

DOI:10.13350/j.cjpb.240823

• 综述 •

CRISPR/Cas9 基因编辑技术安全性研究进展*

方梦雅^{1,2}, 宋英杰², 靳力², 李浩^{2**}, 孙岩松^{2**}, 刘宗平^{1**}

(1. 扬州大学兽医学院, 江苏扬州 225009; 2. 军事科学院军事医学研究院微生物流行病学研究所)

【摘要】 CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated nuclease 9) 技术凭借效率高、简便、成本低和易操作的特点成为当今主流的基因编辑系统, 并被广泛应用于基础研究和临床应用研究。然而, CRISPR/Cas9 基因编辑技术潜在的安全风险引起广泛关注。已有研究表明, CRISPR/Cas9 基因编辑技术存在脱靶、染色体缺失、碎裂和 DNA 损伤修复功能异常等安全风险。本文主要对 CRISPR/Cas9 系统潜在的安全风险与防范策略进行概述, 为 CRISPR/Cas9 系统能更加安全有效的应用于临床提供参考。

【关键词】 CRISPR/Cas9; 基因编辑; 安全性; 风险; 综述

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2024)08-0976-04

[Journal of Pathogen Biology. 2024 Aug.; 19(8):976-979.]

Research progress on the safety of CRISPR/Cas9 gene editing technology

FANG Mengya^{1,2}, SONG Yingjie², JIN Li², LI Hao², SUN Yansong², LIU Zongping¹ (1. Institute of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China; 2. Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medicine, Academy of Military Sciences)

【Abstract】 CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated nuclease 9) technology has emerged as the predominant gene editing system owing to its high efficiency, simplicity, low cost and easy operation. It has been widely used in basic research and clinical application research. However, the potential safety risks of CRISPR/Cas9 gene editing technology have raised widespread concern. Previous studies have shown that CRISPR/Cas9 gene editing technology has safety risks such as off-target, chromosome deletion, chromothripsis and dysfunction of DNA damage repair. This review summarizes the potential security risks and prevention strategies of CRISPR/Cas9 system, so as to provide reference for the development of safe and effective CRISPR/Cas9 system for clinical application.

【Keywords】 CRISPR/Cas9; gene editing; safety; risks; review

***成簇规则间隔短回文重复序列 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR)/CRISPR 相关 (CRISPR-associated, Cas) 系统是原核生物的一种天然免疫系统, 由 CRISPR 基因座、Cas 蛋白及反式激活 crRNA (trans-activating crRNA, tracrRNA) 三部分组成, 通过识别间隔序列邻近基序 (protospacer adjacent motif, PAM) 序列来实现免疫防御功能^[1]。CRISPR 基因座是原核生物基因组内的一段重复序列, 主要由前导序列、重复序列和间隔序列构成^[2-3]。Cas 基因是编码 Cas 蛋白的保守序列, 位于 CRISPR 基因附近或分散于基因组的其他位置。根据 Cas 蛋白的特性, CRISPR/Cas 系统分为 I 型、II 型和 III 型, 其中 I 型和 III 型需要借助复杂的蛋白复合体才能发挥作用, 而 II 型系统仅通过单个 Cas 蛋白和导向 RNA (guide RNA, gRNA) 即可对靶位点进行编辑, 因此成为广泛应用的基因编辑工具^[4]。

CRISPR/Cas9 系统因其简单高效的特点, 成为最常用的基因编辑工具。其基本原理是 Cas9 蛋白与单导向 RNA (single guide RNA, sgRNA) 形成核糖核蛋白 (Ribonucleoprotein, RNP) 复合物, 对靶位点进行切割, 形成 DNA 双链断裂 (Double-Strand Break, DSB)^[2], 之后宿主细胞主要通过非同源末端连接 (Non-homologous end joining, NHEJ) 和同源定向修复 (Homology directed repair, HDR) 两种途径进行修复^[5]。

NHEJ 途径直接连接断裂末端, 导致插入/缺失等突变; 而 HDR 途径则依赖同源修复模板进行精确修复/插入, 进而实现基因敲入和碱基编辑等基因组遗传修饰^[3]。

CRISPR 基因编辑技术可实现对生物体基因组的定点修饰、删除和插入, 目前广泛应用于基因敲除、定向突变、基因激活、疾病模型构建和基因治疗等方面。近几年, CRISPR/Cas9 技术在临床应用方面取得了重大突破: 2019 年, 研究人员利用 CRISPR 编辑技术治疗艾滋病和白血病患者, 将 CRISPR 编辑后的造血干细胞和祖细胞移植到患者体内, 患者的急性淋巴细胞白血病病情得到了缓解, 初步探索了基因编辑在临床应用上的安全性和可行性^[6]; 2020 年, 研究者将 CRISPR 技术用于 β -地中海贫血 (β -mediterranean anemia, TDT) 和镰刀状细胞贫血 (sickle cell disease, SCD) 的临床治疗, 通过基因编辑的

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目 (No. 31901051)。

** **【通讯作者】** 李浩, E-mail: lihao88663239@126.com

孙岩松, E-mail: sunys6443@126.com

刘宗平, E-mail: liuzongping@yzu.edu.cn

【作者简介】 方梦雅 (1999-), 女, 山西运城人, 在读硕士研究生, 主要从事基因编辑导致 DNA 损伤与修复机制的研究。
E-mail: fangmy2023@163.com

CD34⁺细胞分别治疗 TDT 患者和 SCD 患者,结果显示 TDT 患者的血红蛋白呈全细胞分布,SCD 患者的血管闭塞症状得到缓解,该治疗方法取得了初步成功^[7]。2023 年 11 月 16 日,美国福泰制药(Vertex Pharmaceuticals)和瑞士基因编辑公司(CRISPR Therapeutics)联合宣布,基于 CRISPR 的基因编辑疗法药物获英国药品和保健产品监管机构(MHRA)批准上市,用于治疗镰状细胞病和输血依赖性 β -地中海贫血,并且此药物成为全球首个获批上市的 CRISPR 基因编辑治疗药物。此外,CRISPR/Cas9 技术还被广泛应用于呼吸道疾病细胞和动物模型的构建,以及筛查与呼吸道感染和肺癌发展有关的因素等方面,为肺部和呼吸道疾病的治疗提供了可能性。在植物育种方面,CRISPR/Cas9 技术也被成功应用于普通作物的改良,包括水稻、小麦、玉米、番茄、苹果、苜蓿等农作物。但是,在 CRISPR/Cas9 基因编辑技术被广泛应用的同时其潜在的安全风险逐渐显现。

本文将简要介绍 CRISPR/Cas9 技术及其作用机制,主要针对该技术目前存在的脱靶、染色体缺失、碎裂以及 DNA 损伤修复功能异常等安全风险进行综述,为安全合理使用或改进该技术提供思路。

1 CRISPR/Cas9 技术应用的潜在风险

1.1 脱靶风险

脱靶效应是指 sgRNA 与非靶点 DNA 序列形成错配,导致生物体在基因组水平的异常变化,包括大片段缺失和基因组重排^[8]。脱靶效应可能导致基因突变,造成基因功能的丧失,从而在动物体内引发癌变或在植物中引起不良表型^[9]。有研究表明,CRISPR/Cas9 基因编辑技术在应用中存在脱靶风险,例如,Fu 等^[10]设计 6 条靶向人类细胞内源性位点的 sgRNAs,结果显示在人骨肉瘤细胞中有 4 条 sgRNAs 可观察到脱靶效应。另外,Pattanayak 等^[11]利用体外筛选和高通量测序技术,检测 8 个 RNP 复合物在 10¹² 个潜在脱靶位点的脱靶情况,结果发现了其在人基因组中 5 个潜在的脱靶位点。Wienert 等^[12]利用 Discover-Seq (discovery of in situ Cas off-targets and verification by sequencing)脱靶效应检测系统,对小鼠肝脏中的 PCSK9 基因进行检测,发现了 36 个潜在的脱靶位点。研究表明,影响 CRISPR/Cas9 系统脱靶的因素主要包括 sgRNA 与靶序列的错误匹配、PAM 序列以及 Cas9 的自身结构、剪切活性、质粒转染浓度等,其中 sgRNA 与靶序列的错配是影响 CRISPR/Cas9 脱靶的关键因素。

1.2 染色体缺失风险

染色体缺失是指染色体数量缺失或染色体片段缺失,这种异常情况导致细胞内遗传物质的结构发生改变,从而影响到机体细胞的正常增殖,并可能引发基因功能的丧失。有研究表明,CRISPR/Cas9 基因编辑技术在应用中存在染色体缺失的潜在风险。例如,Connor 等^[13]通过单细胞转录组测序和微滴数字 PCR 对人原代 T 细胞进行了系统分析,发现在 CRISPR/Cas9 靶向的基因组目标位点会出现 T 细胞染色体缺失。尽管 Cas9 诱导的染色体缺失的 T 细胞在体外可以持续存活数周,但其适应性和增殖能力均降低。另一方面,Cullot 等^[14]发现 CRISPR/Cas9 基因编辑可导致百万碱基规模的染色体缺失,研究人员观察到在使用癌细胞系和 p53 基因失活的永生化成纤维细胞时,由于 Cas9 介导的双链断裂,约有 10% 的癌细胞系和 7.7% 的成纤维细胞出现了染色体缺失现

象。另外,Wu 等^[15]运用高通量测序方法 PEM-seq,对 CRISPR/Cas9 编辑后的 T 细胞中的染色体结构进行了追踪分析,发现基因编辑导致的染色体缺失在小鼠体内持续存在 2 个月,并呈现出随机克隆扩增的趋势,存在肿瘤发生的风险。研究表明,CRISPR/Cas9 基因编辑技术导致染色体缺失的原因可能和 Cas9 与 gRNA 的结合方向、gRNA 序列特征以及染色质可及性等因素有关。

1.3 染色体碎裂风险

染色体碎裂是广泛的染色体重排,仅限于一个或几个染色体,可能导致人类先天性疾病和癌症。染色体碎裂会严重威胁基因组的稳定性并干扰细胞的正常生命活动,进而促使细胞死亡、恶性增殖及癌变等。研究表明,CRISPR/Cas9 系统在临床治疗中可能会引起微核和染色体桥等结构的变异,从而增加染色体断裂的风险。Mitchell 等^[16]对临床相关细胞中的特定位点进行基因编辑,之后通过单细胞全基因组测序证明,CRISPR/Cas9 编辑可能会产生核、微核和染色体桥的结构缺陷,尤其在活跃分裂的细胞中。此外,基因编辑会导致微核和染色体桥的形成增加 20 倍,进而引发染色体碎裂。研究表明,CRISPR/Cas9 基因编辑导致染色体碎裂的原因可能与靶位点的选择、DNA 修复效率、靶序列上癌基因和肿瘤抑制因子的分布密度、靶细胞类型以及所使用的编辑方案等有关。

1.4 DNA 损伤修复功能异常风险

DNA 损伤修复是指生物细胞内的 DNA 分子在外源性或内源性因子的作用下受到损伤,随后机体利用强大的 DNA 损伤修复系统进行修复的过程。对 DNA 损伤修复过程的深入了解有助于阐明细胞衰老、癌变和基因突变的机制。CRISPR/Cas9 基因编辑可能会导致 DNA 双链断裂,从而引起 DNA 损伤。当 DNA 损伤无法得到修复时,会导致一系列后果,包括功能异常、疾病的发生,甚至可能导致死亡。CRISPR/Cas9 基因编辑技术依赖 Cas9 酶在特定靶位点上对 DNA 进行切割,随后,细胞通过 DNA 修复机制对 DNA 断裂进行修复,然而,这些修复机制并不始终有效,在某些情况下,DNA 片段可能会被删除或重排,甚至不相关的 DNA 片段可能被整合到染色体中,从而导致 DNA 修复功能异常的风险。Haapaniemi 等^[17]研究者证明,在永生人视网膜色素上皮细胞中,CRISPR/Cas9 基因编辑可诱导肿瘤抑制基因 p53 介导的 DNA 损伤反应和细胞周期阻滞。同时,研究证明,抑制 p53 可防止损伤反应并增加供体模板的同源重组率,进一步证明 CRISPR/Cas9 系统可能导致 DNA 损伤修复功能异常^[17-18]。Liu 等^[19]通过转录组测序发现,CRISPR 编辑靶向 LINE-1 和 Alu 重复序列,可能导致 p53 等 DNA 损伤修复途径异常,他们观察到使用 CRISPR/Cas9 靶向高度重复的人类内源性逆转录转座子 LINE-1 和 Alu 会导致染色体中大量的 DNA 双链断裂。同时,转录组测序结果表明,在靶向 LINE-1 和 Alu 重复序列后,几乎所有的细胞过程,即 DNA 合成(复制)、RNA 合成(转录)和蛋白质合成(翻译起始和延伸)都发生了变化。GO 功能富集分析显示,共同差异基因在 p53 和 DNA 损伤修复、细胞周期和有丝分裂检查点、细胞凋亡和一些癌症相关途径显著富集。Alvarez 等^[20]研究人员使用计算方法分析了为人类细胞设计的 CRISPR 文库,研究表明,在 CRISPR 基因编辑中,关键肿瘤抑制蛋白 p53 可能会导致细胞毒性和基因组不稳定性,进而引起肿瘤的发生。研究表明,CRISPR/

Cas9 基因编辑技术导致 DNA 损伤修复异常的原因包括 DNA 损伤修复途径的选择、染色质环境、邻近靶点的 DNA 序列特征、脱靶区域的存在以及慢病毒转导效率等。

2 提高 CRISPR/Cas9 安全性的方法

为了降低 CRISPR/Cas9 技术在应用中存在的风险,提高 CRISPR/Cas9 系统的精确性和安全性,研究人员采取以下方法进行改进:第一,对 Cas9 进行改进,通过减少非特异性 sgRNA 与 DNA 的结合提高 SpCas9 (*Streptococcus pyogenes* Cas9) 的保真度,特别是非靶向 DNA 链^[21]。如研究人员通过对 SpCas9 进行改进,设计出突变体如增强特异性化脓性链球菌 Cas9 (enhanced *Streptococcus pyogenes* Cas9, eSpCas9)、高保真化脓性链球菌 Cas9 (*Streptococcus pyogenes* Cas9- high fidelity variant #1, SpCas9-HF1) 和超精确 Cas9 (hyper-accurate Cas9, hypaCas9)^[22], GUIDE-seq 分析显示,与 SpCas9-HF1 和 eSpCas9 相比, hypaCas9 表现出同样或更高的全基因组特异性,表明相比 eSpCas9 和 SpCas9-HF1 突变体, hypaCas9 具有更高的靶活性^[22-24];此外,还可以通过使用更罕见 PAM 序列的新 Cas9 同源物来降低 CRISPR/Cas9 系统的风险,例如,来自金黄色葡萄球菌的 SaCas9 (*Staphylococcus aureus* Cas9) 需要更复杂的 5'-NGGRRRT-3' PAM 序列^[25]。第二,对 sgRNA 进行改进以提高基因编辑的保真度^[24],靶向同一基因位点的不同 sgRNA 可能产生不同的编辑结果,因此应在实验之前筛选适合基因座的 sgRNA^[26];同时,延长或截断 sgRNA 可以增强 Cas9 活性的特异性^[27-31],研究表明,在 sgRNA 的 5' 端添加两个鸟嘌呤核苷酸(称为 5'-GGX20)^[27]或在 5' 端截断 2-3 bp 的 sgRNA^[28],可以在保持靶编辑效率的同时减少脱靶效应;对 sgRNA 进行化学修饰也会影响其脱靶效应^[21],一项研究表明,在 sgRNA 的核糖-磷酸主链插入 2'-O-甲基-3'-磷酸酯(MP)修饰,可以增强靶特异性,同时降低脱靶活性^[32]。第三,使用碱基编辑器,将 Cas9 切割酶与核苷酸脱氨酶偶联,实现单核苷酸转化而不引入 DSB,可降低脱靶效应,避免高水平的染色体丢失,最常用的碱基编辑器包括腺嘌呤和胞嘧啶碱基编辑器^[21]。第四,改进 CRISPR/Cas9 的递送方式,Cas9/sgRNA 可以通过质粒转染、RNP 电穿孔或病毒转导递送。其中,RNP 电穿孔具有更高的靶编辑效率和更低的脱靶突变^[33-34];与 RNP 电穿孔类似,Cas9 mRNA 和 sgRNA 也可以通过电穿孔或脂质体载体传递到细胞中提高基因编辑保真度^[35-36]。第五,使用 RE-DSRNP (A transgene-free method for rapid and efficient generation of precisely edited pigs without monoclonal selection) 技术方法,RE-DSRNP 具有双 sgRNA 的精确高效编辑特性,在快速生成精确编辑的供体细胞中发挥重要作用,有利于基因组学和疾病的研究^[37]。

3 总结与展望

以 CRISPR/Cas9 系统为主的基因编辑技术是一种高效、有潜力的技术。由于它快速高效的特点,目前已被广泛应用于各个领域。然而,尽管其在科学界和医学领域取得了显著进展,但应用过程中仍存在一系列潜在的安全风险,包括易脱靶、导致染色体缺失、碎裂和 DNA 损伤修复异常等。因此,未来的研究应重点关注如何降低其脱靶效应,以及在临床治疗中避免对基因组造成损伤,研究开发出更加安全有效的基因编辑系统。

尽管针对降低 CRISPR/Cas9 系统脱靶风险的研究已经取得了一定进展,但对于如何缓解其对基因组损伤的认识仍然尚浅。已有研究表明,在应用 CRISPR/Cas9 技术时,可以通过避免靶向某些活性染色质特征标记的区域,如 DHS(与基因调控区相关),H3K79me2 和 H3K36me3(与转录基因体中的某些片段相关),以及避开某些邻近 DNA 基序和脱靶区域,以减少 p53 介导的细胞毒性^[20],进而减少基因损伤。然而,其具体作用机制仍需进一步阐明。

目前,我们对于 CRISPR/Cas9 技术的安全性风险以及相关机制的认知尚存在不足之处。在未来的研究中,亟需更多关注并深入研究其在应用过程中可能存在的潜在风险。随着科研人员对此技术的不断探索,我们相信在不久的将来,CRISPR/Cas9 技术能够在临床靶向治疗方面实现更加安全高效的应用。

【参考文献】

- [1] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821.
- [2] Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, et al. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin [J]. *Microbiology (Reading)*, 2005, 151 (Pt 8): 2551-2561.
- [3] Mojica FJ, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J, et al. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements [J]. *J Mol Evol*, 2005, 60(2): 174-182.
- [4] Jiang W, Bikard D, Cox D, et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 233-239.
- [5] Jiang F, Doudna JA. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms [J]. *Annu Rev Biophys*, 2017, 46: 505-529.
- [6] Xu L, Wang J, Liu Y, et al. CRISPR-Edited Stem Cells in a patient with HIV and acute lymphocytic leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2019, 381(13): 1240-1247.
- [7] Frangoul H, Altshuler D, Cappellini MD, et al. CRISPR-Cas9 gene editing for sickle cell disease and β -thalassemia [J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(3): 252-260.
- [8] Cai Y, Chen L, Sun S, et al. CRISPR/Cas9-mediated deletion of large genomic fragments in soybean [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19 (12).
- [9] Guilinger JP, Pattanayak V, Reyon D, et al. Broad specificity profiling of TALENs results in engineered nucleases with improved DNA-cleavage specificity [J]. *Nat Methods*, 2014, 11 (4): 429-435.
- [10] Fu YF, 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): 822-826.
- [11] Pattanayak V, Lin S, Guilinger JP, et al. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 839-843.
- [12] Wienert B, Wyman SK, Richardson CD, et al. Unbiased detection of CRISPR off-targets in vivo using DISCOVER-Seq [J]. *Science*, 2019, 364(6437): 286-289.

- [13] Connor AT, Brandes N, Bueno R, et al. Mitigation of chromosome loss in clinical CRISPR-Cas9-engineered T cells [J]. *Cell*, 2023, 186(21):4567-4582.
- [14] Cullot G, Boutin J, Toutain J, et al. CRISPR-Cas9 genome editing induces megabase-scale chromosomal truncations [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):1136.
- [15] Wu JC, Zou Z, Liu Y, et al. CRISPR/Cas9-induced structural variations expand in T lymphocytes in vivo [J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(19):11128-11137.
- [16] Mitchell LL, Papathanasiou S, Doerfler PA, et al. Chromothripsis as an on-target consequence of CRISPR-Cas9 genome editing [J]. *Nat Genet*, 2021, 53(6):895-905.
- [17] Haapaniemi E, Botla S, Persson J, et al. CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response [J]. *Nat Med*, 2018, 24(7):927-930.
- [18] Enache OM, Rendo V, Abdusamad M, et al. Cas9 activates the p53 pathway and selects for p53-inactivating mutations [J]. *Nat Genet*, 2020, 52(7):662-668.
- [19] Liu Y, Ma G, Gao Z, et al. Global chromosome rearrangement induced by CRISPR-Cas9 reshapes the genome and transcriptome of human cells [J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(6):3456-3474.
- [20] Alvarez MM, Biayna J, Supek F. TP53-dependent toxicity of CRISPR/Cas9 cuts is differential across genomic loci and can confound genetic screening [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1):4520.
- [21] Guo C, Ma X, Gao F, et al. Off-target effects in CRISPR/Cas9 gene editing [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2023, 11:1143157.
- [22] Chen JS, Dagdas YS, Kleinstiver BP, et al. Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy [J]. *Nature*, 2017, 550(7676):407-410.
- [23] Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects [J]. *Nature*, 2016, 529(7587):490-495.
- [24] Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, et al. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity [J]. *Science*, 2016, 351(6268):84-88.
- [25] Kumar N, Stanford W, de Solis C, et al. The development of an AAV-Based CRISPR SaCas9 genome editing system that can be delivered to neurons in vivo and regulated via doxycycline and cre-recombinase [J]. *Front Mol Neurosci*, 2018, 11:413.
- [26] Doench JG, Fusi N, Sullender M, et al. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9 [J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(2):184-191.
- [27] Cho SW, Kim S, Kim Y, et al. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases [J]. *Genome Res*, 2014, 24(1):132-141.
- [28] Fu Y, Sander JD, Reyon D, et al. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(3):279-284.
- [29] Liang P, Xie X, Zhi S, et al. Genome-wide profiling of adenine base editor specificity by EndoV-seq [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):67.
- [30] Kim D, Lim K, Kim ST, et al. Genome-wide target specificities of CRISPR RNA-guided programmable deaminases [J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(5):475-480.
- [31] Kim D, Kim S, Kim S, et al. Genome-wide target specificities of CRISPR-Cas9 nucleases revealed by multiplex Digenome-seq [J]. *Genome Res*, 2016, 26(3):406-415.
- [32] Ryan DE, Taussig D, Steinfeld I, et al. Improving CRISPR-Cas specificity with chemical modifications in single-guide RNAs [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(2):792-803.
- [33] Kim S, Kim D, Cho SW, et al. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins [J]. *Genome Res*, 2014, 24(6):1012-1019.
- [34] Ramakrishna S, Kwaku DA, Bloor J, et al. Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA [J]. *Genome Res*, 2014, 24(6):1020-1027.
- [35] Evers M, Du W, Yang Q, et al. Delivery of modified mRNA to damaged myocardium by systemic administration of lipid nanoparticles [J]. *J Control Release*, 2022, 343:207-216.
- [36] Yu X, Yang Z, Zhang Y, et al. Lipid nanoparticle delivery of chemically modified NGF(R100W) mRNA alleviates peripheral neuropathy [J]. *Adv Healthc Mater*, 2023, 12(3):e2202127.
- [37] Xu K, Zhang X, Liu Z, et al. A transgene-free method for rapid and efficient generation of precisely edited pigs without monoclonal selection [J]. *Sci China Life Sci*, 2022, 65(8):1535-1546.

【收稿日期】 2024-03-25 【修回日期】 2024-06-08

(上接 975 页)

- [4] File TM, Goldberg L, Das A, et al. Efficacy and safety of intravenous to oral lefamulin, a pleuromutilin antibiotic, for the treatment of community acquired bacterial pneumonia; the phase III lefamulin evaluation against pneumonia (LEAP 1) trial [J]. *Clin Infect Dis*, 2019, 69(11):1856-1867.
- [5] Damato M, Rea G, Carnevale V, et al. Assessment of thoracic ultrasound in complementary diagnosis and in follow up of community-acquired pneumonia (cap) [J]. *BMC Med Imaging*, 2017, 17(1):52.
- [6] Sperandio M, Carnevale V, Muscarella S, et al. Clinical application of transthoracic ultrasonography in inpatients with pneumonia [J]. *Eur J Clin Invest*, 2021, 41(1):1-7.
- [7] 中华医学会, 中华医学杂志社, 中华医学会全科医学分会, 等. 成人社区获得性肺炎基层诊疗指南(2018年) [J]. *中华全科医师杂志*, 2019, 18(2):117-126.
- [8] Bouhemad B, Brisson H, Le Guen M, et al. Bedside ultrasound assessment of positive end-expiratory pressure-induced lung recruitment [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012, 185(4):457-458.
- [9] 宋珈颖, 王婷, 李刚. 细菌感染性肺炎患儿病原菌分布特点及不同严重程度患儿炎症指标差异性分析 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2023, 18(12):1452-1456.
- [10] 王丹, 孙树荣, 曲芬. 北苑地区儿童冬春季社区获得性肺炎非细菌性病原体流行病学分析 [J]. *标记免疫分析与临床*, 2021, 28(3):402-405.
- [11] 叶林燕, 易飞, 黄荷. 婴儿细菌感染性肺炎的临床特点及病原学分布回顾性分析 [J]. *中国医学创新*, 2022, 19(35):77-81.
- [12] 王丹丹, 赵真真. C反应蛋白、白细胞、血清淀粉样蛋白 A 和降钙素原在诊断细菌感染性肺炎疾病中的价值 [J]. *现代实用医学*, 2022, 34(5):680-682.
- [13] Douglas IS. Pulmonary infections in critical/intensive care-rapid diagnosis and optimizing antimicrobial usage [J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2017, 23(3):198-203.
- [14] Dargent A, Chatelain E, Si-Mohamed S, et al. Lung ultrasound score as a tool to monitor disease progression and detect ventilator-associated pneumonia during COVID-19-associated ARDS [J]. *Heart Lung*, 2021, 50(5):700-705.
- [15] Jones BP, Tay ET, Elikashvili I, et al. Feasibility and safety of substituting lung ultrasonography for chest radiography when diagnosing pneumonia in children; a randomized controlled trial [J]. *Chest*, 2019, 150(1):131-138.

【收稿日期】 2024-04-06 【修回日期】 2024-06-27