对遗传性耳聋的基因治疗研究”,资助金额高达240万元。2017年,国家自然科学基金资助的CRISPR技术相关项目达97项,资助金额共计约3872万元。

3 CRISPR基因编辑技术研发急速发展

以CRISPR技术为代表的基因组编辑技术已经成为生命科学研究领域的颠覆性技术之一,成为研究人员关注和投入的焦点。随着政府、学术界、产业界的投入大量增加,CRISPR技术的成果快速产出,相关论文发表量呈现出爆发式增长。

3.1 CRISPR基因编辑技术论文量快速增长

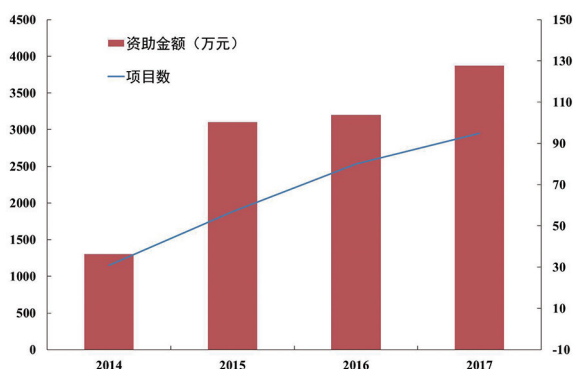
利用Web of Science数据库,检索2008—2017年的CRISPR基因编辑技术相关论文¹。2008—2017

年的10年间,CRISPR基因编辑技术研究相关论文共8142篇,论文量呈快速增长的趋势(图3),平均年增率高达73.31%;尤其是2013年首次报道CRISPR/Cas9系统在哺乳动物基因组编辑中的应用以来,论文量呈爆发式快速增长,从2013年的290篇增长到2017年的3150篇,且2013—2017年间相关论文量(7801篇)占10年论文总量的95.81%。

2008—2017年,中国发表的CRISPR基因编辑技术相关论文共1403篇,占全球论文量的17.23%。2013年以来,中国发表的CRISPR基因编辑技术相关论文占全球论文量的比例逐年上升,从2013年的8.28%增长到2017年的20.22%(图3),中国在CRISPR基因编辑技术研究领域的研究实力逐步凸显。

2008—2017年间,CRISPR基因编辑技术相关论文量排名前10的国家见图4。前10个国家发表CRISPR基因编辑技术相关论文总量6683篇,占全球论文量的81.83%。其中,美国以4017篇的论文量位居世界第一,占全球该领域论文总量的46.41%;中国以1403篇的论文量排名第二,占全球该领域论文总量的17.23%;论文量排名前10的国家还有德国、英国和日本等。

2008—2017年间,CRISPR基因编辑技术论文量排名前10的国家其发文概况见表1,篇均被引频次、高被引论文量占比、NCS论文量²占比以及h指数³可以在一定程度上反映该国在相关领域的研



来源：国家自然科学基金委员会，公开报道

图2 国家自然科学基金2014—2017年间资助的CRISPR相关研究数量及金额(人民币)

注释：

¹ 检索时间为2018年5月24日，数据库更新时间为2018年5月23日。

² 发表在Nature、Cell、Science三大刊物及其子刊上的论文量。

³ h指数(h-index)是指某研究机构或科学家最多有h篇文章被引了h次，可一定程度上反映该国论文质量。例如，h-index为20，表示有20篇论文至少被引用20次。

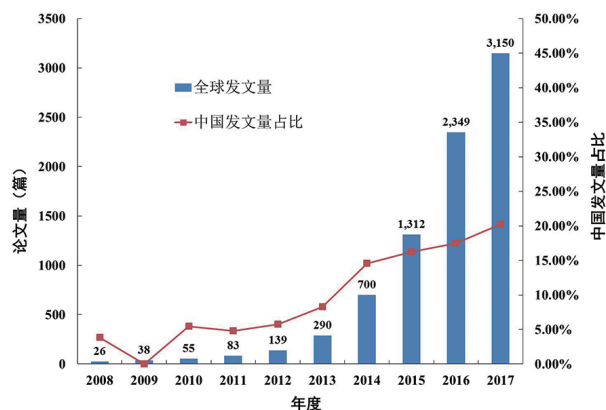


图3 2008—2017年CRISPR基因编辑技术论文量年度分布

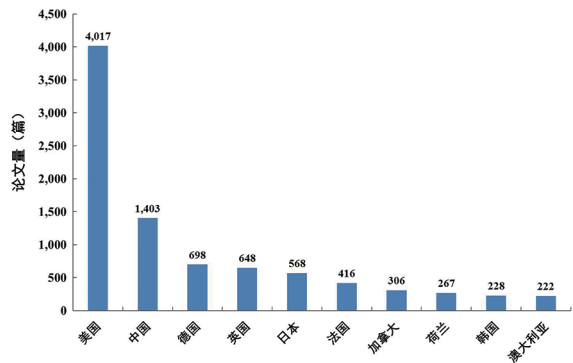


图4 2008—2017年CRISPR基因编辑技术论文量TOP10国家分布

究实力。

论文量排名第一的美国,其论文质量也排在前列。美国发表的CRISPR基因编辑技术论文篇均被引频次达到32.53次/篇,h指数高达157,高被引论文占比和NCS论文量占比分别为9.98%和9.81%,拥有较多的高质量论文。从篇均被引频次来看,荷兰以36.70次/篇的篇均被引频次排名首位,其高被引论文占比也高于其他9个国家(12.73%)。荷兰的论文中,被引频次最高的是瓦赫宁根大学微生物学实验室Brouns参与的综述文章“CRISPR-Cas系统的进化与分类”,被引868次,该文章2011年发表于*Nature Reviews Microbiology*^[18];其次是Brouns以第一作者身份发表的文章“原核生物中小CRISPR RNA介导的抗病毒防御”,被引865次^[19]。这两篇文章均为后来CRISPR系统的应用及技术开发奠定了基础。

中国在论文量上排在全球第二,总被引频次只有28 755次,篇均被引频次为20.50次/篇,在论文量排名前10位的国家中排名第七,h指数为72,

高被引论文量占比和NCS论文量占比分别为7.63%和4.06%,论文质量还有待提高。中国CRISPR基因编辑技术相关论文被引频次较高的是2013年发表于*Nature Biotechnology*的“CRISPR-Cas系统用于作物基因组靶向修饰”,被引483次,作者为中国科学院遗传与发育研究所的高彩霞研究员。这是全球首次将CRISPR/Cas系统成功用于小麦、水稻基因组改造,率先证明了该技术在植物系统中的有效性。随后几年,高彩霞团队在不同的植物系统中得到多项进展,她也因此在2016年被*Nature*杂志评为中国最具影响力的10大人物之一。

3.2 基因编辑技术研究取得诸多重要进展

CRISPR技术具有广泛的应用价值,尤其在基础生物学研究、疾病治疗等多个领域,成果不断涌现。

3.2.1 CRISPR技术广泛用于基础的生物学研究

CRISPR技术目前已广泛应用于全球各大生物学相关研究实验室。在基础研究方面,科学家利用CRISPR技术不断取得突破。例如,在合成生物学研究方面,*Nature Communication*杂志2015年5月19日在线发表论文,描述了一种基于CRISPR技术的装置能稳定地结合到一个宿主细菌的基因组中,可以瞄准用户选择的DNA序列(如质粒上携带的外源基因)进行销毁,其应用范围将包括防止转基因生物的环境释放、帮助生物技术公司保护知识产权以及避免偷窃等^[20];纪念-斯隆凯特琳癌症中心(MSK)的研究团队开发了一种简单、快速又便宜的配对gRNA文库制备方法,大大拓展了CRISPR技术在功能基因组学研究中的应用前景^[21]。

2017年4月,来自Broad研究所、McGovern研究所等机构的研究人员改造了靶向RNA的CRISPR

表1 CRISPR基因组编辑技术论文量Top10国家或地区分布

国家	论文量(篇)	总被引频次(次)	篇均被引频次(次/篇)	高被引论文量(篇)	高被引论文占比	NCS论文(篇)	NCS论文占比	h指数
美国	4 017	130 691	32.53	401	9.98%	394	9.81%	157
中国	1 403	28 755	20.50	107	7.63%	57	4.06%	72
德国	698	14 931	21.39	54	7.74%	41	5.87%	54
英国	648	11 870	18.32	33	5.09%	34	5.25%	52
日本	568	8 527	15.01	37	6.51%	27	4.75%	47
法国	416	14 680	35.29	27	6.49%	20	4.81%	54
加拿大	306	9 300	30.39	21	6.86%	19	6.21%	42
荷兰	267	9 798	36.70	34	12.73%	25	9.36%	48
韩国	228	5 001	21.93	19	8.33%	19	8.33%	30
澳大利亚	222	2 398	10.80	4	1.80%	8	3.60%	25

系统,使其成为了快速、便宜且高度灵敏的诊断工具,能够指示出目标 RNA 或 DNA 分子中单分子的存在,被研究者们授予了 SHERLOCK (Specific High-sensitivity Enzymatic Reporter unLOCKing) 的称号,该技术有望用于应对病毒和细菌爆发,监测抗生素耐药性以及检测癌症^[22]。哈佛大学的 Seth L. Shipman、George M. Church 等科学家利用 CRISPR 系统,将 Eadweard J. Muybridge 的《人类和动物的运动》中收录的图片和一部视频短片(gif 图)编码进了细菌的 DNA 中^[23];近年来,环状 RNA (circular RNAs, circRNAs) 越来越受到科学界的关注,但它们在活体内的功能一直是一个谜,研究人员发现了一种称为 Cdr1as 的环状 RNA 能够调节哺乳动物大脑中的 microRNA 水平,利用 CRISPR 技术删除 Cdr1as 会导致小鼠出现异常的神经元活动和行为障碍,这是科学家们首次将环状 RNA 与大脑功能联系起来^[24]。

3.2.2 CRISPR技术在疾病治疗领域潜力无限

CRISPR 技术在疾病治疗研究领域的成果不断涌现。2017 年,CRISPR 技术在疾病治疗领域有两大成果影响深远。一项是由俄勒冈健康与科学大学、韩国基础科学研究院、美国 Salk 生物研究所和中国深圳国家基因库合成与编辑平台合作完成的人类胚胎基因编辑,这是科学家首次成功利用 CRISPR/Cas9 系统在人类早期胚胎中对导致肥厚型心肌病的基因突变进行了安全修复^[25]。另一项重大研究成果是治疗亨廷顿舞蹈症 (Huntington's disease, HD)。美国埃默里大学医学院、中国科学院和暨南大学的研究人员在 9 个月大的亨廷顿舞蹈症模式小鼠中利用一种病毒载体运送的 CRISPR/Cas9 切除了脑细胞中 mHTT 基因的一部分。几周后,在大脑中接受这种病毒载体注射的地方,异常蛋白聚集物几乎消失了。此外,这些小鼠的运动能力得到改善,尽管没有恢复到健康小鼠的水平,但也提示了一种可能的疗法^[26]。

此外,研究人员将 CRISPR 技术与细胞免疫疗法相结合,希望能利用该技术完善 CAR-T 疗法。纪念斯隆-凯特琳癌症中心的研究人员利用 CRISPR/Cas9 技术构建了更有效的 CAR-T 细胞,并在小鼠中增强了肿瘤抑制作用。这一研究成果显示了 CRISPR/Cas9 技术在 CAR-T 细胞治疗中的应用潜力^[27]。美国科学家小组借助 CRISPR/Cas9 开发了一种新的筛选方法,可用于检测小鼠中数以千计的肿瘤基因的功能;利用这一筛选方法,研究小组找到了一个有

望增强 PD-1 检查点抑制剂有效性的新药物靶点——Ptpn2^[28]。

不过,对于利用 CRISPR 技术治疗人类疾病,CRISPR “大神” 张锋表达了谨慎的看法。2017 年 7 月 31 日,张锋及其研究小组成员 David Scott 在 *Nature Medicine* 发文称,人类 DNA 中的天然差异可能会通过阻碍 Cas9 酶作用于正确的基因目标,从而削弱 CRISPR 技术精准编辑人类基因组的能力。对这一问题严重程度的分析将对如何在临床试验中测试基因编辑技术,以及这类技术能否被广泛应用产生重要的影响^[29]。

3.2.3 CRISPR与iPS重编程相结合实现个性化干细胞治疗

CRISPR 基因编辑和 iPS 重编程是近年来的两大热点技术。CRISPR/Cas9 已经在多个领域中展现了自己强大的特异性基因靶标能力。而 iPS 重编程在构建疾病模型和新药开发中有着很高的应用价值。将 CRISPR 应用到 iPS 细胞中去,可以实现个性化的干细胞治疗,可能造福多种遗传学疾病的患者。

2017 年 7 月, *Cell* 杂志推出 CRISPR 特辑——“Gene Editing in Stem Cells”,回顾了现阶段基因编辑技术与干细胞之间擦出的火花。当与干细胞结合时,这些基因编辑工具有能力重塑人们对人类遗传学、发育生物学和再生医学的理解。基于 CRISPR 的平台已经被成功用于干细胞中,用以解决人类生物学的基本问题,并为疾病建模和药物发现提供了实验工具。例如,来自 Salk 研究所的科学家小组借助 CRISPR 技术首次成功培育出了人-猪嵌合体胚胎,这是干细胞研究领域的一个里程碑^[30];来自西奈山伊坎医学院的研究人员利用 CRISPR 技术将来自骨髓增生异常综合征和急性髓系白血病患者的血细胞转变成了诱导多能干细胞,这类干细胞能够模拟疾病进展的所有阶段,从健康状态到“pre-malignancy”,最后到充分进展的白血病^[31]。这一研究标志着科学家们首次能够将白血病从人类“移植”到试管中,再到小鼠中开展研究。此外,首个基于 CRISPR 的干细胞疗法已经进入临床测试。

3.2.4 CRISPR技术帮助突破异种移植

自 2013 年问世以来,CRISPR 基因编辑技术被迅速用于动物品种的改造,包括成功制备了一个或两个基因修饰的转基因山羊;构建出了两种蝴蝶的高质量参考基因组,并利用 CRISPR/Cas9 技术对蝴蝶进行了基因编辑;首次结合 CRISPR/Cas9 与体

细胞核移植技术获得了位点特异性的基因敲入猪模型;成功培育了肌肉生长抑制素(MSTN)基因敲除狗,并首次建立了狗的基因编辑技术体系等。

在这些探索的基础上,2017年8月,世界首批内源性逆转录病毒灭活猪诞生^[32]。美国eGenesis公司首席科学家杨璐菡、哈佛医学院的遗传学教授George Church联合浙江大学、云南农业大学、重庆第三军医大学及其他科研机构的科学家,利用CRISPR技术去除猪细胞内源性逆转录病毒基因,解决了猪器官异种移植的一个关键难题,对于移植医学意义重大,突破了异种移植停滞12年之久的困境,为填补人体组织器官移植空缺提供了新的前进希望。

3.2.5 CRISPR技术还在不断地优化和改进

CRISPR/Cas9虽然比以往的技术更简单、价廉及通用,但CRISPR/Cas9有其局限性,其中最为人诟病的就是“脱靶效应”,这是阻碍CRISPR技术应用的关键障碍之一,研究人员也在不断努力寻找降低CRISPR脱靶效应的方法和路径。

2016年12月,多伦多大学和马萨诸塞大学的科学家们首次发现了CRISPR/Cas9的“关闭开关”(off-switches)^[33];随后,来自加州大学旧金山分校(UCSF)的科学家们找到了在细菌和人类细胞中都能抑制CRISPR系统基因编辑活性的抑制剂——AcrIIA2和AcrIIA4,通过抑制Cas9酶的活性发挥抑制作用;2017年3月,由Scripps研究所的生物学家Gabriel C. Lander领导的研究小组第一次解析病毒的anti-CRISPR蛋白和细菌的CRISPR复合物结合的结构,准确地揭示了病毒如何让细菌防御系统失效^[34];随后,哈尔滨工业大学生命学院黄志伟教授课题组发现了anti-CRISPR蛋白抑制CRISPR-SpyCas9活性的分子机制^[35];2017年7月12日,CRISPR先驱Jennifer A. Doudna的研究团队发现,CRISPR“关闭开关”能够降低Cas9编辑人类细胞基因组的脱靶效应^[36]。

4 CRISPR基因编辑技术引发伦理讨论

随着利用CRISPR基因编辑技术操作细胞和组织的研究不断增加,研究者们开始尝试在人类卵细胞、精子甚至胚胎中试验这一技术,基因编辑领域的伦理问题开始显现。2013年初,关于这项技术可被用于编辑人类干细胞基因和改造整个生物体(斑马鱼)的几篇文章成为争议的开端。2014年2月,研究者利用CRISPR/Cas9技术精确改变了食蟹猴胚

胎基因组,意味着人工的遗传改变可以在食蟹猴的后代中传递。2015年4月,中山大学生命科学学院黄军就在*Protein Cell*杂志发表了编辑人类胚胎相关的论文,报道了该团队利用CRISPR/Cas9技术成功修改人类胚胎DNA的工作,该成果为治疗一种在中国南方儿童中常见的遗传病——地中海贫血症提供了可能。这是CRISPR/Cas9技术首次应用于人类胚胎编辑,由此引发基因组编辑技术伦理和监管问题的巨大争议,黄军就也因此入选了*Nature* 2015年度十大人物。此后,伴随着争议,各国的科学家并没有因此停止探索的脚步。2016年3月,广州医科大学附属第三医院的范勇教授利用CRISPR/Cas9技术对人类受精卵进行基因编辑,以抵抗艾滋病毒感染^[37];2017年,广州医科大学附属第三医院刘见桥教授带领团队将CRISPR初次应用于人类二倍体胚胎,在胚胎层面对携带遗传突变基因的胚胎进行修复^[38];2017年8月,俄勒冈健康与科学大学的Shoukhratb Mitallpov团队通过CRISPR/Cas9技术锁定并移除了42个胚胎内肥厚型心肌病有关的变异基因。

4.1 CRISPR基因编辑技术可能引发的伦理和安全问题

CRISPR基因编辑技术所可能引发的伦理风险是多层面的,由于技术本身的不确定性以及作用对象的复杂性,在健康、环境、经济以及社会等方面均存在许多不确定性以及非预期效应。

首先是技术本身对人体健康带来的影响。由于可能出现脱靶效应和镶嵌现象,CRISPR基因编辑技术应用于人体的安全性始终存疑,基因是否能够保证被正确编辑,经过修复的细胞是否能够有效存活,是否能够控制修饰细胞的数量,是否能够免除突变患癌的风险等一系列问题亟待解决。其次是应用边界问题。研究人员普遍认为,在技术的安全性和有效性能够保证的前提下,可以被允许应用到基因诊断、体外受精、遗传疾病等治疗用途。但疾病治疗和增强之间的边界目前还不清晰,即便初心在于治疗,后续用途也难免会转向非治疗或增强目的,这一点在伦理学家中广受诟病。再次,基因编辑技术的应用需要一定程度上共享基因组数据,在这一过程可能出现侵犯个人隐私的问题,以及基因组信息公开到一定程度时可能带来基因歧视问题,由此可能引发另一个问题——社会不公。基因编辑问题可能引发的社会不公存在于两个层面,一个是以治疗为目的的医疗不公;另一个则是通过对人体胚

胎基因编辑实现人体增强，或对特定人群进行永久性的基因强化，由此可能加剧阶级固化。这两种社会不公都会引发严重的社会问题，是目前国际社会坚决抵制的。

此外，由于基因编辑技术的便捷、简单、高效等特点，若被误用甚至滥用，可能引发的生物安全问题也引起广泛讨论。如 2016 年的《美国情报界年度全球威胁评估报告》将基因编辑列入了“大规模杀伤性与扩散性武器”威胁清单，该报告认为这种有双向用途的技术分布广泛、成本较低、发展迅速，任何蓄意或无意的误用都可能引发国家安全问题或严重的经济问题。

4.2 国际社会积极应对基因编辑技术带来的伦理挑战

黄军就的工作发表不久，国际社会便针对基因组编辑的伦理问题做出了积极反应。2015 年 5 月 18 日，美国国家科学院 (NAS) 和国家医学院 (NAM) 宣布开展人类基因编辑行动计划 (Human Gene-Editing Initiative)，成立人类基因编辑研究委员会，为人类基因编辑制定指导准则，并于 2015 年 12 月举办了国际人类基因编辑峰会，中国科学院也参与其中。与会专家就人类胚胎基因编辑发布联合声明，表示现阶段可在适当的法律法规、伦理准则的监管下开展相关基础研究和临床前研究，也可开展针对体细胞的临床研究及临床治疗。鉴于目前基因编辑的安全性和有效性问题尚未解决，且未达到临床应用标准，现阶段应禁止对人类胚胎和生殖细胞进行基因编辑。但是，随着科研和社会认知的发展，其临床应用可重新进行评估。

与美国的谨慎态度不同，2015 年 9 月 2 日，包括威康信托基金会、医学研究委员会等在内的 5 个英国研究组织发表申明，称支持继续使用 CRISPR/Cas9 进行研究，当道德和法律允许时，也可用于人类胚胎。2015 年 9 月 18 日，英国伦敦 Francis Crick 研究所的研究人员 Kathy Niakan 向人类胚胎管理局

(Human Fertilisation and Embryology Authority, HFEA) 申请利用基于 CRISPR/Cas9 技术对人类胚胎进行编辑，从而研究人类胚胎的早期发育。该申请已于 2016 年 2 月正式通过。这是国家级监管机构首次对基于 CRISPR 技术进行人类胚胎编辑放行。

此外，2016 年 4 月，日本生命伦理专门调查委员会宣布：允许日本相关机构在基础研究中“编辑”人类受精卵的基因，但出于安全和伦理方面的考虑，不允许将该技术应用到临床和辅助生殖中。

经过长达 14 个月的工作，2017 年 2 月 15 日，人类基因编辑研究委员会在美国华盛顿正式就人类基因编辑的科学技术、伦理与监管向全世界发布研究报告，并从基础研究、体细胞、生殖细胞/胚胎基因编辑三方面提出了相关原则^[39](表 2)。

此外，委员会特别提出了 10 条规范标准，在美国的限制措施过期之前，或在没有法律禁止进行此类研究的国家，符合以下标准的情况下，可以开展可遗传生殖系统基因编辑。(1) 缺乏其他合理可行的替代疗法；(2) 仅限于预防某种严重的疾病；(3) 仅限于编辑已经被证实会致病或强烈影响疾病的基因；(4) 仅限于将此类基因转入人群中普遍存在的基因版本，并已知与健康相关，且没有或者很少有不良反应；(5) 提供可信的临床前和临床数据表明研究过程中的风险和潜在的健康益处；(6) 在试验过程中，对研究参与者的健康和安全持续进行严格监测；(7) 长期多代同堂后续仍然尊重个人自主性的综合计划；(8) 在保护患者隐私的前提下保证最大透明度；(9) 利用广泛的公众参与和投入，进行持续的健康及社会福利和风险评估；(10) 建立可靠的监督机制，防止延期使用，防止严重的疾病或情况发生。

4.3 我国积极开展基因编辑技术伦理问题研讨

与科技发达国家相比较，我国在新兴技术的伦理问题研究及风险管理方面相对滞后，但在基因编

表2 人类基因编辑的科学技术、伦理与监管基本原则

科学、伦理与监管基本原则	
基因编辑的基础研究	可以在现有的管理条例框架下进行：包括在实验室对体细胞、干细胞系、人类胚胎的基因组编辑来进行基础科学研究试验。
体细胞基因编辑	利用现有的监管体系来管理人类体细胞基因编辑研究和应用；在疾病与残疾的诊疗与预防范围内限制其临床试验与治疗；从其应用的风险和益处来评价安全性与有效性；在应用前需要广泛征求大众意见。
生殖细胞/胚胎细胞(可遗传)基因编辑	有令人信服的治疗或者预防严重疾病或严重残疾的目标，并在严格的监管体系下使其应用局限于特殊规范内，允许临床研究试验；任何可遗传生殖基因组编辑应该在充分的持续反复评估和公众参与条件下进行。

辑技术方面,我国和国际几乎同步在关注、讨论和积极应对相关的伦理监管问题。

在2014年5月10—12日举办的香山科学会议上,相关专家便以“基因编辑前沿技术:应用、生物安全与伦理”为题对基因编辑技术涉及的相关问题进行了讨论。专家普遍认为,规范新一代基因编辑技术的应用势在必行。基因编辑不可避免地会带来生物安全与社会伦理等诸多关系到国计民生的问题,为抢占先机,建议国家有关部门尽快制订相关政策,按照不同应用领域的具体情况,制订相应的行业使用规范与指南,以促进该技术在应用领域的良性发展。例如,在农作物和家禽家畜育种方面,应明确该项技术与转基因技术的异同,将两者区别对待,分别管理。可以考虑将监管的重点放在最终的产品,如果在最终产品中并没有引入外源基因,而只是造成了内源基因在序列上的小范围改变,或者只是模拟了自然界本来就存在的某种突变,或者是通过自然杂交或诱变育种的方式可以获得的突变,可以考虑将基于这一技术制造的生物材料进行登记管理,作为常规育种材料对待。在具体操作层面上,也可以学习美国的方式,即转基因管理机构拒绝对这类材料进行管制,从而自然实现这类材料的常规化应用。

2016年6月举办的香山科学会议,再次以“基因编辑的研究和应用”为主题,重点针对基因编辑技术的研发及其在生命科学基础研究、农业畜牧业育种以及基因治疗等医学领域的应用,防范基因编辑研究可能带来的生物安全风险和伦理争议,推动我国在基因编辑技术应用和监管方面的政策规范制定,提升我国在基因编辑相关科学前沿、重大应用及下游产业化等领域的国际竞争力等议题进行讨论。专家普遍认为,基因编辑技术本身的迅速发展令人称快,但中国在系统科学布局以及相关伦理学、管理和法律法规方面相对薄弱,亟待加强布局。与会专家建议,应尽快部署基因编辑技术的监管和伦理学研究,对可能带来巨大伦理和社会问题的基因编辑工作应设定严格的应用边界。此外,专家也呼吁应对基因编辑技术的原始创新和专利保护给予高度重视,为我国在基因编辑技术的临床转化和市场化应用方面争取主动权和话语权。

2017年9月24日,为了推动我国基因编辑研究的发展,给基因编辑工作者建立学术交流平台,经中国科协批准成立了“中国遗传学会基因编辑分会”,并在北京召开“基因编辑科学与技术前沿论

坛”。与会专家对基因编辑的伦理问题展开了激烈的讨论,呼吁对于以CRISPR基因编辑技术为代表的一系列新兴技术,要“管促结合”,要积极面对技术变革所带来的伦理和安全挑战,要合理监管的同时促进技术进步,推动新兴技术有序的发展与应用。

5 展望

CRISPR基因编辑技术所引发的风暴还在继续,研究成果还将不断涌现,相关研究论文数量仍然会快速增长,而美国将继续引领基因编辑技术的研究。未来CRISPR基因编辑技术的研发热点仍集中在疾病治疗领域,尤其是CRISPR技术相关临床试验的开展,将极大地促进基因治疗投入应用的进程,CRISPR/Cas13、ABE碱基编辑器等新的技术系统的发明和应用也将为更多疾病的治疗带来希望。

然而,随着研究的深入,CRISPR基因编辑技术所暴露出的技术缺陷也在不断提醒人们保持谨慎和清醒。尽管已经发现“关闭开关”能够降低Cas9编辑人类细胞基因组的脱靶效应,但其安全性始终存疑。在最新的研究成果中,来自瑞典卡洛林斯卡研究所和剑桥诺华生物医学研究院的两个团队分别独立发现,CRISPR/Cas9基因编辑过程中造成的DNA双链断裂,实际上可以激活p53蛋白通路。该蛋白在基因修复过程中有关键作用,一定程度上导致了基因编辑的失败^[40-41]。这也意味着,基因编辑成功的细胞往往具有p53缺陷,也就是说,基因编辑成功的细胞很可能是潜在的癌细胞,利用CRISPR/Cas9进行临床治疗可能会无意中增加患癌风险。此外,关于基因编辑技术的伦理讨论还将继续且不可忽视。

CRISPR基因编辑技术的应用还在探索阶段,科学家们已经开始尝试将其用于纠正疾病基因、消除致病微生物,甚至复活灭绝物种、根除害虫等。未来,CRISPR基因编辑技术将继续在生物技术的发展、科学发展、人类健康、伦理安全等方面展现其革命性意义。

[参 考 文 献]

- [1] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, et al. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli* and identification of the gene product. J Bacteriol, 1987, 169: 5429-33
- [2] Rodolphe B, Christophe F, Hélène D, et al. CRISPR

- provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007, 315: 1709-12
- [3] Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 2579-86
 - [4] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337: 816-21
 - [5] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339: 819-23
 - [6] Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339: 823-6
 - [7] Shan QW, Wang YP, Li J, et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 686-8
 - [8] 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
 - [9] Liang P, Xu Y, Zhang X, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triploid zygotes. *Protein Cell*, 2015, 5: 363-72
 - [10] Research and Markets. Genome editing global market-forecast to 2022 [EB-OL]. [2016-09]. http://www.researchandmarkets.com/research/7r73wl/genome_editing
 - [11] Markets and Markets. Genome editing/genome engineering market worth 5.54 billion USD by 2021 [EB-OL]. [2017]. <http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/genome-editing-engineering.asp>
 - [12] Grand View Research. Genome editing market size to reach \$8.1 billion by 2025 [EB-OL]. [2017-02]. <http://www.grandviewresearch.com/press-release/global-genome-editing-market>
 - [13] Itamar H, Berenice AB, Ben M, et al. A platform for rapid exploration of aging and diseases in a naturally short-lived vertebrate. *Cell*, 2015, 160: 1013-26
 - [14] Liao HK, 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: 6413
 - [15] Ramanan V, Shlomai A, Cox DB, et al. CRISPR/Cas9 cleavage of viral DNA efficiently suppresses hepatitis B virus. *Sci Rep*, 2015: 10833
 - [16] Gallo ME, Sargent JF, Sarata AK, et al. Advanced gene editing: CRISPR-Cas9 [EB/OL]. [2017-04-28]. <https://fas.org/sgp/crs/misc/R44824.pdf>
 - [17] The market and potential for CRISPR/Cas9 gene editing 2017-2023[EB/OL]. [2018-04-12]. <https://www.prnewswire.com/news-releases/the-market-and-potential-for-crisprcas9-gene-editing-2017-2023-300628858.html>
 - [18] Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9: 467-77
 - [19] Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, 2008, 321: 960-4
 - [20] Caliendo BJ, Voigt CA. Targeted DNA degradation using a CRISPR device stably carried in the host genome. *Nat Commun*, 2015, 6: 6989
 - [21] Vidigal JA, Ventura A. Rapid and efficient one-step generation of paired gRNA CRISPR-Cas9 libraries. *Nat Commun*, 2015, 6: 8083
 - [22] 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: 464-71
 - [23] Shipman SL, Nivala J, Macklis JD, et al. CRISPR-Cas encoding of a digital movie into the genomes of a population of living bacteria. *Nature*, 2017, 547: 345-9
 - [24] Piwecka M, Glazar P, Hernandez-Miranda LR, et al. Loss of a mammalian circular RNA locus causes miRNA deregulation and affects brain function. *Science*, 2017, 357: 6357
 - [25] Ma H, Marti-Gutierrez N, Park SW, et al. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature*, 2017, 548: 413-9
 - [26] Yang S, Chang RB, Yang HM, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing ameliorates neurotoxicity in mouse model of Huntington's disease. *J Clin Invest*, 2017, 127: 2719-24
 - [27] 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: 113-7
 - [28] Manguso RT, Pope HW, Zimmer MD. *In vivo* CRISPR screening identifies Ptpn2 as a cancer immunotherapy target. *Nature*, 2017, 547: 413-7
 - [29] Scott DA, Zhang F. Implications of human genetic variation in CRISPR-based therapeutic genome editing. *Nat Med*, 2017, 23: 1095-101
 - [30] Wu J, Platero-Luengo A, Sakurai M, et al. Interspecies chimerism with mammalian pluripotent stem cells. *Cell*, 2017, 168: 473-86
 - [31] Kotini AG, Chang CJ, Chow A, et al. Stage-specific human induced pluripotent stem cells map the progression of myeloid transformation to transplantable leukemia. *Cell Stem Cell*, 2017, 20: 315-28
 - [32] Niu D, Wei HJ, Lin L, et al. Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9. *Science*, 2017, 357: 1303-7
 - [33] Pawluk A, Amrani N, Zhang Y, et al. Naturally occurring off-switches for CRISPR-Cas9. *Cell*, 2017, 167: 1829-38
 - [34] Chowdhury S, Carter J, Rollins MF, et al. Structure reveals mechanisms of viral suppressors that intercept a CRISPR RNA-guided surveillance complex. *Cell*, 2017, 169: 47-57
 - [35] Dong D, Guo MH, Wang SH, et al. Structural basis of CRISPR-SpyCas9 inhibition by an anti-CRISPR protein. *Nature*, 2017, 546: 436-9
 - [36] Shin J, Jiang FG, Liu JJ, et al. Disabling Cas9 by an anti-CRISPR DNA mimic. *Sci Adv*, 2017, 3: e1701620
 - [37] Kang XJ, He WY, Huang YL, et al. Introducing precise genetic modifications into human 3PN embryos by CRISPR/Cas-mediated genome editing. *J Assist Reprod Genet*, 2016, 33: 581-8
 - [38] Tang LC, Zeng YT, Du HZ, et al. CRISPR/Cas9-mediated

- gene editing in human zygotes using Cas9 protein. *Mol Genet Genom*, 2017, 292: 525-33
- [39] Human genome editing: science ethics and governance [EB/OL]. <http://nationalacademies.org/gene-editing/index.htm>
- [40] Emma H, Sandeep B, Jenna P, et al. CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. *Nat Med*, 2018, 24: 927-30
- [41] Ihry RJ, Worringer KA, Salick MR, et al. p53 inhibits CRISPR-Cas9 engineering in human pluripotent stem cells. *Nat Med*, 2018, 24: 939-46