

DOI:10.13350/j.cjpb.190426

• 综述 •

CRISPR/Cas9 技术在人类重要病毒性传染病中的应用*

张珊¹, 胡康洪^{1**}, 魏艳红^{1**}, 孙鸽¹, 孙殿兴²

(1.湖北工业大学生物医学中心,工业微生物湖北省重点实验室,湖北武汉 430068;

2. 中国人民解放军白求恩国际和平医院肝病传染科)

【摘要】 近年来,CRISPR/Cas9 作为一种新型的基因编辑工具,具备特异性强、使用广泛、操作相对简便等特点。通过对病毒基因组进行基因编辑从而干扰病毒复制和清除感染,以及在重要宿主因子、受体靶蛋白等方面应用都具有明显优势。本文着重以 CRISPR/Cas9 技术在一些导致人类重要传染性疾病的病毒如乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、Epstein-Barr 病毒(EBV)、单纯疱疹病毒(HSV)、寨卡病毒(ZIKV)、人类免疫缺陷病毒(HIV)中的应用、面临的技术瓶颈问题和解决方案及治疗前景进行讨论。

【关键词】 CRISPR/Cas9; 乙型肝炎病毒(HBV); 丙型肝炎病毒(HCV); Epstein-Barr 病毒(EBV); 单纯疱疹病毒(HSV); 寨卡病毒(ZIKV); 人类免疫缺陷病毒(HIV); 综述

【中图分类号】 R373 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-5234(2019)04-0491-07

[*Journal of Pathogen Biology*, 2019 Apr; 14(4): 491-496, inside back cover.]

Use of the CRISPR/Cas9 technique in key human viral infectious diseases

ZHANG Shan¹, HU Kang-hong¹, WEI Yan-hong¹, SUN Ge¹, SUN Dian-xing² (1. *Hubei University of Technology, Sino-German Biomedical Center, Wuhan, China* 430068; 2. *Department of Liver Diseases, Bethune International Peace Hospital, Chinese People's Liberation Army*)

【Abstract】 Over the past few years, CRISPR/CAS9 has been developed into an innovative tool for gene editing. The advantages of CRISPR/CAS9 include a high degree of specificity, widely applicable use, and simplicity. The technology has obvious advantages in the following two aspects: 1) through gene editing of a viral genome, it can interfere with viral replication and eliminate infection and 2) it can be used to explore the interaction of viruses with important host factors and receptor target proteins. This review focuses on the recent use of the CRISPR/CAS9 system in various types of viruses that cause human infectious diseases such as hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), Epstein-Barr virus (EBV), herpes simplex virus (HSV), Zika virus (ZIKV), and human immunodeficiency virus (HIV). This review also discusses several bottlenecks faced by the technology, corresponding solutions, and prospects for clinical treatment.

【Key words】 CRISPR/Cas9; hepatitis B virus (HBV); hepatitis C virus (HCV); Epstein-Barr virus (EPV); herpes simplex virus (HSV); Zika virus (ZIKV); human immunodeficiency virus (HIV); review

***近几年来,CRISPR/Cas9 系统作为一个新型工具在基因编辑领域中日益发挥着重要作用。CRISPR 系统来源于细菌和古细菌的可选择性免疫系统^[1],它利用两种不同的小的 RNA: CRISPR RNA(crRNA)与反式激活 crRNA(transcrRNA),和 Cas 蛋白组成核糖核蛋白复合物。这种复合物可以特异性降解外来入侵的病毒核酸^[2-3]。Cas 蛋白介导的 DNA 切除需要使目标序列和 crRNA 之间互补以及原始间隔子邻接基序(PAM)序列的存在。而 Cas9 蛋白是属于第二类型的 CRISPR/Cas 系统。这个系统开发了由 crRNA/tracerRNA 和 Cas9 蛋白组合而成的嵌合单引导 RNA(sgRNA)^[4]。sgRNA 通过识别 PAM 序列和互补的靶序列引导 Cas9 蛋白切割特定的 DNA 序列,并因此产生双链断裂的 DNA 片段(DSBs)。这些 DSBs 通过同源定向修复(HDR)或非同源末端连接(NHEJ)进行修复,导致精确的 DNA 序列的插入或缺失^[5]。

利用这个双组分系统可以靶向任何带 PAM 形式的 DNA 序列。因此 CRISPR/Cas9 系统应用在乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、Epstein-Barr 病毒(EBV)、单纯疱疹病毒

(HSV)、寨卡病毒(ZIKV)、艾滋病毒(HIV)等几类导致人类重要传染性疾病的病毒中,通过基因编辑病毒基因组干扰复制和清除感染,得到了显著的结果^[6-11]。

1 乙型肝炎病毒(HBV)

全世界有超过 2.5 亿人慢性感染 HBV,并且增加了罹患肝纤维化、肝硬化和肝细胞癌的风险,导致每年约 65 万人死亡^[12]。由于病毒 RNA 转录的模板 cccDNA(covalently closed circular DNA,cccDNA)稳定地存在于未分裂的肝细胞中,乙肝病毒能够持续感染肝细胞。而核苷类似物的抗病毒疗法只能抑制感染肝细胞质中核衣壳内 HBV DNA 的合成,但不能够

* **【基金项目】** 湖北省自然科学基金重点项目(No. 2014CFA075)。

** **【通讯作者】** 胡康洪, E-mail: hukh@hbut.edu.cn
魏艳红, E-mail: weiyanhong925@163.com

【作者简介】 张珊(1994-),女,河北人,硕士研究生,从事分子病毒学研究。E-mail: 1219101993@qq.com

损害存在于细胞核内的 cccDNA^[13]。CRISPR/Cas 系统可以作为一种解决方法消除或者功能性失活细胞核内 cccDNA,从而有望彻底解决 HBV 感染问题^[14]。

有科学家利用 CRISPR/Cas9 系统靶向 HBV 基因组的开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)来剪切 HBV DNA 获得一些成果。2014 年, Lin 等^[15]率先报道 CRISPR/Cas9 系统在体内和体外两种体系中都可以破坏 HBV 基因组。在 Huh-7 细胞中共转染 HBV、单独的 gRNA 以及 Cas9 表达载体,利用这个针对 HBV 特异性的 gRNA, CRISPR/Cas9 系统显著降低了 HBV 核心抗原(HBcAg)和表面抗原(HBsAg)的产生。此外,他们使用高压尾静脉水动力小鼠模型,使得 CRISPR/Cas9 系统有效切割肝内含有 HBV 基因组的质粒,并促进其清除,并降低血清中表面抗原(HBsAg)水平。Seeger 等^[6]的研究显示,在表达 HBV 受体牛磺胆酸钠共转运多肽(NTCP)的 HepG2 细胞中使用 CRISPR/Cas9 系统,可以将 HBV 感染抑制高达 8 倍。2015 年,多个研究组进一步应用 CRISPR/Cas9 系统靶向 HBV 基因组。首先,在持续性 HBV 感染 HepAD38 和从头感染 HepaRG 两种体外细胞模型中, Kennedy 等^[16]使用慢病毒转导细菌 Cas9 基因和 HBV 特异性单一指导 RNA(sgRNA),有效抑制了 HBV DNA 的产生。特异的 Cas9/sRNA 组合将总病毒 DNA 水平降低高达约 1 000 倍,并将 HBV cccDNA 水平降低约 10 倍,并使大部分残余病毒 DNA 突变灭活。Liu 等^[17]研究显示 HBV 特异性 gRNA/Cas9 可在体内和体外抑制不同基因型 HBV 的复制,并且通过单一 gRNA/Cas9 系统显著降低病毒 DNA,并通过不同的 gRNA/Cas9 系统组合清除。在 HepG2.2.15 细胞和体内高压尾静脉水动力小鼠模型中, Zhen 等^[18]利用 CRISPR/Cas9 系统靶向 HBsAg 编码区。研究显示 CRISPR/Cas9 降低了细胞培养物和小鼠血清中 HBsAg 分泌水平。该系统可以有效抑制 HBV 的复制和表达。Dong 等^[19]研究显示, sgRNA/Cas9 的表达降低了转染 precccDNA 的 Huh7 细胞以及 HepG2.2.15 细胞中 HBV 的复制,并且在带有 cccDNA 的新的小鼠模型中,还可以降低 cccDNA 和 HBV 相关蛋白的表达。Ramanan 等^[20]研究显示, CRISPR/Cas9 系统可以特异性地靶向和切割 HBV 基因组中的保守区域,有效抑制病毒基因表达和复制。Wang 等^[21]研究显示双 gDNA 可以高效抑制 HBV(基因型 A-D)的复制与表达。Karimova 等^[22]利用 CRISPR/Cas9 系统可以破坏 HeLa 和 HEK293 两种细胞系中 HBV cccDNA 和整合的 HBV 序列。此外,通过特异性靶向 HBV S 区和 X 区的保守序列抑制了持续感染和从头感染的肝癌细胞系中 HBsAg 表达。2016 年,运用 HepG2.A64 细胞系和体内高压尾静脉水动力小鼠模型, Li 等^[23]采用 CRISPR/Cas9 系统靶向 HBV S 区的保守序列,发现抑制 HBV 复制和表达。2017 年, Li 等^[24]完全切除了全长 3 175bp 的整合 HBV DNA 片段,并破坏了 HepG2.A64(CCTCC C 201163)单克隆细胞系中的 HBV cccDNA。总之,这些研究体现了在切除 HBV 基因组方面具有非常有效的成果,都有效抑制了 HBV 复制及表达,体现了 CRISPR 系统在抗 HBV 应用方面的巨大潜能。

2 丙型肝炎病毒(HCV)

丙型肝炎病毒(HCV)引起慢性丙型肝炎,慢性丙型肝炎持续进展后,发生肝硬化,最后可能发展为肝细胞癌。全世界约

有 1 亿 8 千万人感染了丙型肝炎病毒,目前没有研制成功的丙肝疫苗投入应用^[25]。在最近的研究中,直接作用抗病毒药物(DAAs)对丙型肝炎(HCV)的治疗非常有效,针对丙型肝炎的治愈率超过 90%,甚至部分研究达到 100%^[26]。但是, CRISPR/Cas9 系统在研究 HCV 相关分子机制方面十分有用。

2015 年, Ren 等^[7]利用一种活细胞报告基因称为 NlrD(NS3-4A 诱导型 rtTA 介导的双报告基因)系统与 CRISPR/Cas9 系统将 CLDN1、OCLN 和 CD81 鉴定为 HCV 的无细胞进入和细胞间传递的必需基因。HCV 慢性感染肝脏后诱导一系列宿主因子,包括干扰素(IFN)刺激的基因 ISG15,它是一种限制病毒复制的抗病毒因子^[27]。Domingues 等^[28]利用 CRISPR/Cas9 系统基因敲除 ISG15,结果显示 ISG15 在 IFN 刺激存在和不存在的条件下都损害 HCV RNA 复制。ISG15 与蛋白质底物的偶联通常需要 E3 连接酶 HERC5, ISG15 抑制 HCV RNA 复制不需要通过 HERC5 E3 连接酶与蛋白质底物结合。2017 年, Senis 等^[29]使用 TALE 或 CRISPR/Cas9 将抗 HCV 的 shmiRNA 特异性整合到肝脏特异性 miR-122/her 基因座位上,目的是获得具有遗传上的 HCV 感染保护作用的细胞克隆。IFN- α 和 IFN- λ 是结构上不同的细胞因子,结合不同的受体,通过 JAK-STAT 途径诱导相似基因组的表达^[30]。2016 年, Yamauchi 等^[31]利用 CRISPR/Cas9 系统检测 STAT1 和 STAT2 在 IFN- α 和 IFN- λ 抑制 HCV 复制中的作用。miRNA 是一类非编码小 RNA 分子,约 22 个核苷酸,通过 RNA 沉默和转录后调控来调节基因表达^[32]。在感染了 HCV 的患者活检标本和培养的细胞中能检测到 miR-130a。2018 年, Duan 等^[33]将 miR-130a 及其靶基因过表达或通过使用 siRNA 或使用 CRISPR/Cas9 技术将靶基因敲低,证实 miR-130a 可以通过中枢代谢途径调节 HCV 复制。总的来看, CRISPR/Cas9 应用在 HCV 上主要还是探究 HCV 相关的一些机制,并不只是单独应用而是常和其他一些生物技术联合使用。

3 Epstein-Barr 病毒(EBV)

Epstein-Barr 病毒(EBV)引起传染性单核细胞增多症并且与某些形式的淋巴瘤和一些人类癌症相关,例如伯基特淋巴瘤和鼻咽癌^[34]。在我国南方,由 EBV 所导致的鼻咽癌(NPC)具有高发病率,估计为每 10 万人年 20 至 50 人,主要影响中年人群,尤其是在广东省和香港居住的男性^[35]。病毒经口密切接触为主要传播途径,目前没有 EBV 疫苗或有效治疗方法。

CRISPR/Cas9 系统在 EBV 上的应用包括基因组编辑和病毒潜伏感染的破坏以及 EBV 分子机制的探究。CRISPR/Cas9 定向诱变可以向病毒基因组引入类似类型的突变,利用细菌人工染色体重组工程成功地维持和重建病毒基因组。CRISPR/Cas9 介导的切割能够以很高的效率和精确度操纵与疾病相关的病毒株。Kanda 等^[36]利用 CRISPR/Cas9 介导的病毒基因组链断裂和随后的同源定向修复获得 EBV 附加体的细菌人工染色体(BAC)克隆,获得了两个胃癌细胞系(SNU719 和 YCCCL1)中的 EBV 毒株,并鉴定了它们的完整病毒基因组序列。

作为一种抗病毒治疗策略,利用 CRISPR/Cas9 系统在潜伏感染期间特异性靶向病毒基因组,用于减弱病毒复制和清除潜伏病毒感染。Ferdy 等^[8]研究显示,通过 CRISPR/Cas9 系统靶向对病毒生存重要的病毒遗传元件,几乎可以完全将 EBV

从潜伏感染的 EBV 转化的人肿瘤细胞中清除。

另外, EBV 的相关分子机制研究还在进行中, 利用 CRISPR/Cas9 的基因编辑方法可以帮助探究其分子机制。在几种人类上皮细胞中潜伏感染 EBV, 包括鼻咽癌 C666-1 细胞, Yuen 等^[37]通过 CRISPR/Cas9 对人类细胞中的 EBV 进行基因编辑使编码病毒 miRNA 的 BART(BamHI A 右侧转录物)的启动子区域中 558 bp 的靶向缺失, 使得 BART miRNA 丧失表达活性, 证实 BART 启动子是作为 BART RNA 的主要启动子, 使 BART 转录物表达。EBV 裂解再激活受 EBV 基因 BZLF1 编码的转录因子 Zta(ZEBRA)的表达调节, 而 TLR9 抑制 BZLF1 表达^[38]。Jordi 等^[39]通过 CRISPR/Cas9 诱导的 TLR9、MyD88、IRAK4 和 IRAK1 的失活, 证实 BZLF1 表达抑制依赖于功能性 TLR9 和 MyD88 信号传导, 鉴定出 IRAK4 是在 BCR 交联时 TLR9 诱导的 BZLF1 表达抑制的必需元件; 并且 MyD88 和 IRAK4 在这过程中发挥作用, 有利于 EBV 在宿主 B 细胞库中的持久性。干扰素调节因子 8(IRF8)在正常 B 细胞分化中起关键作用, 该细胞分化是与 EBV 再激活有内在联系的细胞过程^[40]。Lv 等^[41]研究显示, 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑消耗 IRF8, 抑制裂解诱导后 EBV 的再激活。Ma 等^[42]利用 CRISPR/Cas9 对伯基特淋巴瘤(BL)和淋巴母细胞样细胞系(LCL)进行了平行全基因组功能丧失筛选, 寻找到 EBV 转化的 B 细胞宿主依赖因子, 揭示了 EBV 癌蛋白激活 PI3K/AKT 通路并逃避肿瘤抑制反应的关键机制。为了对抗 EBV 相关疾病, 了解 EBV 裂解复制周期的分子机制, Masud 等^[43]研究 EBV 裂解基因 BKRF4, 使用细菌人工染色体(BAC)和 CRISPR/Cas9 系统构建了 BKRF4 敲除突变体。结果显示 BKRF4 基因参与感染性病毒粒子的产生。总之, CRISPR/Cas9 在探索 EBV 相关分子机制方面是一种重要工具。

4 单纯疱疹病毒(HSV)

单纯疱疹病毒(HSV)主要有两个血清型: HSV-1 和 HSV-2。HSV-1 主要引起生殖器以外的皮肤、口腔粘膜和脑的感染; HSV-2 主要引起生殖器部位皮肤粘膜感染, 其引起多种皮肤病, 包括复发性唇疱疹, 生殖器疱疹和卡波西氏水痘疹(湿疹)等威胁生命的疾病, 如疱疹性脑炎和新生儿疱疹^[44]。HSV 是人类最常见的病原体, 世界人口超过 80% 感染过 HSV, 一旦感染则终身潜伏^[45]。至今还没有针对 HSV 潜伏感染的有效治疗手段。

CRISPR/Cas9 系统应用于 HSV, 主要是通过工程、靶向、激活或抑制特定目的基因^[46]。Turner 等^[47]使用 CRISPR/Cas9 介导的基因组工程创建 TorA 和 TorB 单敲除和双敲除(KO)的细胞系以及它们的激活剂 LAP1 和 LULL1, 以研究对 HSV-1 产生的影响。发现 LULL1 是 HSV-1 高效生长所必需的。Russell 等^[48]通过感染/转染病毒的方法, 与 CRISPR/Cas9 联用, 利用 CRISPR/Cas9 核酸酶的重组位点靶向 HSV。ICP0 是刺激 HSV-1 基因表达和复制的关键蛋白, Roehm 等^[48]通过 CRISPR/Cas9 系统靶向 ICP0 序列, 使其失活, 发现能够降低 HSV-1 感染性。Ferdy 等^[49]利用 CRISPR/Cas9 系统靶向 HSV 的基因组, 能够有效消除 HSV-1 复制。甚至用多种 gRNA 同时靶向 HSV-1 时, 可以完全消除细胞中感染性病毒颗粒的产生。Finnen 等^[50]利用 CRISPR/Cas9 将 HSV 毒株 UL21 基因进行突变, 来了解 UL21 基因编码的病毒蛋白 pU21

在 HSV 的感染中的差异性要求。CRISPR 在 HSV 的应用目前还处于初步阶段, 在探究 HSV 的相关机制中 CRISPR 系统具有一定优势。在工程化研究中, CRISPR 与其他的相关生物技术的结合也有很大潜力。

5 寨卡病毒(ZIKV)

ZIKV 通过蚊虫传播, 在极少数情况下, 病毒也通过性传播或母婴传播^[51]。ZIKV 感染已经通过国际旅行进一步传播, 并已扩展到南美洲、中美洲和北美洲人口密集的大区域^[52]。ZIKV 感染者中, 只有约 20% 会表现轻微症状, 典型的症状包括急性起病的低热、斑丘疹、关节疼痛(主要累及手、足小关节)、结膜炎, 其他症状包括肌痛、头痛、眼眶痛及无力。另外少见的症状包括腹痛、恶心、呕吐、黏膜溃疡和皮肤瘙痒^[53]。孕妇感染 ZIKV 后, 其产下的婴儿会出现小头症^[54]。2016 年 9 月, 美国过敏和传染病研究所科研人员在《科学》杂志发表论文称, 他们开发出全新的 DNA 寨卡疫苗, 动物实验证明, 这种疫苗能阻止猴子感染 ZIKV, 该疫苗已经进入人体临床试验阶段^[55]。2018 年, 中科院武汉病毒所王汉中研究员团队成功利用合成工程技术研制出新型 ZIKV 弱毒疫苗^[56]。

CRISPR/Cas9 系统在 ZIKV 上的应用主要集中在快速检测诊断以及探究其分子机制两方面, ZIKV 的暴发需要低成本快速诊断手段。Pardee 等^[11]将等温 RNA 扩增与终止转换 RNA 传感器连接来检测临床标本中的 ZIKV 序列, 然后与 CRISPR/Cas9 结合使用时, 可以区分具有单碱基分辨率的病毒株。实验结果显示, 可以成功从病毒血症猴血浆中检测出 ZIKV。Meagher 等^[57]使用纸质传感器与 CRISPR/Cas9 结合检测 ZIKV RNA。

ZIKV 在世界上大范围传播, 但是一些相关的分子机制却还没有清晰。CRISPR 系统在探究 ZIKV 分子机制方面有很大帮助。Savidis 等^[58]使用 RNAi 和 CRISPR/Cas9 方法进行直系同源功能基因组筛选, 来鉴定 ZIKV 的宿主细胞依赖性, 结果显示筛选恢复了 ZIKV 进入因子 AXL 以及涉及内吞作用的多种宿主因子。Wells 等^[59]利用 CRISPR/Cas9 将 AXL 基因敲除, 随后发现 ZIKV 可以感染并杀死 AXL 敲除的人类神经祖细胞。Estoppey 等^[60]用一种名为 cavinafungin 的抗黄病毒的天然产物对抗 ZIKV, 经过 CRISPR/Cas9 谱分析将 ER 信号肽酶鉴定为 cavinafungin 的靶标。Viperin 是一种相关干扰素刺激基因(ISG), 具有针对多种病毒的抗病毒活性。Van 等^[61]研究显示 viperin 在培养细胞中的表达损害了 ZIKV 复制, 而 CRISPR/Cas9 系统处理 viperin 后, ZIKV 复制水平没有之前抑制的严重。结果表明, ZIKV 可以减弱 ISG 表达, 从而避免细胞的抗病毒反应, 使病毒无法复制。ER α -葡萄糖苷酶抑制剂对登革热病毒、埃博拉病毒、马尔堡病毒等病毒具有抗病毒功效。Ma 等^[62]使用 CRISPR/Cas9 建立了敲除 ER α -葡萄糖苷酶 I 或 II 的 Huh7.5 衍生细胞系, 结果显示, ER α -葡萄糖苷酶抑制剂完全抑制 ER α -葡萄糖苷酶 I 或 II, 并部分抑制病毒复制。总体而言, CRISPR/Cas9 系统在 ZIKV 上的报道不多, 但从至今的研究中, 已看到 CRISPR 系统在该病毒相关机制研究中的优势及潜力。

6 人类免疫缺陷病毒(HIV)

人类免疫缺陷病毒(HIV)是造成艾滋病的一种 RNA 病毒。目前, 全世界有超过 3500 万人感染艾滋病, 感染最严重

的地区是撒哈拉以南非洲^[63]。HIV 直接侵犯人体的免疫系统,破坏人体的细胞免疫和体液免疫。它主要通过性接触传播、血液传播、母婴传播三种方式扩散。HIV-1 型是该病毒最常见的类型^[64]。目前的抗逆转录病毒治疗,能够抑制病毒在支持 HIV-1 感染的细胞中的复制,并有效降低血浆病毒血症。HIV-1 可以永久地整合到宿主基因组中,因此即使在有效的抗逆转录病毒治疗后也不能避免持久的病毒库和病毒再激活的风险,艾滋病还是不能治愈。

Ebina 等^[10,65]使用 CRISPR/Cas9 系统靶向整合在细胞基因组中潜伏感染的 HIV-1 LTR。以这种方式,可以使小胶质细胞、前突细胞和 T 细胞中潜伏感染的病毒基因不能表达和复制,并且可以鉴定完全切除整合的原病毒的 HIV-1 前病毒基因组中的特定靶标,以及针对 HIV-1 的特异性 gRNA 和 Cas9 的存在阻止了 HIV-1 感染^[65]。因此,CRISPR/Cas9 系统在 HIV 中具有治疗潜能。Liao 等^[66]将 CRISPR/Cas9 系统用于人体细胞内防御外来 DNA 和病毒,并使用 HIV-1 感染作为模型。结果表明 CRISPR/Cas9 系统能够破坏潜在整合的病毒基因组,并且能长期适应性防御人类细胞中新病毒感染、表达和复制。Zhu 等^[67]测试了可被 CRISPR/Cas9 靶向的 HIV-1 DNA 中的 10 个位点,将工程化的 CRISPR/Cas9 系统引入到被 HIV-1 潜伏感染的 JLat10.6 细胞中。结果显示 CRISPR/Cas9 复合物在潜伏感染的 Jurkat 细胞中有效地突变和灭活 HIV-1 前病毒 DNA。Wang 等^[68]研究结果显示 HIV-1 感染的细胞可以通过双 gRNA CRISPR/Cas9 处理实现功能性治愈。

CRISPR/Cas9 系统还应用在 HIV 感染过程中相关蛋白质

的基因编辑。Li 等^[69]通过腺病毒递送的 CRISPR/Cas9 对 CCR5 基因编辑,可以抑制原代 CD4⁺ T 细胞的 HIV-1 感染。CXCR4 是 HIV-1 感染的共同受体,并且被认为是 AIDS 的重要治疗靶标。Hou 等^[70]利用 CRISPR/Cas9 对 CXCR4 进行基因编辑,使人原代 CD4⁺ T 细胞具有 HIV-1 抗性。Kang 等^[71]使用单一 gRNA 和双 gRNA 的 CRISPR/Cas9 在 GFP 标记的人诱导多能干细胞(iPSC)中成功靶向 CCR5。结果显示免疫细胞对 CCR5-向性 HIV-1 病毒的选择性具有抗性。Xu 等^[72]在人 CD34⁺ HSPCs 中建立了 CRISPR/Cas9 基因编辑系统,并在长期重建的 NOD/Prkdcscid/IL-2R γ null 小鼠中实现了有效的 CCR5 消融,并且观察到 HIV-1 抗性效应。Yu 等^[73]通过 CRISPR/Cas9 同时敲除 CD4⁺ T 细胞中的 CXCR4 和 CCR5 基因,可以对 X4-和 R5-向性 HSV-1 感染产生抗性。CRISPR/Cas9 系统应用于基因编辑 HIV 的基因组,给 HIV 未来治疗提供了新的可能,并且也得到了一些成功的结果。CRISPR 系统也可以探究 HIV 相关蛋白对 HIV 的影响。

7 CRISPR/Cas9 技术面临的技术瓶颈

CRISPR/Cas9 系统作为一种新型靶向 DNA 的基因编辑工具,目前除了上述所列举的病毒外(表 1),它在埃博拉病毒(EBoV)、Kaposi 肉瘤相关疱疹病毒(KSHV)、JC 多瘤病毒(JCV)等病毒中也有所应用。但是,目前 CRISPR/Cas9 技术大部分应用仍停留于细胞模型和动物模型阶段。从临床前研究进入临床试用的突破,尚需克服脱靶效应、递送工具的优化及递送效率低、伦理学批文等诸多技术瓶颈问题(表 1)。

表 1 CRISPR/Cas9 在几种人类重要传染性病毒上的应用
Table 1 Application of CRISPR/Cas9 in several important viruses which causes human infectious diseases

病毒名称	种类特征	靶向位置	研究模型	作用	效果	CRISPR/Cas9 系统面临的问题
HBV	DNA 病毒,基因组为部分双螺旋的环状 DNA	HBV 基因组的开放阅读框(S区,C区,P区,X区)	细胞模型 动物模型	特异性地靶向和切割 HBV 基因组中的保守区域	有效抑制了病毒基因表达和复制	不能彻底消除病毒 ^[18] ;潜在的脱靶效应 ^[15-22] ;在病毒基因组靶点位置的选择会影响切割效率 ^[20] ;在高压尾静脉水动力小鼠模型中,血清中的 HBsAg 降低,但在 CRISPR/Cas9 处理后仍然存在。需要具有高载体与靶细胞比率的有效递送系统,例如腺病毒或腺相关病毒载体,以携带 CRISPR/Cas9 系统 ^[15] 。
HCV	RNA 病毒,基因组为单股正链 RNA	对病毒适应性重要的病毒遗传元件;相关具有抗病毒活性的基因	细胞模型	探究 HCV 相关的分子机制	揭示调节 HCV 的分子机制	脱靶效应 ^[29] ;CRISPR 系统及其与基因递送载体的相容性 ^[29] 。
EBV	DNA 病毒,基因组是线性双链 DNA	EBV 基因组的开放阅读框;对病毒适应性重要的病毒遗传元件;	细胞模型	使病毒基因组链断裂;探究相关元件分子机制	减弱病毒复制和清除潜伏病毒感染;揭示相关元件的分子机制	脱靶效应 ^[37] ;靶点位置不同,会影响 CRISPR/Cas9 活性 ^[37] 。
HSV	DNA 病毒,基因组为双链线性 DNA	HSV 的基因组;对病毒适应性重要的病毒遗传元件	细胞模型	特异性靶向和断裂 HSV 的基因组 DNA;探究相关元件分子机制	有效消除 HSV 复制和抑制表达;揭示相关元件的分子机制	脱靶效应 ^[37] ;靶点位置不同,会影响 CRISPR/Cas9 活性 ^[37] 。
ZIKV	RNA 病毒,基因组为单股正链 RNA	将基因组扩增后的序列;相关具有抗病毒活性的基因	细胞模型	快速检测诊断;探究 ZIKV 复制的分子机制	方便临床检测样本中 ZIKV 序列;揭示 ZIKV 复制的分子机制	在利用 CRISPR/Cas9 筛选基因组中,使用细胞存活作为读数显示,灵敏度有限 ^[57] 。
HIV	RNA 病毒,基因组为两条相同的正链 RNA	HIV 复制周期中的 DNA 中间体; HIV 感染过程中相关蛋白质的基因	细胞模型	特异性靶向和切割 HIV 复制周期中的 DNA 中间体;适应性防御人类细胞对 HIV 感染过程中相关蛋白质的基因进行基因编辑	破坏潜在整合的病毒基因组,并且能长期适应性防御人类细胞中新病毒感染、表达和复制;揭示 HIV 相关蛋白对 HIV 的影响	脱靶效应,可能导致非特异性基因修饰事件发生 ^[10] ;CRISPR/Cas9 系统靶向高度可变的病毒 HIV,功效在很大程度上取决于 gRNA 与靶病毒 DNA 序列的匹配程度 ^[65] ;产生病毒逃逸 ^[66,74,75] 。

有研究显示,CRISPR/Cas9 系统的脱靶活性具有很高的发生率,即使 sgRNA 具有多达 5 个核苷酸,错配的几率也会发生^[76]。为解决这一问题,产生了一些减少脱靶效应发生的方法:例如," 配对切口" 策略;在互补靶向序列的 5' 末端截短 sgRNA;将催化失活的 Cas9 与 Fok I 核酸酶融合使之成为另一种变体 Cas9 (fCas9)^[77-79]。虽然这些方法可以减少脱靶发生,但效率仍然很低。关于 CRISPR/Cas9 递送问题也是在应用中面临的挑战,包括现有递送工具效率不高以及递送工具缺乏生物安全性等问题。不过,在最近的一些研究中,在递送工具方面有了新的进展。例如,低免疫原性的腺相关病毒(AAV)与特异性整合蛋白和受体结合后,通过内吞作用进入细胞,整合到宿主基因组中,这被称为 AAVS1 的特定位置。这种方法避免了不可预测的插入突变和其他有害后果^[80]。利用这种方法与 CRISPR/Cas9 系统结合,可以大大提高基因敲入的效率^[81]。单次施用可生物降解且耐受性良好的脂质纳米粒(LNP)递送 CRISPR/Cas9 组分,可以实现高效的体内基因组编辑^[82]。将新发现的较小 Cas9 及其 gRNA 包装到一个 AAV 递送载体中,可以进行有效的体内基因组编辑。另外,为提高体内应用的效率和准确度,所用 CRISPR/Cas9 还应具有能够克服递送工具的免疫原性和毒性的特点^[83]。最后,CRISPR/Cas9 应用面临的医学伦理学问题,比如,是否应该对人类种系进行修饰具有争议,这也是对人类安全和道德的挑战。CRISPR/Cas9 在纠正或预防遗传疾病不良影响的临床应用中,尚存在无法预见的风险。特别是,当事人知情同意的问题以及使用优生学的风险。最近,中国科学家贺建奎声称已" 创造" 了第一批基因编辑的婴儿,这些婴儿被设计为对 HIV 具有天然免疫力。这一消息立即引发了对贺建奎基因实验的伦理合法性的广泛批评,谴责和争论^[84]。为此,需要通过全球对话讨论制订严格的法规,以确保合理使用 CRISPR 介导的基因编辑技术^[85]。

8 展望

CRISPR/Cas9 技术虽然应用时间不长,但在针对造成人类重要病毒性传染性方面却展现了强大的应用潜能。其快捷、便利、简易的特点,在基因编辑病毒基因组从而清除感染方面具备优势。与该技术相比较,美国生物技术公司 Arrowhead 所研发的抗乙肝 RNAi 药物 ARC-520 已获 FDA 批准,目前已进入临床 IIb 期试验。我们有理由相信,CRISPR/Cas9 技术也可能在不久的将来应用于临床。虽然 CRISPR/Cas9 系统现在仍然还面临一些尚未解决的问题,但是,它在基因编辑领域所发挥的优势和潜力日益明显,在病毒性疾病的基础研究和治疗方面具有巨大应用前景。

【参考文献】

[1] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. Science, 2007, 315(5819): 1709-12.
[2] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III[J]. Nature, 2011, 471(7340): 602-7.
[3] Terns RM, Terns MP. CRISPR-based technologies: prokaryotic defense weapons repurposed[J]. Trends Genet, 2014, 30(3): 111-8.
[4] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-

RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. Science, 2012, 337(6096): 816-21.
[5] Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering[J]. Cell, 2014, 157(6): 1262-78.
[6] Seegar C, Sohn JA. Targeting hepatitis B virus with CRISPR/Cas9[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2014(3): e216.
[7] Ren Q, Li C, Yuan P, et al. A dual-reporter system for real-time monitoring and high-throughput CRISPR/Cas9 library screening of the hepatitis C virus[J]. Sci Rep, 2015(5): 8865.
[8] van Diemen FR, Kruse EM, Hooykaas MJ, et al. CRISPR/Cas9-mediated genome editing of herpesviruses limits productive and latent infections[J]. PLoS Pathog, 2016, 12(6): e1005701.
[9] Russell TA, Stefanovic T, Tschärke DC. Engineering herpes simplex viruses by infection-transfection methods including recombination site targeting by CRISPR/Cas9 nucleases[J]. J Virol Methods, 2015(213): 18-25.
[10] Ebina H, Misawa N, Kanemura Y, Koyanagi Y. Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus[J]. Sci Rep, 2013(3): 2510.
[11] Pardee K, Green AA, Takahashi MK, et al. Rapid, low-cost detection of Zika virus using programmable biomolecular components[J]. Cell, 2016, 165(5): 1255-66.
[12] Ott JJ, Stevens GA, Groeger J, et al. Global epidemiology of hepatitis B virus infection; new estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity[J]. Vaccine, 2012(30): 2212-19.
[13] Ji M, Hu K. Recent advances in the study of hepatitis B virus covalently closed circular DNA[J]. Virol Sin, 2017, 32(6): 454-64.
[14] Seeger C, Sohn JA. Complete Spectrum of CRISPR/Cas9-induced Mutations on HBV cccDNA[J]. Mol Ther, 2016, 24(7): 1258-66.
[15] Lin SR, Yang HC, Kuo YT, et al. The crispr/cas9 system facilitates clearance of the intrahepatic hbv templates in vivo[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2014(3): e186.
[16] Kennedy EM, Bassit LC, Mueller H, et al. Suppression of hepatitis B virus DNA accumulation in chronically infected cells using a bacterial CRISPR/Cas RNA-guided DNA endonuclease[J]. Virology, 2015(476): 196-205.
[17] Liu X, Hao R, Chen S, et al. Inhibition of hepatitis B virus by the CRISPR/Cas9 system via targeting the conserved regions of the viral genome[J]. J Gen Virol, 2015, 96(8): 2252-61.
[18] Zhen S, Hua L, Liu YH, et al. Harnessing the clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated Cas9 system to disrupt the hepatitis B virus X. [J]. Gene Ther, 2015, 22(5): 404-12.
[19] Dong C, Qu L, Wang H, et al. Targeting hepatitis B virus cccDNA by CRISPR/Cas9 nuclease efficiently inhibits viral replication [J]. Antiviral Res, 2015(118): 110-7.
[20] Ramanan V, Shlomai A, Cox DB, et al. CRISPR/Cas9 cleavage of viral DNA efficiently suppresses hepatitis B virus[J]. Sci Rep, 2015(5): 10833
[21] Wang J, Xu ZW, Liu S, et al. Dual gRNAs guided CRISPR/Cas9 system inhibits hepatitis B virus replication[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(32): 9554-65.

- [22] Karimova M, Beschoner N, Dammermann W, et al. CRISPR/Cas9 nickase-mediated disruption of hepatitis B virus open reading frame S and X[J]. *Sci Rep*, 2015(5): 13734.
- [23] Li H, Sheng C, Liu H, et al. An Effective Molecular Target Site in Hepatitis B Virus S Gene for Cas9 Cleavage and Mutational Inactivation[J]. *Int J Biol Sci*, 2016, 12(9): 1104–13.
- [24] Li H, Sheng C, Wang S, et al. Removal of Integrated Hepatitis B Virus DNA Using CRISPR-Cas9[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017(7): 91.
- [25] Piccitotto A, Varagona G, Valle F, et al. Interferon therapy in chronic hepatitis C: Evaluation of a low dose maintenance schedule in responder patients[J]. *J Hepatol*, 1993, 17(3): 359–63.
- [26] Teixeira L, Fonseca C, Sousa S, et al. Safety of Etanercept in the treatment of rheumatic disease patients with Hepatitis C virus infection[J]. *Acta Reumatol Port*, 2018, 43(2): 159–60.
- [27] Jeon YJ, Yoo HM, Chung CH. ISG15 and immunediseases[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1802(5): 485–96.
- [28] Domingues P, Bamford CG, Boutell C, et al. Inhibition of hepatitis C virus RNA replication by ISG15 does not require its conjugation to protein substrates by the HERC5 E3 ligase[J]. *J Gen Virol*, 2015, 96(11): 3236–42.
- [29] Senis E, Mockenhaupt S, Rupp D, et al. TALEN/CRISPR-mediated engineering of a promoterless anti-viral RNAi hairpin into an endogenous miRNA locus[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(1): e3.
- [30] Plataniotis LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling[J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(5): 375–86.
- [31] Yamauchi S, Takeuchi K, Chihara K, et al. STAT1 is essential for the inhibition of hepatitis C virus replication by interferon- λ but not by interferon- α [J]. *Sci Rep*, 2016(6): 38336.
- [32] Ambros V. The functions of animal microRNAs[J]. *Nature*, 2004, 431(7006): 350–5.
- [33] Duan X, Li S, Holmes JA, et al. MicroRNA 130a Regulates both Hepatitis C Virus and Hepatitis B Virus Replication through a Central Metabolic Pathway[J]. *J Virol*, 2018, 92(7): e02009–17.
- [34] Pagano JS. Epstein-Barr virus: the first human tumor virus and its role in cancer[J]. *Proc Assoc Am Physicians*, 1999, 111(6): 573–80.
- [35] Ji MF, Huang QH, Yu X, et al. Evaluation of plasma Epstein-Barr virus DNA load to distinguish nasopharyngeal carcinoma patients from healthy high-risk populations in Southern China[J]. *Cancer*, 2014, 120(9): 1353–60.
- [36] Kanda T, Furuse Y, Oshitani H, et al. Highly Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Cloning and Functional Characterization of Gastric Cancer-Derived Epstein-Barr Virus Strains[J]. *J Virol*, 2016, 90(9): 4383–93.
- [37] Yuen KS, Chan CP, Wong NH, et al. CRISPR/Cas9-mediated genome editing of Epstein-Barr virus in human cells[J]. *J Gen Virol*, 2015, 96(Pt 3): 626–36.
- [38] Zauner L, Melroe GT, Sigrist JA, et al. TLR9 triggering in Burkitt's lymphoma cell lines suppresses the EBV BZLF1 transcription via histone modification. *Oncogene*[J]. *Oncogene*, 2010, 29(32): 4588–98.
- [39] Jordi M, Marty J, Mordasini V, et al. IRAK4 is essential for TLR9-induced suppression of Epstein-Barr virus BZLF1 transcription in Akata Burkitt's lymphoma cells[J]. *PLoS One*, 2017, 12(10): e0186614.
- [40] Banerjee S, Lu J, Cai Q, et al. The EBV latent antigen 3C inhibits apoptosis through targeted regulation of interferon regulatory factors 4 and 8[J]. *PLoS Pathog*, 2013, 9(5): e1003314.
- [41] Lv DW, Zhang K, Li R. Interferon regulatory factor 8 regulates caspase-1 expression to facilitate Epstein-Barr virus reactivation in response to B cell receptor stimulation and chemical induction[J]. *PLoS Pathog*, 2018, 14(1): e1006868.
- [42] Ma Y, Walsh MJ, Bernhardt K, et al. CRISPR/Cas9 Screens Reveal Epstein-Barr Virus-Transformed B Cell Host Dependency Factors[J]. *Cell Host Microbe*, 2017, 21(5): 580–91.
- [43] Masud HMAA, Watanabe T, Yoshida M, et al. Epstein-Barr Virus BKRFB4 Gene Product Is Required for Efficient Progeny Production[J]. *J Virol*, 2017, 91(23): e00975–17.
- [44] Nishiyama Y. Herpes simplex virus gene products: the accessories reflect her lifestyle well[J]. *Rev Med Virol*, 2004, 14(1): 33–46.
- [45] Jaishankar D, Shukla D. Genital herpes: insights into sexually transmitted infectious disease[J]. *Microb Cell*, 2016, 3(9): 438–50.
- [46] van Diemen FR, Lebbink RJ. CRISPR/Cas9, a powerful tool to target human herpesviruses[J]. *Cell Microbiol*, 2017, 19(2): e1005701.
- [47] Turner EM, Brown RS, Laudermitch E, et al. The Torsin Activator LULL1 Is Required for Efficient Growth of Herpes Simplex Virus 1[J]. *J Virol*, 2015, 89(16): 8444–52.
- [48] Roehm PC, Shekarabi M, Wollebo HS, et al. Inhibition of HSV-1 Replication by Gene Editing Strategy[J]. *Sci Rep*, 2016(6): 23146.
- [49] van Diemen FR, Kruse EM, Hooykaas MJ, et al. CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing of Herpesviruses Limits Productive and Latent Infections[J]. *PLoS Pathog*, 2016, 12(6): e1005701.
- [50] Finnen RL, Banfield BW. CRISPR/Cas9 Mutagenesis of UL21 in Multiple Strains of Herpes Simplex Virus Reveals Differential Requirements for pUL21 in Viral Replication[J]. *Viruses*, 2018, 10(5): 258.
- [51] Musso D, Roche C, Robin E, et al. Potential sexual transmission of Zika virus[J]. *Emerg Infect Dis*, 2015, 21(2): 359–61.
- [52] Bogoch II, Brady OJ, Kraemer MUG, et al. Anticipating the international spread of Zika virus from Brazil[J]. *Lancet*, 2016, 387(10016): 335–36.
- [53] Cao-Lormeau VM, Blake A, Mons S, et al. Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study[J]. *Lancet*, 2016, 387(10027): 1531–9.
- [54] Calvet G, Aguiar RS, Melo ASO, et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study[J]. *Lancet Infect Dis*, 2016, 16(6): 653–60.
- [55] Abbink P, Larocca RA, De La Barrera RA, et al. Protective efficacy of multiple vaccine platforms against Zika virus challenge in rhesus monkeys[J]. *Science*, 2016, 353(6304): 1129–32.

- [56] Li P, Ke X, Wang T, et al. Zika Virus Attenuation by Codon Pair Deoptimization Induces Sterilizing Immunity in Mouse Models[J]. *J Virol*, 2018, 92(17): e00701–18.
- [57] Meagher RJ, Negrete OA, Van Rompay KK. Engineering Pauper-Based Sensors for Zika Virus[J]. *Trends Mol Med*, 2016, 22(7): 529–30.
- [58] Savidis G, McDougall WM, Meraner P, et al. Identification of Zika Virus and Dengue Virus Dependency Factors using Functional Genomics[J]. *Cell Rep*, 2016, 16(1): 232–46.
- [59] Wells MF, Salick MR, Wiskow O, et al. Genetic Ablation of AXL Does Not Protect Human Neural Progenitor Cells and Cerebral Organoids from Zika Virus Infection[J]. *Cell Stem Cell*, 2016, 19(6): 703–8.
- [60] Estoppey D, Lee CM, Janoschke M, et al. The Natural Product Cavinafungin Selectively Interferes with Zika and Dengue Virus Replication by Inhibition of the Host Signal Peptidase[J]. *Cell Rep*, 2017, 19(3): 451–60.
- [61] Van der Hoek KH, Eyre NS, Shue B, et al. Viperin is an important host restriction factor in control of Zika virus infection[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 4475.
- [62] Ma J, Zhang X, Soloveva V, et al. Enhancing the antiviral potency of ER α -glucosidase inhibitor IHVR-19029 against hemorrhagic fever viruses in vitro and in vivo[J]. *Antiviral Res*, 2018(150): 112–22.
- [63] Kharsany AB, Karim QA. HIV Infection and AIDS in Sub-Saharan Africa: Current Status, Challenges and Opportunities[J]. *Open ? AIDS ? J*, 2016(10): 34–48.
- [64] Imran M, Manzoor S, Saalim M, et al. HIV-1 and hijacking of the host immune system: The current scenario[J]. *APMIS*, 2016, 124(10): 817–31.
- [65] Hu W, Kaminski R, Yang F, et al. RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(31): 11461–6.
- [66] 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[J]. *Nat Commun*, 2015(6): 6413.
- [67] Zhu W, Lei R, Le Duff Y, et al. The CRISPR/Cas9 system inactivates latent HIV-1 proviral DNA[J]. *Retrovirology*, 2015(12): 22.
- [68] Wang G, Zhao N, Berkhout B, et al. A Combinatorial CRISPR-Cas9 Attack on HIV-1 DNA Extinguishes All Infectious Provirus in Infected T Cell Cultures[J]. *Cell Rep*, 2016, 17(11): 2819–26.
- [69] Li C, Guan X, Du T, et al. Inhibition of ? HIV-1 infection of primary CD4⁺ T-cells by gene editing of CCR5 using adenovirus-delivered ? CRISPR/Cas9[J]. *J Gen Virol*, 2015, 96(8): 2381–93.
- [70] Hou P, Chen S, Wang S, et al. Genome editing of CXCR4 by CRISPR/cas9 confers cells resistant to HIV-1 infection[J]. *Sci Rep*, 2015(5): 15577.
- [71] Kang H, Minder P, Park MA, et al. CCR5 Disruption in Induced Pluripotent Stem Cells Using CRISPR/Cas9 Provides Selective Resistance of Immune Cells to CCR5-tropic HIV-1 Virus[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2015(4): e268.
- [72] Xu L, Yang H, Gao Y, et al. CRISPR/Cas9-Mediated CCR5 Ablation in Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cells Confers HIV-1 Resistance In Vivo[J]. *Mol Ther*, 2017, 25(8): 1782–89.
- [73] Yu S, Yao Y, Xiao H, et al. Simultaneous Knockout of CXCR4 and CCR5 Genes in CD4⁺ T Cells via CRISPR/Cas9 Confers Resistance to Both X4- and R5-Tropic Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection[J]. *Hum Gene Ther*, 2018, 29(1): 51–67.
- [74] Wang G, Zhao N, Berkhout B, et al. CRISPR-Cas9 Can Inhibit HIV-1 Replication but NHEJ Repair Facilitates Virus Escape[J]. *Mol Ther*, 2016, 24(3): 522–6.
- [75] Wang Z, Pan Q, Gendron P, et al. CRISPR/Cas9-Derived Mutations Both Inhibit HIV-1 Replication and Accelerate Viral Escape[J]. *Cell Rep*, 2016, 15(3): 481–9.
- [76] Fu Y, Foden JA, Khayter C, et al. High-frequency off-target-mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells[J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 822–6.
- [77] Mali P, Aach J, Stranges PB, et al. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering[J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 833–8.
- [78] Fu Y, Sander JD, Reyon D, et al. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs[J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(3): 279–84.
- [79] Guilinger JP, Thompson DB, Liu DR. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification[J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(6): 577–82.
- [80] Oggu GS, Sasikumar S, Reddy N, et al. Gene delivery approaches for mesenchymal stem cell therapy: Strategies to increase efficiency and specificity[J]. *Stem Cell Rev*, 2017, 13(6): 725–40.
- [81] Xiao Q, Min T, Ma S, et al. Intracellular generation of single-strand template increases the knock-in efficiency by combining CRISPR/Cas9 with AAV[J]. *Mol Genet Genomics*, 2018, 293(4): 1051–60.
- [82] Finn JD, Smith AR, Patel MC, et al. A single administration of CRISPR/Cas9 lipid nanoparticles achieves robust and persistent in vivo genome editing[J]. *Cell Rep*, 2018(22): 2227–35.
- [83] Lau CH, Suh Y. In vivo genome editing in animals using AAV-CRISPR system: Applications to translational research of human disease[J]. *F1000Res*, 2017(6): 2153.
- [84] Li JR, Walker S, Nie JB, et al. Experiments that led to the first gene-edited babies: the ethical failings and the urgent need for better governance[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2019, 20(1): 32–38.
- [85] Shinwari ZK, Tanveer F, Khalil AT. Ethical Issues Regarding CRISPR Mediated Genome Editing[J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2018(26): 103–10.

【收稿日期】 2019-01-25 【修回日期】 2019-04-13