



王永明, 复旦大学生命科学学院, 教授, 博士生导师。主要从事新型CRISPR工具开发和心肌病基因治疗研究, 取得多项有影响力的原创性成果。将基因编辑与GFP表达激活偶联, 创建了大规模筛选CRISPR的新思路。通过对大约300个CRISPR系统进行筛选, 鉴定出多个性能优异的基因编辑工具。其中SauriCas9和SlugCas9-HF具备基因小、PAM简单、活性高、特异性高的优点。利用深度学习开发出gRNA设计软件, 其能够预测SpCas9编辑效率, 性能优于同类工具。以一作和通讯作者身份在*Circulation Research*、*JACC*、*Nucleic Acids Research*、*PloS Biology*和*Nature Communications*等杂志上发表多篇论文。



兰峰, 中国医学科学院阜外医院, 教授, 博士生导师。2013年入选国家“高层次人才计划”青年项目, 2014年获得国家自然科学基金优秀青年基金, 并入选北京市海聚计划。精通由多种多能干细胞(iPSCs)分化产生的心肌细胞(CMs)及其用于心血管疾病研究和体外分子细胞机制研究的技术, 主要研究方向为: (1) 基于iPS-CMs模型研究遗传性心脏病发病的分子机制; (2) 以iPS-CMs为模型来测试药物的有效性和心血管毒性; (3) 采用iPS-CMs进行再生医学和基因治疗研究。并持续发表了大量一流的研究论文, 得到了相关领域国际学术界的广泛关注和肯定。总计发表SCI论文82篇, 累计影响因子超过670; 以第一和通讯作者身份在*Cell Stem Cell*、*Circulation*、*JACC*、*Nature Communications*、*Cell Death Differentiation*等高水平杂志上发表论文30多篇。

基因编辑人多能干细胞用于心脏疾病研究

马树红^{1, 2, 3} 王永明^{4*} 兰峰^{1, 2, 3*}

(¹中国医学科学院北京协和医学院附属阜外医院心血管病国家重点实验室, 国家心血管病研究中心多能干细胞与心脏再生实验室, 北京 102308; ²首都医科大学附属北京安贞医院, 心血管精准医学北京实验室, 心血管疾病医学工程教育部重点实验室, 心血管重塑相关疾病教育部重点实验室, 北京 100029; ³北京市心肺血管病研究所, 北京 100029; ⁴复旦大学生命科学学院, 遗传工程国家重点实验室, 上海 200432)

摘要 心血管疾病(cardiovascular disease, CVD)是导致人类死亡的主要原因之一。体外的细胞模型有助于提高对这些疾病的研究能力。人多能干细胞(human pluripotent stem cell, hPSC)的多向分化潜能, 为建立各种细胞或组织模型提供了可能。同时, 近年来开发的几种新型基因组编辑工具, 包括CRISPR/Cas系统、碱基编辑器(base editor, BE)以及引导编辑器(prime editor, PE)大大提

收稿日期: 2021-03-19 接受日期: 2021-04-22

北京自然科学基金(批准号: Z190013)、国家自然科学基金(批准号: 81970205)和中国医学科学院非营利中央研究院基金(批准号: 2019PT320026)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-31246624, E-mail: ymw@fudan.edu.cn; Tel: 010-64456336, E-mail: fenglan@fuwai.com

Received: March 19, 2021 Accepted: April 22, 2021

This work was supported by the Beijing Natural Science Foundation (Grant No.Z190013), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81970205), and the Non-Profit Central Research Institute Fund of Chinese Academy of Medical Sciences (Grant No.2019PT320026)

*Corresponding authors. Tel: +86-21-31246624, E-mail: ymw@fudan.edu.cn; Tel: +86-10-64456336, E-mail: fenglan@fuwai.com

高了构建和测试细胞疾病模型的速度和有效性。人多能干细胞和基因组编辑技术的结合为理解和治疗疾病提供了新的方法。在这篇综述中, 讨论了几种最流行的基因组编辑技术的优缺点, 以及其在心血管疾病中潜在的应用。

关键词 基因组编辑; 心血管疾病; CRISPR/Cas9; 人多能干细胞

Gene-Edited Human Pluripotent Stem Cells for Cardiac Disease Research

MA Shuhong^{1,2,3}, WANG Yongming^{4*}, LAN Feng^{1,2,3*}

(¹State Key Laboratory of Cardiovascular Disease, National Center for Cardiovascular Diseases, Fuwai Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 102308, China; ²Beijing Laboratory for Cardiovascular Precision Medicine, the Key Laboratory of Biomedical Engineering for Cardiovascular Disease Research, the Key Laboratory of Remodeling-Related Cardiovascular Disease, Ministry of Education, Beijing Anzhen Hospital, Capital Medical University, Beijing 100029, China; ³Beijing Institute of Heart, Lung and Blood Vessel Diseases, Beijing 100029, China; ⁴State Key Laboratory of Genetic Engineering, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200432, China)

Abstract CVD (cardiovascular disease) is one of the leading causes of human death. *In vitro* cell model can improve the ability to study these diseases. The multi-differentiation ability of hPSC (human pluripotent stem cell) provides the possibility to establish various cell or tissue models. Recently, the development of several novel genome editing tools, including the CRISPR/Cas system, BE (base editor) and PE (prime editor) have greatly improved the efficiency of manufacturing and testing cell disease models. The combination of human pluripotent stem cell and genome editing technology provides new strategies for exploring and curing diseases. This review focuses on the pro and cons of the most popular genome editing technologies, as well as their potential applications in cardiovascular disease.

Keywords genome editing; cardiovascular disease; CRISPR/Cas9; hPSC

心血管疾病 (cardiovascular disease, CVD) 是人类发病和死亡的主要原因。心血管系统分析模型的开发是心血管疾病病理生理学的重大挑战^[1]。近来, 两项技术的进步大大增强了我们探索 CVD 发病机制、开发潜在治疗手段的能力。第一, 基因组编辑技术, 特别是基于成簇的规则间隔短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR) 的基因组编辑系统, 能有效地进行等位基因组编辑, 有助于快速地建立基因组遗传变异和疾病表型之间的因果关系^[2]。常用的基因组编辑技术包括: 锌指核酸酶 (zinc finger nuclease, ZFN)、转录激活因子样效应子核酸酶 (transcription activator-like effector nuclease, TALEN) 和 CRISPR 系统, 以及基于 CRISPR 系统的碱基编辑器 (base editor, BE) 和引导编辑器 (prime editor, PE) 等^[3]。CRISPR 系统中单链引导 RNA (single guide RNA, sgRNA) 可引导 Cas 核酸酶在指定位置精确

切割。BE 是一种较新的基因组编辑方法, 它使用胞苷脱氨酶或者脱氧腺苷脱氨酶将点突变直接引入到细胞基因组中, 实现一个碱基或碱基对转换, 不产生过多的编辑副产物^[4]。而 PE 通过融合逆转录酶, 可以引入或者修复任意的突变包括点突变、小片段插入或缺失^[5-6]。第二, 人多能干细胞 (human pluripotent stem cell, hPSC) 的衍生和分化使得研究人员能够研究人类细胞的各种疾病^[7]。人类多能干细胞包括起源于胚胎的人胚胎干细胞 (human embryonic stem cell, hESC) 和源于成纤维细胞或其他体细胞“重编程”的人诱导多能干细胞 (human induced pluripotent stem cell, hiPSC)。

干细胞和基因组编辑技术的有效结合为推进疾病造模、致病机理探索提供了新的方法^[8-10]。通过对引起单基因和多基因遗传疾病的基因进行编辑可以成功建立干细胞疾病模型。为了有效地进行基因组编辑和干细胞的下游应用, 需要考虑包括基因

组编辑工具在内的多种因素。为推进基因组编辑技术在基于干细胞的心血管疾病中的应用,在本综述中,我们讨论了最新的几种基因组编辑技术的优缺点及其在各种模型系统中的潜在应用。

1 基因组编辑技术

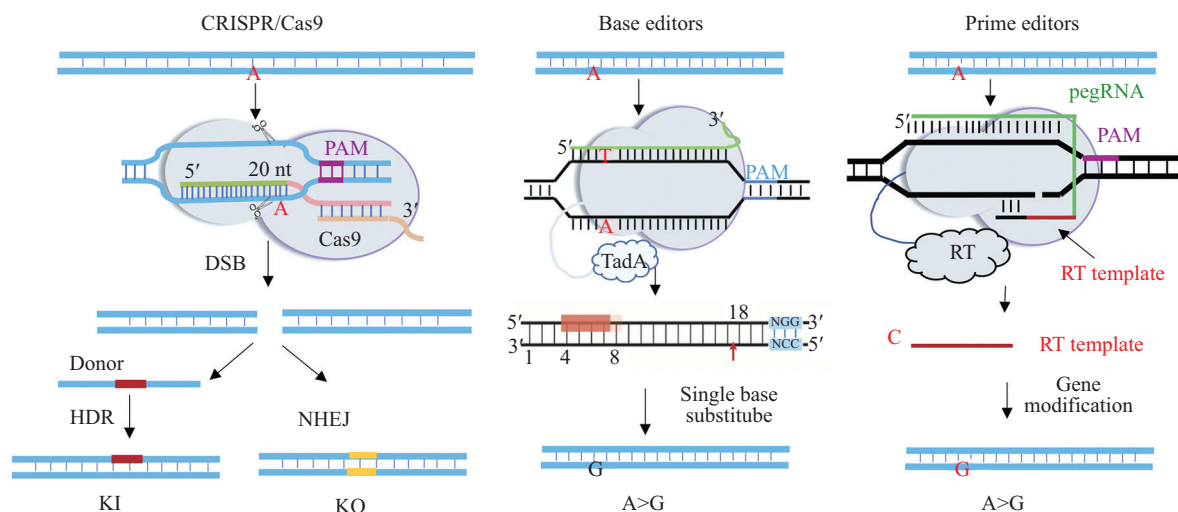
1.1 CRISPR系统

CRISPR/Cas技术被认为是继ZFN、TALEN之后的第三代基因组编辑技术。CRISPR系统有不同的Cas蛋白,其中I型CRISPR系统借助于多蛋白复合物实现切割,II型CRISPR系统依赖于单一的蛋白核酸酶(包括Cas9、Cas12以及Cas13)切割。单一核酸酶包括Cas9和Cas12现已广泛用于基因工程相关研究^[2-3]。Cas9蛋白依赖于crRNA(CRISPR RNA)与反式激活crRNA(trans-activating crRNA, tracrRNA)融合获得sgRNA,并在原型间隔区相邻基序(proto-spacer adjacent motif, PAM)上游3 nt处切开DNA双链(平末端)。Cas9酶切割活性依赖于HNH和RuvC功能域,通过失活单一的功能域可获得单链切割Cas9酶(Cas9n)^[11]。Cas12只有RuvC功能域并且只依赖于单一的crRNA引导即可实现DNA定位,在原间隔序列的远PAM端切割产生黏性末端^[11]。系统

内sgRNA引导Cas酶靶向切割,形成DNA双链断裂(double-stranded DNA breaks, DSBs),且切口附近的基因组随着DNA修复[包括非同源末端接合(non-homologous end joining, NHEJ)和同源定向修复(homologous-directed repair, HDR)]产生定点编辑。利用这一原理,我们将可以在基因组特定的位置进行编辑,实现基因敲除(knock-out)或者敲入(knock-in)(图1)^[3]。CRISPR系统的出现,极大地提高了基因修饰效率,为疾病模型建立和基因功能探索提供了强有力的工具。

1.2 碱基编辑器

BE是由活性受损的核酸酶与脱氨基酶融合而成。现有BE系统分为:(1)胞嘧啶碱基编辑器(cytosine base editors, CBEs),融合了胞苷脱氨酶,可催化碱基对C/G转换为T/A;(2)腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editors, ABEs),融合了脱氧腺苷脱氨酶(tRNA adenosine deaminase enzyme, TadA),可将A/T转换为G/C^[3]。碱基编辑依赖“活性窗口”,其中以spCas9为基础的CBEs和ABEs的活性窗口位于远离PAM区的前间隔序列的第4~8位(图1)^[12]。通过增加蛋白间的接头序列、UGI功能域以及核定位序列等均可提高编辑效率^[13]。例如CBEs中会融合尿嘧



DSB: DNA双链断裂; HDR: 同源末端重组修复; NHEJ: 非同源性末端接合; KI: 基因敲入; KO: 基因敲除; TadA: 脱氧腺苷脱氨酶; PAM: 原型间隔区相邻基序; pegRNA: PE引导RNA; RT: 逆转录酶; RT template: 逆转录模版; A/T/C/G: 腺嘌呤/胸腺嘧啶/胞嘧啶/鸟嘌呤。

DSB: :double-stranded DNA break; HDR: homologous-directed repair; NHEJ: non-homologous end joining; KI: knock-in; KO: knock-out; TadA: adenosine deaminase enzyme; PAM: protospacer adjacent motif; pegRNA: prime editor guide RNA; RT: reverse transcriptase; RT template: reverse transcription template; A/T/C/G: adenine/thymine/cytosine/guanine.

图1 基于CRISPR/Cas的基因组编辑系统的概述

Fig.1 Overview of CRISPR/Cas-based genome editing system

啶糖基化酶抑制剂(uracil glycosylase inhibitor, UGI)元件来抑制以尿嘧啶碱基为模板的DNA修复。此外,大多数单碱基编辑器采用单链切口酶以切断非靶向链,促进以编辑位点为模板的DNA修复。与Cas9-ssODN介导的同源重组修复相比,BE极大地提高单碱基编辑的效率,同时不诱导基因组DSBs,有效地避免了由此产生的编辑副产物(indels)。

目前, BE已被普遍用于多种人类遗传病动物模型^[3]或者人源多能干细胞建模^[8], 以及疾病的基因治疗^[14]。

1.3 引导编辑器

CRISPR/Cas系统可诱导DNA断裂, 在NHEJ和HDR介导的修复途径下可实现DNA序列修复, 但常伴有严重的插入、缺失甚至染色体丢失等脱靶突变^[15]。BE可在不诱导DSBs情况下, 实现精准的单碱基转换, 但它常导致靶位点非目标碱基的脱靶突变; 此外, 基因组中的某些突变位点可能缺乏合适的PAM序列而难以实现目标碱基的精准编辑。近来, 研究者开发了一种较为全能的编辑系统, 并将其命名为引导编辑器(PE)^[5-6]。PE系统在CRISPR系统的基础上连接了逆转录酶(M-MLV RT)。该系统以pegRNA(prime editor guide RNA)引导Cas9n核酸酶切割目的基因位点; 在切口处, 依赖引物结合序列(primer binding site, PBS)、逆转录酶和转录模板(RT template)序列进行基因编辑(图1)。理论上, 该系统可以引入或者修复任意的突变包括点突变、小片段插入或缺失, 在疾病造模和基因治疗中有良好的运用前景^[6]。但PE组件复杂, 可能极大地影响其在非分裂细胞中的应用; 考虑到其编辑效率和未知的脱靶效应, 该系统的生物医学应用仍需要更多实践。

1.4 脱靶效应

意外脱靶突变极大地限制了基因组编辑技术的应用。CRISPR系统中Cas核酸酶切割与靶位点序列相似的非靶位点区域, 产生碱基插入或者缺失; 更严重的是Cas核酸酶切割还可能造成染色体丢失, 而且这种染色体丢失非常频繁, 可能导致一些未知的结果^[15]。在靶向位点附近或者基因组的其他相似结合位点, BE系统也会产生脱靶编辑; 此外, BE系统在引入脱氨酶活性的同时, 不可避免地带来了脱氨酶活性依赖的全转录组脱靶编辑, 特别是CBEs^[3]。PE系统暂无脱靶相关报道。幸运的是, 这些脱靶编辑可以通过一定的措施增强系统特异性, 减少脱靶效应。

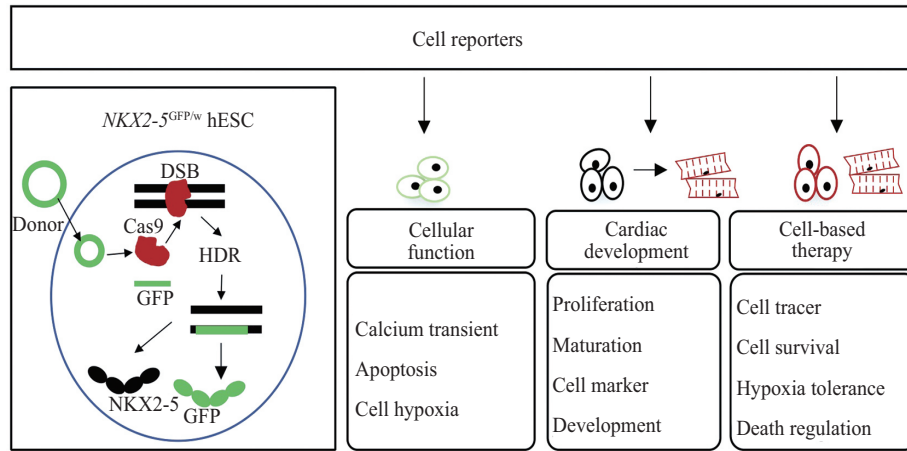
针对CRISPR系统和BE系统, 优化sgRNA设计将有助于降低错配位点的脱靶频率。合适的sgRNA设计工具可帮助用户通过其预测的脱靶效应对候选sgRNA进行排序。研究显示, 构建sgRNA时, 在sgRNA 5'端添加两个鸟嘌呤核苷酸(G), 截短3'端^[16]或截短5'端(形成长度为17或18个核苷酸的trunc-gRNA)^[17]可有效地提高编辑特异性; 优化Cas融合蛋白, 引入合适的Cas蛋白突变体, 在递送时将Cas蛋白或者BE作为纯化的核糖核蛋白(RNP)递送均可以提高这些系统的特异性^[18]。优化脱氨酶可以最大程度地保持BE系统DNA编辑效率, 减少RNA脱靶编辑^[19-20]。

总体而言, 通过sgRNA设计优化、Cas蛋白以及脱氨酶构建, 可有效提升这些系统的特异性。可以通过以下过程最小化脱靶编辑: (1) 选择特定的sgRNA^[21]; (2) 使用优化的Cas变体^[3]和递送方式^[18]; (3) 使用无偏见的全基因组方法检测突变; (4) 使用优化的脱氨酶变体^[19-20]。

2 基于基因组编辑的报告细胞株

基因组编辑技术的进展, 极大地推进了报告系统的建立。这使得我们能够更好地监测细胞信号传导、生长控制、细胞发育、增殖和疾病进展^[22]。细胞发育活动和信号传导的精确调节往往是由特异基因表达差异引起的; 将响应元件融合到特异的基因编码的蛋白上, 以获取相关途径的激活/抑制及其对基因表达影响的关系的信息, 建立报告基因系统, 用作监测细胞转录活性、心脏发育和细胞示踪的标记^[23](图2)。

荧光蛋白, 特别是绿色荧光蛋白, 已成为生物学研究中最常用的报告基因之一。绿色荧光蛋白共有238个氨基酸, 分子量为27 kDa。绿色荧光蛋白作为体内细胞的示踪剂, 可监测细胞中目的基因的翻译和转录。增强的绿色荧光蛋白(EGFP)是GFP的变体, 通过将EGFP序列定位于hESC中的NKX2-5单等位基因原位启动子上, 建立NKX2-5^{EGFP/+}细胞系(图2), 可监测NKX2-5基因在心脏发育过程中的动态变化^[24]; 这将有助于心脏分化效率的检测, 以及心脏祖细胞(cardiac progenitor cell, CPC)、心肌细胞的纯化和分化方案的标准化。通过荧光蛋白标记也可在分化过程中实时地监测窦房结细胞^[25]、心房里肌细胞^[26], 以及心脏祖细胞^[27]等。在hESC的AAVS1位点靶向切割并插入绿色荧光钙调节蛋白6快速型(green fluorescent calcium-modulated protein 6 fast type, GCaMP6f), 可有效实现心



hESC: 人胚胎干细胞; HDR: 同源定向修复。

hESC: human embryonic stem cells; HDR: homologous-directed repair.

图2 NKX2-5报告细胞株建立以及报告系统应用示意图

Fig.2 Schematic diagram of the generation of NKX2-5 reporter cell line and the application of the reporting system

肌细胞内钙离子释放与回收的非侵入性功能高通量分析^[28]。GCaMP6f是钙敏感修饰型GFP,可以在细胞质Ca²⁺稳态水平下用作荧光报告基因,监测细胞质内的Ca²⁺变化。

荧光素酶是生物发光最常用的标记基因,其通过催化底物荧光素产生生物荧光。荧光素酶报告系统为低基因表达检测以及活体监测提供了很好的选择。荧光素酶催化的反应的宽带发射光谱可以产生更长波长的光,该波长可以分散在几厘米内^[29];这使得基于荧光素酶的生物发光成像(bioluminescence imaging, BLI)可实现深层组织的可视化。随着基于细胞移植的心血管移植研究的增多,生物发光成像被广泛地用来监测移植细胞的体内存活^[30]。

3 基因编辑与心血管疾病

3.1 患者来源的hiPSC模型

心血管疾病建模为研究心血管疾病病因、发病机理、诊断和个体化治疗提供了可能。在心血管领域,基因组编辑工具被广泛用于研究遗传疾病的病理生理学,已成功构建了各种模型^[31]。有很多基于基因组编辑技术建立的动物模型,包括心肌病、高血压、电生理学和血脂异常等模型^[32-34]。考虑到种属差异,hPSC模型能更好地模拟人类携带的遗传变异。患者源的hiPSC源性心肌细胞疾病模型通过保留患者的基因组成,在体外表现出该疾病的表型特征^[35]。例如,患者来源的hiPSC以及基因组编辑产生的细胞系已成为研究家族性肥厚型心肌病(hyper-

trophic cardiomyopathy, HCM)^[36]、家族性扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy, DCM)^[37]、长Q-T间期综合征(long QT syndrome, LQT)^[38-39]、短Q-T间期综合征(short QT syndrome, SQT)^[40]以及左室致密化不全(left ventricular non-compaction cardiomyopathy, LVNC)^[41]等的良好工具。

3.2 基于基因编辑的hPSC模型

特定患者的hiPSC往往是有价值且高效的研究模型,但患者来源的hiPSC既费时又费力。而通过基因组编辑将突变引入hPSC,获得方式较为简单,同时能保持一致的遗传背景,在科学研究中被广泛使用^[8-10]。相比于传统的RNAi方式,基因组敲除能稳定地下调目的基因表达。此外,先进的基因组编辑方法的灵活性,允许在特定基因组位点插入特定突变,同时产生多种转基因品系,这是RNAi技术无法实现的^[2]。

通过基因组编辑正常hPSC准确地建立具有临床患者表型的体外细胞模型,可快速明确变异致病性;这极大地增强了遗传建模、疾病机理探索、个体化诊疗实现的能力(图3)。在一项研究中,我们利用碱编辑编辑器(BE)成功建立了LQT1、LQT2和LQT3的细胞模型,建立的干细胞来源的心肌细胞疾病模型场电位时长均显著延长,这与先前的研究一致^[8]。同时,我们将SCN5A错义突变C5635T(R1879W)引入细胞,证明了该新发突变表型与Brugada综合征患者特异性iPSC衍生的心肌细胞表型一致,明确了该突变的致病意义^[8]。在另一项研究中,通过CRISPR/Cas9技术建立缺乏MLP蛋白的细胞模型,我们发现

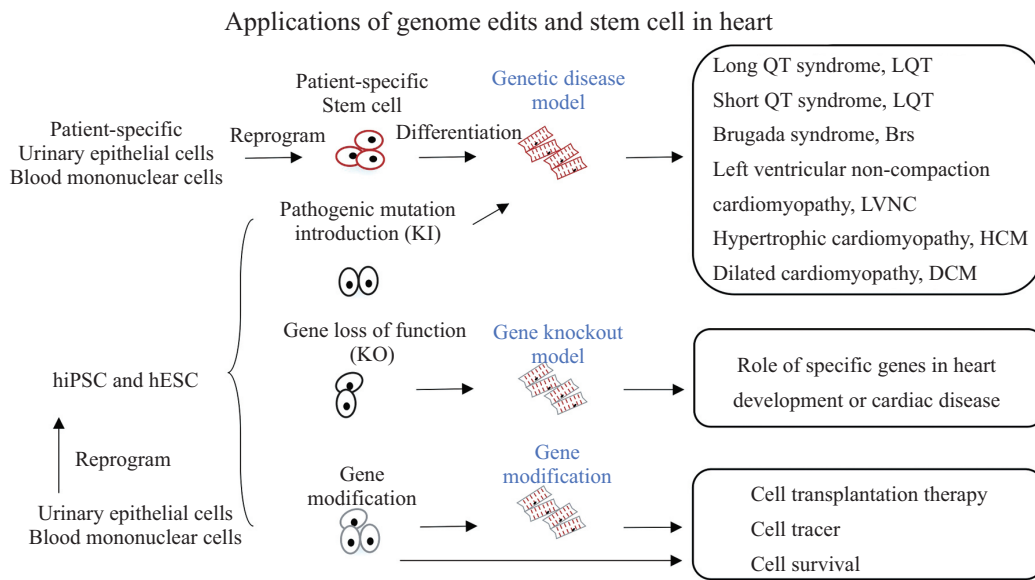


图3 基于基因组编辑的干细胞的心脏运用

Fig.3 Heart application of stem cells based on genome editing

缺乏MLP的心肌细胞分化出了与HCM相关的疾病表型,并且异常的钙处理是导致该表型的主要机制;通过钙通道阻滞剂维拉帕米的治疗可维持钙稳态,阻止疾病进展^[28]。

基因组编辑技术在实现疾病建模的同时,也加深了我们对基因在特定疾病进程中的作用的认知。基因组编辑技术建立的hPSC敲除细胞模型,为研究基因特别是在动物模型中具有胚胎致死性或者种属差异的基因的功能提供了可能。例如,为探索RRAD基因在心脏中的功能,我们建立了RRAD缺陷(RRAD^{-/-})的hESC细胞系。在将野生型(WT)和RRAD^{-/-}细胞体外分化为心肌细胞后,我们惊讶地发现,与野生型相比,源自RRAD敲除的心肌细胞表现出独特的肥大表型。基于该模型,我们探索了RRAD缺失后心肌细胞的功能变化,及其潜在机制和潜在疗法^[42]。RRAD缺失导致心肌细胞膜中LTCC表达的增加和细胞内钙水平的异常调节,最终导致细胞肥大;用LTCC阻滞剂维拉帕米处理钙失调可治疗由RAD缺乏引起的心肌细胞肥大^[42]。总之,通过基因组编辑技术建立的人源干细胞疾病模型,为体外研究基因功能、疾病发病机制,以及开发疾病诊断方法、治疗策略提供了可能。

3.3 心血管疾病基因治疗

基因组编辑作为一种治疗工具,在多种疾病中

被广泛应用。尽管hPSC疾病模型研究显示,遗传性心脏疾病可以通过编辑致病突变来治愈;但在体实验中,心肌细胞编辑效率低,因此以心脏为靶标仍然具有挑战性^[31]。目前,基于基因组编辑技术的心血管领域的治疗性研究基本上局限于肝脏,主要针对心血管风险因素高血脂的研究,包括靶向前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/kexin9型(proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9)^[43]和低密度脂蛋白受体(low-density lipoprotein receptor, LDLR)^[44]等。

4 基于hPSC的心血管治疗

在预防、诊断和治疗CVD方面取得实质性进展之前,心脏移植是终末期心衰患者的唯一选择。心肌细胞几乎不可再生,在疾病过程中,减少细胞死亡以维持心脏功能是研究的重点方向。干细胞及其分化的心脏谱系细胞,可保护或者替换受损的心肌细胞,维持心脏功能。在两项大动物的研究中,移植的心肌细胞在移植部位存活良好,并且显著改善了心脏功能^[45-46]。研究显示,移植细胞与宿主组织的融合不足仍是再生疗法的障碍,包括血管生成不足、缺血环境和免疫排异等都会影响移植细胞的存活和命运^[45]。将细胞制作成工程化组织显然能提高移植细胞的留存率并促进整合^[45]。我们最新的研究通过将人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mes-

enchymal stem cell, hUCMSC)制作为细胞膜片,显著地改善了梗死心脏的功能,减轻了心梗后的不良重塑;同时通过荧光素酶标记hUCMSC,我们可实时地监测移植细胞的动态变化^[47]。

体内外实验表明,通过基因修饰可显著改善移植细胞抗性,促进血管新生以及移植细胞或宿主心肌细胞存活等,使得基因修饰的细胞在再生治疗中表现出良好前景^[48]。在一项研究中,通过在人脐带血间充质干细胞中过表达*N*-钙黏蛋白揭示了:*N*-钙黏蛋白可以增强心肌细胞存活,*N*-钙黏蛋白高表达的细胞可以更有效地与宿主心肌细胞相互作用;激活ERK通路,可促进血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)生成和释放,从而促进血管生成^[49]。除此之外,一些研究人员提出了用基因治疗技术提高旁分泌因子水平的想法,过表达VEGF或者生长因子(HGF),以及*Ang-1*基因修饰等均有有望实现心脏再生治疗^[50]。

5 总结与展望

将突变引入hPSC变得越来越容易,在细胞系中检查新发突变的突变效应将变得可行。这将使研究人员能够确定基因修饰物对疾病渗透率的影响,即某些突变可引起疾病表型而其他突变却没有。特定患者的iPSC系往往是有价值且高效的研究模型,但既费时又费力。而将疾病突变引入某种野生型细胞系中,快速简便,除了可以明确突变的致病意义,还可以检测突变的可编辑性^[51]。这将会为推进遗传性心脏病的诊断和基因治疗提供强有力的理论依据。

尽管基因治疗有潜在的临床用途,但在患者中基因组编辑技术的实践应用仍有许多障碍和局限:不可预测的基因组区域的“脱靶”行为。基因组编辑的脱靶效应一直是科学界广泛关注的问题,引入一种在治疗的疾病之外的疾病或降低细胞适应性将是有害的^[15]。即使一个基因被完全沉默而没有脱靶突变,无意地使该基因沉默也可能引发其他复杂的生物过程的失调。

此外,报道显示在墨西哥已有成功进行种系基因治疗的病例,英国也正在进行政府批准的线粒体替代疗法(mitochondrial replacement therapy, MRT)的首次人体试验^[52]。随着技术的发展,对应的法规和道德准则须完善,以解决体细胞和种系的基因组编辑的伦理问题^[53],并推进其在治疗中的潜在应用。

参考文献 (References)

- [1] LLOYD-JONES D, ADAMS R J, BROWN T M, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics—2010 update: a report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2010, 121(7): 948-54.
- [2] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-23.
- [3] REES H A, LIU D R. Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells [J]. *Nat Rev Genet*, 2018, 19(12): 770-88.
- [4] GAUDELLI N M, KOMOR A C, REES H A, et al. Programmable base editing of A*T to G*C in genomic DNA without DNA cleavage [J]. *Nature*, 2017, 551(7681): 464-71.
- [5] ANZALONE A V, RANDOLPH P B, DAVIS J R, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA [J]. *Nature*, 2019, 576(7785): 149-57.
- [6] LIN Q, ZONG Y, XUE C, et al. Prime genome editing in rice and wheat [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(5): 582-5.
- [7] BURRIDGE P W, MATSA E, SHUKLA P, et al. Chemically defined generation of human cardiomyocytes [J]. *Nat Methods*, 2014, 11(8): 855-60.
- [8] QI T, WU F, XIE Y, et al. Base editing mediated generation of point mutations into human pluripotent stem cells for modeling disease [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 581-90.
- [9] WANG Y, LIANG P, LAN F, et al. Genome editing of isogenic human induced pluripotent stem cells recapitulates long QT phenotype for drug testing [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2014, 64(5): 451-9.
- [10] WANG Y, ZHANG W Y, HU S, et al. Genome editing of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells with zinc finger nucleases for cellular imaging [J]. *Circ Res*, 2012, 111(12): 1494-503.
- [11] TREVINO A E, ZHANG F. Genome editing using Cas9 nickases [J]. *Method Enzymol*, 2014, 546: 161-74.
- [12] VILLIGER L, GRISCH-CHAN H M, LINDSAY H, et al. Treatment of a metabolic liver disease by *in vivo* genome base editing in adult mice [J]. *Nat Med*, 2018, 24(10): 1519-25.
- [13] HUANG S, LIAO Z, LI X, et al. Developing ABEmax-NG with precise targeting and expanded editing scope to model pathogenic splice site mutations *in vivo* [J]. *iScience*, 2019, 15: 640-8.
- [14] KOBLAN L W, ERDOS M R, WILSON C, et al. *In vivo* base editing rescues Hutchinson-Gilford progeria syndrome in mice [J]. *Nature*, 2021, 589(7843): 608-14.
- [15] ZUCCARO M V, XU J, MITCHELL C, et al. Allele-specific chromosome removal after Cas9 cleavage in human embryos [J]. *Cell*, 2020, 183(6): 1650-64.e15.
- [16] PATTANAYAK V, LIN S, GUILINGER J P, et al. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 839-43.
- [17] FU Y, SANDER J D, REYON D, et al. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(3): 279-84.
- [18] MARTIN R M, IKEDA K, CROMER M K, et al. Highly efficient and marker-free genome editing of human pluripotent stem cells by CRISPR-Cas9 RNP and AAV6 donor-mediated homologous recombination [J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 24(5): 821-8.e5.
- [19] GRÜNEWALD J, ZHOU R, GARCIA S P, et al. Transcriptome-wide off-target RNA editing induced by CRISPR-guided DNA base editors [J]. *Nature*, 2019, 569(7756): 433-7.

- [20] REES H A, WILSON C, DOMAN J L, et al. Analysis and minimization of cellular RNA editing by DNA adenine base editors [J]. *Sci Adv*, 2019, 5(5): 5717-27.
- [21] PEREZ A R, PRITYKIN Y, VIDIGAL J A, et al. GuideScan software for improved single and paired CRISPR guide RNA design [J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(4): 347-9.
- [22] BURRIDGE P W, KELLER G, GOLD J D, et al. Production of de novo cardiomyocytes: human pluripotent stem cell differentiation and direct reprogramming [J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(1): 16-28.
- [23] SHIMOSATO D, SHIKI M, NIWA H. Extra-embryonic endoderm cells derived from ES cells induced by GATA factors acquire the character of XEN cells [J]. *BMC Dev Biol*, 2007, 7: 80-100.
- [24] ELLIOTT D A, BRAAM S R, KOUTSIS K, et al. NKX2-5(eGFP/w) hESCs for isolation of human cardiac progenitors and cardiomyocytes [J]. *Nat Methods*, 2011, 8(12): 1037-40.
- [25] VAN EIF V W W, STEFANOVIC S, VAN DUIJVENBODEN K, et al. Transcriptome analysis of mouse and human sinoatrial node cells reveals a conserved genetic program [J]. *Development*, 2019, 146(8): 1731-61.
- [26] SCHWACH V, VERKERK A O, MOL M, et al. A COUP-TFII human embryonic stem cell reporter line to identify and select atrial cardiomyocytes [J]. *Stem Cell Rep*, 2017, 9(6): 1765-79.
- [27] ZHANG J Z, TERMGLINCHAN V, SHAO N Y, et al. A human iPSC double-reporter system enables purification of cardiac lineage subpopulations with distinct function and drug response profiles [J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 24(5): 802-11.
- [28] LI X, LU W J, LI Y, et al. MLP-deficient human pluripotent stem cell derived cardiomyocytes develop hypertrophic cardiomyopathy and heart failure phenotypes due to abnormal calcium handling [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(8): 610-20.
- [29] DE BOER J, VAN BLITTERSWIJK C, LÖWIK C. Bioluminescent imaging: emerging technology for non-invasive imaging of bone tissue engineering [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(9): 1851-8.
- [30] MADSEN S D, GILER M K, BUNNELL B A, et al. Illuminating the regenerative properties of stem cells *in vivo* with bioluminescence imaging [J]. *Biotechnol J*, 2021, 16(3): e2000248.
- [31] NISHIGA M, QI L S, WU J C. Therapeutic genome editing in cardiovascular diseases [J]. *Adv Drug Deliver Rev*, 2021, 168: 147-57.
- [32] CARROLL K J, MAKAREWICH C A, MCANALLY J, et al. A mouse model for adult cardiac-specific gene deletion with CRISPR/Cas9 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(2): 338-43.
- [33] ENDRES B T, PRIESTLEY J R, PALYGIN O, et al. Mutation of *Plekha7* attenuates salt-sensitive hypertension in the rat [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(35): 12817-22.
- [34] NIIMI M, YANG D, KITAJIMA S, et al. ApoE knockout rabbits: a novel model for the study of human hyperlipidemia [J]. *Atherosclerosis*, 2016, 245: 187-93.
- [35] WU J C, GARG P, YOSHIDA Y, et al. Towards precision medicine with human iPSCs for cardiac channelopathies [J]. *Circ Res*, 2019, 125(6): 653-8.
- [36] LAN F, LEE A S, LIANG P, et al. Abnormal calcium handling properties underlie familial hypertrophic cardiomyopathy pathology in patient-specific induced pluripotent stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 12(1): 101-13.
- [37] SUN N, YAZAWA M, LIU J, et al. Patient-specific induced pluripotent stem cells as a model for familial dilated cardiomyopathy [J]. *Sci Transl Med*, 2012, 4(130): 130-47.
- [38] MORETTI A, BELLIN M, WELLING A, et al. Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome [J]. *New Engl J Med*, 2010, 363(15): 1397-409.
- [39] ITZHAKI I, MAIZELS L, HUBER I, et al. Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells [J]. *Nature*, 2011, 471(7337): 225-9.
- [40] SHINNAWI R, SHAHEEN N, HUBER I, et al. Modeling reentry in the short QT syndrome with human-induced pluripotent stem cell-derived cardiac cell sheets [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2019, 73(18): 2310-24.
- [41] KODO K, ONG S G, JAHANBANI F, et al. iPSC-derived cardiomyocytes reveal abnormal TGF- β signalling in left ventricular non-compaction cardiomyopathy [J]. *Nat Cell Biol*, 2016, 18(10): 1031-42.
- [42] LI Y, CHANG Y, LI X, et al. RAD-deficient human cardiomyocytes develop hypertrophic cardiomyopathy phenotypes due to calcium dysregulation [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 585-9.
- [43] YANG Y, WANG L, BELL P, et al. A dual AAV system enables the Cas9-mediated correction of a metabolic liver disease in newborn mice [J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(3): 334-8.
- [44] ZHAO H, LI Y, HE L, et al. *In vivo* AAV-CRISPR/Cas9-mediated gene editing ameliorates atherosclerosis in familial hypercholesterolemia [J]. *Circulation*, 2020, 141(1): 67-79.
- [45] GAO L, GREGORICH Z R, ZHU W, et al. Large cardiac muscle patches engineered from human-induced pluripotent stem cell-derived cardiac cells improve recovery from myocardial infarction in swine [J]. *Circulation*, 2018, 137(16): 1712-30.
- [46] LIU Y W, CHEN B, YANG X, et al. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes restore function in infarcted hearts of non-human primates [J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(7): 597-605.
- [47] GUO R, WAN F, MORIMATSU M, et al. Cell sheet formation enhances the therapeutic effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells on myocardial infarction as a bioactive material [J]. *Bioact Mater*, 2021, 6(9): 2999-3012.
- [48] LEE E J, CHOI E K, KANG S K, et al. N-cadherin determines individual variations in the therapeutic efficacy of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in a rat model of myocardial infarction [J]. *Mol Ther*, 2012, 20(1): 155-67.
- [49] LOU X, ZHAO M, FAN C, et al. N-cadherin overexpression enhances the reparative potency of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiac myocytes in infarcted mouse hearts [J]. *Cardiovasc Res*, 2020, 116(3): 671-85.
- [50] SHAFEI A E, ALI M A, GHANEM H G, et al. Mesenchymal stem cell therapy: a promising cell-based therapy for treatment of myocardial infarction [J]. *J Gene Med*, 2017, 19(12): 1521-54.
- [51] REINHARDT P, SCHMID B, BURBULLA L F, et al. Genetic correction of a LRRK2 mutation in human iPSCs links parkinsonian neurodegeneration to ERK-dependent changes in gene expression [J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 12(3): 354-67.
- [52] WOLF D P, MITALIPOV P A, MITALIPOV S M. Principles of and strategies for germline gene therapy [J]. *Nat Med*, 2019, 25(6): 890-7.
- [53] LANDER E S. The heroes of CRISPR [J]. *Cell*, 2016, 164(1/2): 18-28.