

DOI: 10.13376/j.cblls/2018112

文章编号: 1004-0374(2018)09-0932-07



刘见桥, 生殖医学博士, 主任医师, 广州医科大学附属第三医院生殖医学中心主任。我国较早从事辅助生殖技术工作的专家之一, 擅长个体化促排卵方案的制定、阴道B超下取卵术、多胎妊娠减胎术, 临床妊娠率稳定在55%以上。科研主攻卵子发育与调控、早期胚胎发育、在胚胎层面对携带遗传突变基因的胚胎行基因编辑、卵母细胞激活及其激活方案优化、提高IVF安全性和降低多胎率等, 在国内外核心期刊发表论文近50篇。其于2017年发表了全球首篇对携带遗传突变基因的人类二倍体胚胎行基因编辑的文章, 证实了CRISPR基因编辑技术可以让科学家对人类的DNA进行定点改造, 为通过改造缺陷基因来治疗遗传疾病提供了可能性; 于2018年全球首次报道了人类早期胚胎发育过程中染色体开放性的调控图谱, 揭示了人类胚胎发育和进化的奥秘。

## 基因编辑技术在人类生殖细胞中的应用研究

李广磊, 曾艳婷, 刘见桥\*

(广州医科大学附属第三医院生殖医学中心, 广州 510150)

**摘要:** 基因编辑技术极大地提高了对基因组靶位点精确修改的效率。人类早期胚胎发育的特异性和目前报道的上万种遗传突变的修复必要性使得基因编辑技术在人生殖细胞中的应用成为必然。对人生殖细胞基因编辑是一个新的领域, 涉及到伦理的考虑。因此, 这既是科学问题, 同时也是个社会问题。现综述基因编辑技术在人类生殖细胞应用的伦理之争和研究进展。

**关键词:** 基因编辑; 人类生殖细胞; 胚胎发育; 遗传疾病; 伦理

**中图分类号:** Q-33; Q78      **文献标志码:** A

## Research progress of genome editing in human germline cell

LI Guang-Lei, ZENG Yan-Ting, LIU Jian-Qiao\*

(Department of Reproductive Medicine, Third Affiliated Hospital  
of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510150, China)

**Abstract:** Genome editing greatly promotes the efficiency of precise modification of target sites. It is necessary to edit the germline cell because of the specificity of human embryo development and the necessity for repairing thousands of genetic diseases. It is a new field to edit the germline cell, and it is not only a scientific problem, but also an ethical issue. This article summarizes the ethical discussion of germline cell editing and its research progress.

**Key words:** genome editing; germline cell; embryo development; genetic diseases; ethical issue

对基因组序列的操作有助于我们更进一步探索生命的奥秘, 同时也可以为治疗遗传疾病提供有效

工具。锌指核酸酶(ZFN)、类转录激活样效应因子核酸酶(TALEN)和规律成簇间隔短回文重复序列

收稿日期: 2018-08-30

基金项目: 广东省临床教学基地教学改革研究项目(2017JD105); 广东省卫生计生委广东省医学科研基金指令性课题项目(C2016058)

\*通信作者: E-mail: ljg88gz@163.com

(CRISPR/Cas) 三种基因编辑工具的依次应用, 尤其是 CRISPR/Cas9 技术, 使得对 DNA 序列的操作变得简单易行<sup>[1-2]</sup>。到目前为止, CRISPR/Cas9 技术已经在模式动物构建、基因表达的激活和抑制、疾病修复、文库筛选等多个领域展现出巨大价值<sup>[3]</sup>。基于对多个物种、多个领域的成功应用, 基因编辑技术不可避免地要应用到人类自身上来。根据编辑对象不同, 可以分为体细胞基因编辑和生殖细胞基因编辑。对体细胞的编辑主要是用于治疗一些疾病, 如增强肿瘤免疫疗法<sup>[4]</sup>。基因编辑同时在人生殖细胞中也具有巨大的潜力, 这是因为人类早期胚胎发育与模式动物如小鼠相比, 仍然存在一些差异<sup>[5]</sup>, 一些人类早期胚胎发育的问题只能在人的胚胎上进行研究<sup>[6]</sup>。另外, 目前已经有一万多种遗传病被发现<sup>[7]</sup>, 这些遗传病需要开发更加安全高效的方法去治疗。目前基因编辑在体细胞和生殖细胞中都展现出了巨大的应用潜力, 我们必须意识到这项技术对于生命科学的理解提供了巨大的机会<sup>[8-10]</sup>。但基因编辑在生殖细胞中的应用还涉及到伦理问题, 因此, 本文将对基因编辑在人生殖细胞中的一些伦理争论和应用进展做一综述。

## 1 人生殖细胞基因编辑涉及的伦理问题之争

自从 CRISPR/Cas9 技术开始应用于哺乳动物的基因编辑以来, 多个实验室已经在考虑将其应用到人生殖细胞上<sup>[11]</sup>。但因为涉及到伦理问题, 第一篇有关人胚胎编辑的文章终于在 2015 年 4 月发表<sup>[12]</sup>。人生殖细胞基因编辑按照编辑对象可以分为胚胎基因编辑、卵母细胞基因编辑和精原干细胞基因编辑<sup>[13]</sup>。目前发表的文章以直接对人胚胎进行编辑为主, 包括 3PN 胚胎<sup>[12,14-15]</sup>和 2PN 胚胎<sup>[7,16-17]</sup>。若按照编辑的目的, 可以分为基础性的基因功能研究和治疗性的修复遗传疾病<sup>[18]</sup>。在第一篇文章发表之前, 各国科学家已经对人胚胎的基因编辑涉及到的伦理问题进行了讨论<sup>[19]</sup>。

考虑到基因编辑技术对治疗人类遗传病有巨大的潜能, 同时可能存在未知的风险, 2015 年 1 月, 科学家在美国纳帕对基因编辑技术在人生殖细胞上的应用进行了讨论, 最终主要达成了 4 个共识<sup>[20]</sup>, 主要包含有: 严禁编辑过的生殖细胞在临床中使用; 建立一个用于科研工作者和生物伦理学家普及基因编辑相关知识的平台或论坛; 鼓励和支持对 CRISPR/Cas9 的效率和安全性研究; 召集社会各界人士进一步仔细讨论相关问题。随后对人生殖细胞的编辑进

行了越来越多的讨论<sup>[21-24]</sup>。对于基因编辑在人生殖细胞上的使用, 科学家都持有谨慎的态度, 但仍有分歧存在<sup>[19]</sup>。一些科学家认为应停止在人胚胎上的任何操作<sup>[25]</sup>, 而另一些科学家认为在时机成熟的情况下可以进行<sup>[19,26]</sup>, 还有学者认为是否采用胚胎基因编辑应该根据个人意愿<sup>[27]</sup>。2015 年 11 月, Addison 和 Taylor-Alexander<sup>[28]</sup>发表评论, 呼吁对生殖细胞编辑需要科学家、学者、医生、患者、公众人物等来自不同层面的人士进行讨论。人胚胎基因编辑的优劣需要更多的数据来证明<sup>[29]</sup>。

总结来看, 反对人生殖细胞基因编辑的理由主要有: (1) 基因编辑目前存在一些未知的风险; (2) 人类不是小鼠, 对人进行基因编辑定制婴儿引发道德滑坡; (3) 容易引起不公, 生殖细胞的编辑价格较为昂贵, 不是所有人都有条件可以使用这个技术<sup>[30]</sup>; (4) 对一些引起疾病的遗传突变, 现在有其他替代方法, 比如移植前基因诊断 (preimplantation genetic diagnosis, PGD), 可以避免疾病传递到下一代<sup>[19]</sup>。总的来说, 安全性和伦理是基因编辑在人胚胎上应用的两大影响因素<sup>[24]</sup>。抛开伦理问题不考虑, 基因编辑在人生殖细胞应用的主要障碍还是效率和安全性: (1) 编辑效率低, 可能需要用到更多的胚胎; (2) 编辑效率低会引起嵌合体的现象, 出生的后代中可能还携带致病基因<sup>[23,31]</sup>。

而支持人生殖细胞基因编辑的科学家则认为: (1) 每年约有 800 万的新生儿具有出生缺陷, 基因编辑可以大大降低这些疾病的发生。(2) 虽然 PGD 等技术可以应用于单基因遗传病, 但 PGD 需要用到更多的胚胎, 同时对一些复杂的多基因突变, PGD 可能无能为力。(3) 任何技术的出现都会有一些不确定性, 但我们要权衡它们的利与弊。当基因编辑带来的益处超过风险的情况下, 是否可以考虑采用胚胎基因编辑<sup>[32]</sup>。(4) 不能因噎废食, 与其颁布禁令禁止研究, 不如讨论在非治疗领域的限制。(5) 基因编辑技术的安全性可以通过严格设计, 不断优化技术来提高<sup>[33]</sup>。比如, 本实验室在 3PN 胚胎上利用碱基编辑技术可以百分百地实现靶基因的突变<sup>[14]</sup>。

另外, 在国家层面上, 不同国家对人生殖细胞的基因编辑的态度也不同<sup>[13]</sup>。比如英国、瑞典就相对支持在人胚胎上的研究<sup>[31]</sup>。2015 年 2 月, 英国下议院通过决议, 允许进行生殖细胞的线粒体移植。2015 年 6 月, 瑞典卡洛琳斯卡学院的 Fredrik Lanner 获得了可以在人胚胎上进行基础研究的资质<sup>[11]</sup>。2016 年, 英国人类生育和胚胎学管理局 (HFEA) 通

过了弗朗西斯·克里克研究所的 Kathy Niakan 提交的在人胚胎上进行基因功能研究的申请<sup>[34]</sup>。2018年7月，英国的纳菲尔德生物伦理委员会表示，在某些情况下，可遗传的基因组编辑“在道德上是可接受的”。而其他，如加拿大和一些欧洲国家则完全禁止人生殖细胞上的研究。

## 2 人生殖细胞基因编辑所需遵守的规范

2015年12月，由美国科学院和美国医学院成立的人类基因编辑委员会决定对人类基因编辑的科学技术、伦理与监管开展全面研究。经过14个月的讨论<sup>[35]</sup>，2017年2月，该委员会发布其研究报告，对人类基因编辑涉及的基础研究、体细胞研究和生殖细胞研究三大领域提出了使用原则<sup>[36-37]</sup>，概括起来主要有以下三种情况：(1)在现存的行政法规监管之下，允许基因编辑在人胚胎上的基础研究，但胚胎体外培养不能超过14d<sup>[38]</sup>，允许利用体细胞基因编辑治疗严重疾病；(2)在严格的监督和公共讨论下，同时无其他有效方法治疗的前提下，对生殖细胞基因编辑以治疗严重的遗传疾病；(3)严禁以增强功能为目的对体细胞和生殖细胞进行编辑<sup>[10]</sup>。国际干细胞研究协会对人胚胎研究涉及到的伦理问题做出了更严谨的规定<sup>[39]</sup>。

## 3 人生殖细胞基因编辑研究早期胚胎发育

人类早期胚胎发育的模式与小鼠存在差异，因此一些人类早期胚胎发育的问题只能在人类胚胎上进行<sup>[5]</sup>。伦敦弗朗西斯·克里克研究所的 Kathy Niakan 利用 CRISPR/Cas9 在人的正常二倍体胚胎中敲除了 *OCT4* 基因，研究了 *OCT4* 基因在人早期胚胎发育中的功能<sup>[16]</sup>。结果表明，*OCT4* 基因的表达对人胚胎早期发育阶段是必需的，敲除 *OCT4* 影响了囊胚的形成，这与小鼠胚胎中的研究结果不同<sup>[18]</sup>。这项研究也表明了模式动物上研究胚胎发育的局限，如果想真正了解人类胚胎发育，需要直接在人胚胎上进行<sup>[9]</sup>。该研究也是基因编辑技术第一次在人胚胎中进行基因功能研究，是理解人类胚胎发育的第一步。

## 4 基于CRISPR/Cas9技术编辑遗传疾病位点

目前已有报道的1万多种遗传疾病中只有大概6%的遗传疾病可以得到有效的治疗<sup>[40]</sup>。基因编辑技术由于其靶向性和高效性，在治疗人类遗传病中展现出了巨大的应用潜力<sup>[41]</sup>。2015年4月，中山

大学黄军就团队发表了第一篇利用 CRISPR/Cas9 编辑人胚胎基因的文章<sup>[12]</sup>。结果显示，CRISPR/Cas9 在人 3PN 胚胎中能够有效地切割内源性的 *HBB* 基因，扩增出来的 54 个胚胎中有 28 个发生了切割，效率达到了 52%。但在 28 个发生编辑的胚胎中只有 4 个胚胎发生了同源重组精确修复，效率仅仅为 15%，同时在编辑的胚胎中发现了明显的脱靶。该研究的出现在学术界引起了巨大的反响<sup>[6, 23, 42]</sup>，并引发了对人类胚胎基因编辑的广泛讨论。2016年4月，来自广州医科大学附属第三医院的范勇团队在人 3PN 的胚胎上对 *CCR5* 基因进行了敲除<sup>[15]</sup>，利用 CRISPR/Cas9 结合同源重组的方式对 *CCR5* 基因的 32 个碱基实现精确敲除，结果发现 20 个胚胎之中只有一个发生了同源重组修复 (HDR)，效率仅为 5%；同时作者利用两个 sgRNA 对这 32 个核苷酸进行敲除，发现 26 个胚胎里面有 4 个发生了 32 个核苷酸的精确敲除，效率约为 15%。上述结果初步表明人胚胎中同源重组效率较低，若能合理设计两个 sgRNA 的位置，其精确敲除的效率高于同源重组的效率。

上述两项研究均是在 3PN 胚胎即本身就不会正常发育的胚胎中进行的。2017年3月，同样来自广州医科大学附属第三医院的刘见桥团队在正常的 2PN 胚胎中对 *HBB* 和 *G6PD* 基因进行修复。该研究利用具有突变型的精子与正常卵子通过单精子注射 (ICSI) 获得杂合子胚胎。相较于上面提到的两项研究运用 Cas9 的 mRNA 形式注射，此研究用的是 Cas9 的蛋白形式，使其与 sgRNA 在体外形成复合体再注射。对 *HBB* 基因突变的胚胎，在 4 个发生编辑的胚胎中，只有 1 个胚胎发生了期望的同源重组，同时此胚胎中还存在发生了 indel 的等位基因。在对两个含有 *G6PD* 基因突变的胚胎修复后，发现均发生了同源重组修复。其中在一个胚胎中，挑选的 40 个 TA 克隆测序结果表明，22 个克隆是重组型的基因型，另外 18 个是野生型的等位基因。在另外一个胚胎中，除了重组修复以外，还含有发生了 indel 的等位基因，意味着此胚胎是个嵌合体。2017年8月，俄勒冈健康科学大学的 Shoukhrat Mitalipov 团队在 *Nature* 发文，利用 CRISPR/Cas9 在人胚胎中修复了一种致病突变<sup>[7]</sup>，该文受到了广泛的关注与讨论，*Nature* 配发了相关的评论文章<sup>[43]</sup>。相较于之前已发表的文章，此研究在编辑效率和安全性上均有提高。该研究编辑了 *MYBPC3* 基因的一种突变，此突变与心肌肥大相关。该研究利用捐献的卵子与



心肌肥大患者的精子进行研究。之前研究表明, 基因编辑在人胚胎中应用的两大障碍: 一是容易产生嵌合体, 二是存在脱靶的危险性。产生嵌合体可能是由于编辑效率低引起的。一些卵裂球发生了编辑, 而另外一些没有编辑; 又或者是由于编辑发生的时候细胞已经发生了分裂。不同的卵裂球产生了不同的编辑结果。由于非同源末端连接修复 (NHEJ) 竞争 HDR, 所以在 HDR 存在的同时也发生了 NHEJ, 这在刘见桥团队的文章中已经证明<sup>[17]</sup>。为了解决嵌合体的现象, Shoukhrat Mitalipov 团队采用 Cas9 蛋白结合 sgRNA 形成 RNP 复合体, 与患者的精子同时注射到卵母细胞中。结果表明, 在编辑的 58 个胚胎中有 42 个没有发生嵌合现象, 42 个胚胎含有的或者是野生型的基因型, 或者是提供的同源模板的基因型, 其余的 16 个胚胎发生了非预期的插入或缺失。另外该研究还表明, 在人胚胎中, HDR 的模板以野生型的基因拷贝为主, 这与细胞中的结论并不相同, 与黄军就发表的结论类似<sup>[12]</sup>。但部分生物学家对此结论表示质疑, 同时质疑的还有如果 CRISPR/Cas9 对靶基因进行了大片的敲除, 作者有可能没有检测到。对此质疑, Shoukhrat Mitalipov 随后进行了回复, 他同时表示希望更多的研究能重复此项工作<sup>[44]</sup>。总之, 本研究重新点燃了利用基因编辑修复遗传疾病的希望, 无疑对基因编辑在人胚胎中的应用迈出了重要的一步<sup>[45]</sup>。

## 5 基于碱基编辑技术编辑遗传疾病位点

利用 CRISPR/Cas9 结合 ssODN 进行遗传疾病修复利用了同源重组的原理, 但无论是细胞系内还是胚胎内, NHEJ 都与 HDR 竞争, 导致 HDR 效率偏低, 较低的同源重组修复效率使得修复的胚胎杂合率较高, 无法顺利应用于临床。CRISPR/Cas9 切割 DNA 双链, 也可能会引起大片的敲除<sup>[46]</sup>, 同时可能会激活 p53 信号通路<sup>[47-48]</sup>。提高编辑效率, 增加安全性是基因编辑技术在临床上应用的两大关键。

碱基编辑技术是在 CRISPR/Cas9 的基础上发展出来的, 目前主要有胞嘧啶碱基编辑系统 (CBEs) 和腺嘌呤碱基编辑系统 (ABEs)<sup>[49-50]</sup>。胞嘧啶碱基编辑系统是在 nCas9 的基础上融合了胞嘧啶脱氨酶, 其可以对单链 DNA 上的胞嘧啶脱氨, 形成尿嘧啶, 随着 DNA 的复制, 尿嘧啶以胸腺嘧啶的形式出现, 最终实现 C 变成 T 的编辑。目前使用频率最高的 David Liu 实验室开发的系统, 其用的胞嘧啶脱氨

酶是 rAPOBEC1<sup>[51]</sup>。相比于 CRISPR/Cas9 来说, 胞嘧啶碱基编辑系统具有更高的特异性<sup>[52]</sup>。目前经过不同形式的优化, 现在已经有多种版本的 CBEs<sup>[53-55]</sup>, 同时可以根据编辑目的选择窄窗口<sup>[56]</sup>或宽窗口<sup>[57]</sup>等不同形式的编辑系统。胞嘧啶碱基编辑系统已经在多个物种中应用, 展现出了其高效的特性。腺嘌呤碱基编辑器是由 David Liu 实验室开发的, 可以实现碱基由 A 到 G 的替换<sup>[58]</sup>。此系统也广泛应用于动植物领域<sup>[59-61]</sup>。目前碱基编辑系统已经应用在了人胚胎基因编辑领域, 并显示出了不可估量的价值。目前发现的人类遗传疾病有一万多种, 而其中大部分是碱基的替换。碱基编辑系统能够实现 A-G、C-T 或者 T-C、G-A 的替换, 对 50% 以上的遗传突变具有修复的应用价值<sup>[58]</sup>。

2017 年 8 月, 刘见桥课题组发表了在人 3PN 胚胎上利用 BE3 对两个基因位点进行编辑的报道<sup>[14]</sup>。研究通过显微操作注射碱基编辑系统, 对 HEK293 site4 和 *RNF2* 基因进行编辑。结果发现对于 HEK293 site4 位点, 8 个胚胎中有 7 个发生了高效的编辑。通过对其中 3 个胚胎的高通量测序, 发现在 C<sub>5</sub> 位点是 100% 的编辑, 意味着该系统的高效性。另外发现该系统可以对两个位点同时进行编辑, 这对一些多位点突变的疾病提供了修复的可能性。几乎是同一时间, 陈子江课题组也在人的 3PN 胚胎上进行碱基编辑的测试<sup>[62]</sup>。该研究利用 BE3 和 SaKKH-BE3 两种系统对 3 个基因位点进行编辑, 发现利用 BE3 对 *HBB* 位点的编辑效率最高达到 52%; 利用 SaKKH-BE3 对 *FANCF* 位点的编辑中, 发现 3 个胚胎是 100% 的编辑。上述两项研究均表明碱基编辑技术在人胚胎中的高效性。

2017 年 9 月, 黄军就团队发表了利用碱基编辑系统修复一种地中海贫血症的致病突变 *HBB* -28 (A > G)<sup>[63]</sup>。利用来自患者皮肤成纤维细胞或淋巴细胞与去核的卵母细胞融合, 形成了一种重构胚胎。在原核出现的时候, 注射 BE3 的 mRNA 和修复的 sgRNA, 结果表明修复效率达到了 23%。此研究是首次在人胚胎层面利用碱基编辑技术修复一种特定的遗传突变。

2018 年 8 月, 刘见桥团队和黄行许团队合作发表了在人胚胎中利用碱基编辑技术高效修复马凡氏综合征致病基因 *FBNI* 中的一种突变<sup>[64]</sup>。在该研究中, 利用马凡氏综合征患者捐献的精子, 通过单精子注射的方式获得了含有杂合突变的胚胎, 在 2PN 阶段注射相应的碱基编辑系统, 发现在 18 个

胚胎中，经过修复以后有 16 个胚胎表现出了完全正常的基因型，而对照组的 7 个胚胎有 3 个是杂合子。同时作者对应用到的修复 sgRNA 进行了系统脱靶分析，无论是深度测序和全基因组测序均证明使用的 sgRNA 的安全性。本研究的发表受到了广泛的关注，David Liu 表示本研究“很好地展示了如何使用碱基编辑器来修正一个众所周知的点突变”。同时本研究受到 *Science* 杂志及一些专业类网站的关注 (<http://www.sciencemag.org/news/2018/08/scientists-tweak-dna-viable-human-embryos>)。

## 6 问题与展望

基因编辑技术在人胚胎上的应用随着技术的不断优化受到越来越多的关注，而伦理和安全性是其应用于临床不得不考虑的问题。人类基因编辑委员会对基因编辑技术在人胚胎上应用提出的条件与约束是全体从事相关领域人员所必须遵守的。就遗传疾病治疗来说，安全性是最需要考虑的。安全性包括所用试剂的安全性和方法的安全性。目前在人类胚胎上应用到的试剂一种是 Cas9 蛋白，或者是其 mRNA 形式，一种是转录出来的 sgRNA，此外可能还有同源重组的模板 ssODN。对于它们的毒性，在人胚胎上尚无专门研究。但就目前发表的文章来看，注射后的胚胎发育没有明显的变化<sup>[7,62,64]</sup>，这需要更多的数据，或更长时间的体外培养，而体外培养 14 d 的限制可能也影响到对安全性的鉴定。

除了试剂的安全性，方法的安全性可能是目前受关注度最高的。2015 年，黄军就团队文章引起轩然大波，一部分原因是因为结果表明基因编辑方法的低效和脱靶的发生。效率低引起了嵌合体的发生，脱靶可能会破坏其他的正常基因或者对基因组的稳定性造成影响，进而有致癌的风险<sup>[46]</sup>。随后 Shoukhrat Mitalipov 团队通过改进注射方法，将 Cas9 蛋白、sgRNA、修复模板与精子同时注射到卵母细胞，提高了修复效率，降低了嵌合体的发生<sup>[47]</sup>，而碱基编辑系统的出现，更是推进了修复遗传突变的进展。刘见桥团队的研究表明，通过显微注射，运用碱基编辑系统完全有希望百分百修复致病突变<sup>[14,64]</sup>。碱基编辑对点突变的修复具有优势，但目前不是所有的点突变类型都能利用碱基编辑修复，对于一些插入或缺失的突变，碱基编辑还不能做到修复，因此碱基编辑和基于同源重组修复的编辑互为补充。

对基因编辑技术的不断完善使得我们真正在临床上修复遗传疾病，给千万患者家庭带来福音成为

可能。基因编辑可能提高的地方还有很多：(1) 注射方面，如注射方式、注射时间、注射剂量。(2) 编辑技术。开发出更多类型的碱基编辑器，目前只有两种类型碱基编辑器，如 C-G、T-A 替换还不能实现。另外，遗传疾病的修复一般需要精确到单个碱基的替换，因此缩小编辑窗口仍然很重要。(3) 提高同源重组修复效率。有研究表明将修复模板连接到 Cas9 上可以提高 HDR 的效率<sup>[65]</sup>。所以，目前的研究成果对于遗传疾病的修复只是个开始，尚需要更多的研究投入。

基因编辑是一种新型技术，这对于中国科学家而言是一个引领世界研究方向的机会。就目前发表的文章来看，在人生殖细胞基因编辑领域，我们已经走在了世界的前列，但在创新性和深入性等方面我们还比较欠缺。我们应该在人类基因编辑委员会制定的伦理约束下积极参与这一领域的研究，争取获得更多的话语权，在临床应用研究中获得更大的主动权。

## [参 考 文 献]

- [1] Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339: 823-6
- [2] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339: 819-3
- [3] Komor AC, Badran AH, Liu DR. CRISPR-based technologies for the manipulation of eukaryotic genomes. *Cell*, 2017, 168: 20-36
- [4] Cooper ML, Choi J, Staser K, et al. An “off-the-shelf” fratricide-resistant CAR-T for the treatment of T cell hematologic malignancies. *Leukemia*, 2018, 32: 1970-83
- [5] Petropoulos S, Edsgard D, Reinius B, et al. Single-cell RNA-Seq reveals lineage and X chromosome dynamics in human preimplantation embryos. *Cell*, 2016, 165: 1012-26
- [6] Cyranoski D, Reardon S. Embryo editing sparks epic debate. *Nature*, 2015, 520: 593-4
- [7] Ma H, Marti-Gutierrez N, Park SW, et al. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature*, 2017, 548: 413-9
- [8] Pei D, Beier DW, Levy-Lahad E, et al. Human embryo editing: opportunities and importance of transnational cooperation. *Cell Stem Cell*, 2017, 21: 423-6
- [9] Vog G. Embryo edit makes human ‘knockout’. *Science*, 2017, 357: 1225
- [10] Rossant J. Gene editing in human development: ethical concerns and practical applications. *Development*, 2018, 145, pii: dev150888
- [11] Callaway E. Gene-editing research in human embryos gains momentum. *Nature*, 2016, 532: 289-90
- [12] Liang P, Xu Y, Zhang X, et al. CRISPR/Cas9-mediated

- gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell*, 2015, 6: 363-72
- [13] Ishii T. Germ line genome editing in clinics: the approaches, objectives and global society. *Brief Funct Genomics*, 2017, 16: 46-56
- [14] Li G, Liu Y, Zeng Y, et al. Highly efficient and precise base editing in discarded human tripronuclear embryos. *Protein Cell*, 2017, 8: 776-9
- [15] 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
- [16] Fogarty NM, McCarthy A, Sniijders KE, et al. Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis. *Nature*, 2017, 550: 67-73
- [17] Tang L, Zeng Y, Du H, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human zygotes using Cas9 protein. *Mol Genet Genomics*, 2017, 292: 525-33
- [18] Ruzo A, Brivanlou AH. At last: gene editing in human embryos to understand human development. *Cell Stem Cell*, 2017, 21: 564-5
- [19] Cyranoski D. Ethics of embryo editing divides scientists. *Nature*, 2015, 519: 272
- [20] Baltimore D, Berg P, Botchan M, et al. Biotechnology. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science*, 2015, 348: 36-8
- [21] Martikainen M, Pedersen O. Germline edits: heat does not help debate. *Nature*, 2015, 520: 623
- [22] Savulescu J, Gyngell C, Douglas T. Germline edits: trust ethics review process. *Nature*, 2015, 520: 623
- [23] Porteus MH, Dann CT. Genome editing of the germline: broadening the discussion. *Mol Ther*, 2015, 23: 980-2
- [24] Friedmann T, Jonlin EC, King NMP, et al. ASGCT and JSGT joint position statement on human genomic editing. *Mol Ther*, 2015, 23: 1282
- [25] Lanphier E, Urnov F, Haecker SE, et al. Don't edit the human germ line. *Nature*, 2015, 519: 410-1
- [26] Miller HI. Germline gene therapy: we're ready. *Science*, 2015, 348: 1325
- [27] Lunshof JE. Human germ line editing-roles and responsibilities. *Protein Cell*, 2016, 7: 7-10
- [28] Addison C, Taylor-Alexander S. Gene editing and germline intervention: the need for novel responses to novel technologies. *Mol Ther*, 2015, 23: 1678-80
- [29] Thompson C. Human embryos: collect reliable data on embryo selection. *Nature*, 2017, 551: 33
- [30] Regalado A. Engineering the perfect baby. *Technol Rev*, 2015, 118: 26-33
- [31] Cartier-Lacave N, Ali R, Yla-Herttuala S, et al. Debate on germline gene editing. *Hum Gene Ther Methods*, 2016, 27: 135-42
- [32] Ishii T. Reproductive medicine involving genome editing: clinical uncertainties and embryological needs. *Reprod Biomed Online*, 2017, 34: 27-31
- [33] Savulescu J, Pugh J, Douglas T, et al. The moral imperative to continue gene editing research on human embryos. *Protein Cell*, 2015, 6: 476-9
- [34] Ball P. Kathy Niakan: at the forefront of gene editing in embryos. *Lancet*, 2016, 387: 935-5
- [35] Kaiser J. A yellow light for embryo editing. *Science*, 2017, 355: 675
- [36] 范月蕾, 王慧媛, 于建荣. 基因编辑的伦理争议. *科技中国*, 2018: 98-104
- [37] Ormond KE, Mortlock DP, Scholes DT, et al. Human germline genome editing. *Am J Hum Genet*, 2017, 101: 167-76
- [38] Plaza Reyes A, Lanner F. Towards a CRISPR view of early human development: applications, limitations and ethical concerns of genome editing in human embryos. *Development*, 2017, 144: 3-7
- [39] Human embryo research policy update. *Nat Biotechnol*, 2018, 36: 477
- [40] Austin CP, Dawkins HJS. Medical research: next decade's goals for rare diseases. *Nature*, 2017, 548: 158
- [41] Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 2014, 157: 1262-78
- [42] Gross M. Bacterial scissors to edit human embryos? *Curr Biol*, 2015, 25: R439-42
- [43] Ledford H. CRISPR fixes disease gene in viable human embryos. *Nature*, 2017, 548: 13-4
- [44] Egli D, Zuccaro MV, Kosicki M, et al. Inter-homologue repair in fertilized human eggs? *Nature*, 2018, 560: E5-E7
- [45] Schenkwein D, Yla-Herttuala S. Gene editing of human embryos with CRISPR/Cas9: Great promise coupled with important caveats. *Mol Ther*, 2018, 26: 659-60
- [46] Kosicki M, Tomberg K, Bradley A. Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nat Biotechnol*, 2018, 36: 765-71
- [47] Haapaniemi E, Botla S, Persson J, et al. CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. *Nat Med*, 2018, 24: 927-30
- [48] Ihry RJ, Worringer KA, Salick MR, et al. p53 inhibits CRISPR-Cas9 engineering in human pluripotent stem cells. *Nat Med*, 2018, 24: 939-46
- [49] Eid A, Alshareef S, Mahfouz MM. CRISPR base editors: genome editing without double-stranded breaks. *Biochem J*, 2018, 475: 1955-64
- [50] Hess GT, Tycko J, Yao D, et al. Methods and applications of CRISPR-mediated base editing in eukaryotic genomes. *Mol Cell*, 2017, 68: 26-43
- [51] Komor AC, Kim YB, Packer MS, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 2016, 533: 420-4
- [52] Kim D, Lim K, Kim ST, et al. Genome-wide target specificities of CRISPR RNA-guided programmable deaminases. *Nat Biotechnol*, 2017, 35: 475-80
- [53] Koblan LW, Doman JL, Wilson C, et al. Improving cytidine and adenine base editors by expression optimization and ancestral reconstruction. *Nat Biotechnol*, 2018, 36: 843-6
- [54] Li X, Wang Y, Liu Y, et al. Base editing with a Cpf1-cytidine deaminase fusion. *Nat Biotechnol*, 2018, 36: 324-7

- [55] Wang X, Li J, Wang Y, et al. Efficient base editing in methylated regions with a human APOBEC3A-Cas9 fusion. *Nat Biotechnol*, 2018 [Epub ahead of print]
- [56] Kim YB, Komor AC, Levy JM, et al. Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions. *Nat Biotechnol*, 2017, 35: 371-6
- [57] Jiang W, Feng S, Huang S, et al. BE-PLUS: a new base editing tool with broadened editing window and enhanced fidelity. *Cell Res*, 2018 [Epub ahead of print]
- [58] 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
- [59] Liu Z, Chen M, Chen S, et al. Highly efficient RNA-guided base editing in rabbit. *Nat Commun*, 2018, 9: 2717
- [60] Li C, Zong Y, Wang Y, et al. Expanded base editing in rice and wheat using a Cas9-adenosine deaminase fusion. *Genome Biol*, 2018, 19: 59
- [61] Liu Z, Lu Z, Yang G, et al. Efficient generation of mouse models of human diseases via ABE- and BE-mediated base editing. *Nat Commun*, 2018, 9: 2338
- [62] Zhou C, Zhang M, Wei Y, et al. Highly efficient base editing in human trippronuclear zygotes. *Protein Cell*, 2017, 8: 772-5
- [63] Liang PP, Ding CH, Sun HW, et al. Correction of  $\beta$ -thalassemia mutant by base editor in human embryos. *Protein Cell*, 2017, 8: 811-22
- [64] Zeng Y, Li J, Li G, et al. Correction of the Marfan syndrome pathogenic FBN1 mutation by base editing in human cells and heterozygous embryos. *Mol Therapy*, 2018. pii: S1525-0016(18)30378-2
- [65] Aird EJ, Lovendahl KN, St. Martin A, et al. Increasing Cas9-mediated homology-directed repair efficiency through covalent tethering of DNA repair template. *Commun Biol*, 2018, 1: 54