

线粒体基因编辑技术的研究进展与应用前景

摘要：线粒体是真核细胞中负责能量代谢的关键细胞器，其自身携带的线粒体DNA (mtDNA) 突变可导致多种严重的遗传性疾病。近年来，线粒体基因编辑技术的快速发展为治疗这类疾病提供了新的可能。本文综述了线粒体基因编辑技术的发展历程，从早期的锌指核酸酶 (ZFN) 和转录激活因子样效应物核酸酶 (TALEN) 到新一代的碱基编辑技术 (DdCBE、TALED 等)，介绍了各类编辑工具的核心原理及其在线粒体中的适配策略。同时，本文总结了该技术在线粒体遗传病治疗、农业育种以及疾病模型构建等方面的应用进展，并对当前面临的脱靶效应、递送效率、伦理争议等挑战进行了分析，最后展望了未来的发展方向。

关键词：线粒体基因编辑；碱基编辑；DdCBE；TALED；线粒体遗传病；基因工程

Abstract: Mitochondria are essential organelles responsible for energy metabolism in eukaryotic cells. Mutations in mitochondrial DNA (mtDNA) can lead to various severe genetic disorders. In recent years, the rapid development of mitochondrial gene editing technologies has opened new possibilities for treating these diseases. This review summarizes the developmental history of mitochondrial gene editing technologies, from early zinc-finger nucleases (ZFNs) and transcription activator-like effector nucleases (TALENs) to next-generation base editing tools such as DdCBE and TALED. The core principles and mitochondrial adaptation strategies of these editing tools are discussed. Furthermore, this review covers the application progress in mitochondrial disease treatment, agricultural breeding, and disease model construction, while also analyzing current challenges including off-target effects, delivery efficiency, and ethical concerns. Finally, future development directions are discussed.

Keywords: mitochondrial gene editing; base editing; DdCBE; TALED; mitochondrial diseases; genetic engineering

一、引言

线粒体是真核细胞中一种重要的细胞器，长期以来被称为细胞的“能量工厂”。它通过氧化磷酸化过程产生三磷酸腺苷 (ATP)，为细胞的各种生命活动提供能量。不

过线粒体的功能并不仅限于此，它还参与了细胞凋亡调控、钙离子稳态维持以及多种代谢中间产物的合成等生物学过程[1]。线粒体功能的正常与否，直接关系到整个机体的健康。

与其他细胞器不同，线粒体拥有自己独立的基因组——线粒体 DNA (mtDNA)。人类 mtDNA 是一个环状双链分子，全长约 16569 个碱基对，编码 37 个基因，包括 13 种氧化磷酸化相关蛋白、22 种 tRNA 和 2 种 rRNA[2]。mtDNA 有几个显著特点：母系遗传、多拷贝性（每个细胞含有成百上千个 mtDNA 分子），以及较高的突变率，后者可能与线粒体内活性氧水平较高以及 DNA 修复机制相对薄弱有关[4]。

当 mtDNA 发生致病性突变时，就可能导致线粒体遗传病。这类疾病表现形式多样，常见的包括 Leber 遗传性视神经病变 (LHON)、线粒体脑肌病伴乳酸中毒和卒中样发作 (MELAS) 等[3]。据估计线粒体疾病总发病率约为 1/5000，症状往往涉及神经系统、肌肉系统等多个系统，诊断和治疗都面临很大挑战[8]。传统治疗主要依靠对症处理，难以从根本上解决问题。

近年来，随着基因编辑技术的飞速发展，研究者们开始将目光投向线粒体基因组。如果能在 mtDNA 水平上直接进行精确编辑，理论上就可以从根源上治疗线粒体遗传病。笔者认为，线粒体基因编辑技术的出现标志着我们从"被动应对"走向了"主动修正"的新阶段。本文旨在对线粒体基因编辑技术的研究进展做一个综述，涵盖其发展历程、核心技术原理及应用前景。

二、线粒体基因编辑技术的发展历程

（一）早期技术探索：ZFN 与 TALEN 的应用与局限

在讨论线粒体基因编辑时，有必要提及两类较早的工具——锌指核酸酶 (ZFN) 和转录激活因子样效应物核酸酶 (TALEN)。ZFN 利用锌指结构域识别特定 DNA 序列，通过 FokI 核酸酶结构域切割目标 DNA[4]。很早就有研究者尝试将 ZFN 应用于线粒体基因组编辑，但效果不理想，主要因为 ZFN 蛋白需要被有效递送到线粒体基质中，而这一过程受到线粒体膜屏障的严重限制。

TALEN 的出现一定程度上改善了这种状况。约 2013 年前后，有研究团队开始探索 TALEN 在线粒体中的编辑能力[2]。TALEN 的设计比 ZFN 更灵活，TALE 重复单元对碱基的识别也更精准。然而值得注意的是，不管是 ZFN 还是 TALEN，它们都依赖于在目标位点产生 DNA 双链断裂 (DSB)。这就带来了一个棘手的问题：线粒体中的同源重组 (HR) 修复途径非常低效[1]。即便成功产生了双链断裂，后续的精确保复也难以保证，这也解释了为什么早期尝试的编辑效率和精确性都不太令人满意。

（二）新一代技术的崛起：碱基编辑技术

真正让线粒体基因编辑迎来转机的是碱基编辑技术。2020 年，Mok 等人报道了 DdCBE（DddA-derived cytosine base editor），一种基于细菌毒素 DddA 改造的胞嘧啶碱基编辑器[6]。DdCBE 不需要产生双链断裂，而是直接将胞嘧啶（C）脱氨为尿嘧啶（U），经 DNA 复制后实现 C-to-T 的碱基转换。这一策略巧妙绕开了线粒体中双链断裂修复效率低下的问题，使编辑效率有了质的飞跃。

2022 年 Cho 等人又开发出 TALEd，成功实现了线粒体 DNA 中 A-to-G 的碱基转换[5]。TALED 采用工程化改造的腺嘌呤脱氨酶 TadA-8e，能对单链 DNA 上的腺嘌呤进行脱氨。DdCBE 和 TALEd 的相继问世，使线粒体碱基编辑理论上可覆盖四种转换突变类型，极大拓展了可靶向的致病突变范围[2]。笔者认为，碱基编辑技术的出现是线粒体基因编辑领域的分水岭，将这一领域从概念验证推进到了具有实际应用潜力的阶段。

（三）里程碑进展：人类胚胎中的线粒体基因编辑

2022 年，Wei 等人报道了一项引起广泛关注的工作——在人类卵裂期胚胎中成功应用 DdCBE 技术，实现了线粒体基因组的高效碱基编辑[7]。研究发现，在胚胎发育的 8 细胞期进行编辑时，编辑效率最高可达约 60%，脱靶效应也相对可控。这是首次在人类胚胎中实现线粒体基因编辑，科学意义毋庸置疑。

不过这项工作也引发了不少讨论。人类胚胎的基因编辑本身就涉及复杂的伦理问题，而编辑过程中观察到的脱靶突变也提示该技术离临床应用还有距离。尽管如此，笔者认为这一里程碑式的工作为未来预防和治疗线粒体遗传病提供了重要的概念验证。

三、线粒体基因编辑的核心技术原理

（一）ZFN 与 TALEN 的编辑机制

ZFN 和 TALEN 虽然在靶点识别方式上不同，但都依赖 FokI 核酸酶产生 DNA 双链断裂。ZFN 的核心是锌指结构域，每个锌指识别 3 个碱基对，多个锌指串联可识别更长的靶序列[4]。通常需要设计两个 ZFN 单体分别结合到靶位点两侧，FokI 结构域形成二聚体后激活核酸酶活性，在两个结合位点之间产生双链断裂。

TALEN 的设计原理类似，靶标识别模块换成了 TALE 重复单元。每个 TALE 重复单元约 34 个氨基酸，其中第 12 和第 13 位的重复可变双残基（RVD）决定碱基识别特异性：NI 识别 A、HD 识别 C、NG 识别 T、NN 识别 G[1]。这种一对一的识别规则使 TALEN 的设计比 ZFN 更加直观灵活。

将这两类工具应用于线粒体时，一个关键环节是需要添加线粒体靶向信号序列（MTS），以引导编辑蛋白穿过线粒体双层膜进入基质[4]。但实际操作中，蛋白递送效率是主要瓶颈。研究者常采用电穿孔或脂质体转染将 mRNA 或蛋白导入细胞，但最终到达线粒体内部的蛋白量有限，很大程度制约了编辑效率。

（二）碱基编辑技术的分子机制

碱基编辑的核心思路是在不产生双链断裂的前提下实现碱基的直接转换，这使其特别适合应用于线粒体。

DdCBE 的分子设计颇为精巧。它利用来源于伯克霍尔德菌的 DddA 毒素——一种能催化双链 DNA 上胞嘧啶脱氨的独特酶。由于完整的 DddA 对细胞有毒性，研究者将其拆分为两个无活性的半体，分别与 TALE 结构域融合表达[6]。当两个融合蛋白通过 TALE 各自结合到目标 DNA 位点附近时，DddA 半体在空间上靠近并重组为有活性的脱氨酶，从而对靶标链上的胞嘧啶脱氨。系统中还包含尿嘧啶糖基化酶抑制剂（UGI），可阻止尿嘧啶被碱基切除修复去除，进一步提高编辑效率[6]。

在 DdCBE 之后，研究者又开发了多种改进版本，如 TdCBE 和 mitoBEs，通过优化脱氨酶组分和连接肽设计，进一步提高了编辑效率和靶向范围[6]。

TALED 的工作原理有所不同。它使用定向进化获得的高效腺嘌呤脱氨酶 TadA-8e，与 TALE 融合后在线粒体 DNA 上实现 A-to-G 转换[5]。值得注意的是，TadA-8e 的作用底物是单链 DNA，因此 TALED 的编辑可能涉及转录过程中 DNA 双链的短暂解旋，或利用 DNA 复制时暴露出的单链区域。研究表明 TALED 在多种人类细胞系中均展现出可观的编辑活性，填补了线粒体碱基编辑的一个重要空白。

（三）CRISPR 系统在线粒体中的适配尝试

提到基因编辑，大多数人首先想到的可能是 CRISPR-Cas 系统。CRISPR-Cas9 在细胞核基因组编辑中已取得巨大成功，但应用到线粒体中却面临根本性障碍。问题主要出在引导 RNA（gRNA）上：Cas9 需要 gRNA 引导定位到靶位点，但 gRNA 很难被有效导入线粒体基质[1]。虽然在 gRNA 上添加信号序列来促进线粒体定位的尝试一直在进行，但效果都不太理想。

早期有研究者曾尝试将 CRISPR-Cas9 组件递送至线粒体，但并未检测到明确的 gRNA 依赖性编辑活性。后来也有团队探索了利用 Cas12a 系统进行线粒体编辑的可能性，虽然 Cas12a 识别 AT 富集的 PAM 序列，在某些方面不同于 Cas9，但 gRNA 递送的核心难题依然没有得到根本解决[9]。

值得关注的是 Wang 等人在 2026 年报道的 RMTS-CRISPR 策略[17]，试图通过全新机制将 gRNA 引导至线粒体内部，据称取得了一定进展。如果这一结果能被更多实验室重复验证，CRISPR 系统有望成为线粒体基因编辑的又一有力工具。不过就目前而言，笔者认为碱基编辑技术仍是最成熟可靠的路线，CRISPR 在线粒体中的应用还有很长的路要走。

四、线粒体基因编辑技术的应用进展

（一）线粒体遗传病的治疗研究

线粒体基因编辑技术最受关注的应用方向，毫无疑问是线粒体遗传病的治疗。目前已知的线粒体疾病有数百种，但长期缺乏有效的治疗手段，基因编辑的出现给这个领域带来了新的希望。

在 Leber 遗传性视神经病变 (LHON) 方面，Kim 等人 2025 年的工作可以说是取得了比较重要的突破[11]。他们在 LHON 小鼠模型中使用 TALED (转录激活因子样效应物连接的脱氨酶) 进行体内线粒体碱基编辑，结果不仅成功恢复了突变位点的基因型，还观察到视觉功能的改善。这个研究的意义在于，它是比较早期的在活体动物中证明线粒体基因编辑能够真正恢复器官功能的工作之一，而不只是在细胞水平看看编辑效率。刘若武和张晗也对 LHON 的基因治疗进展做过梳理，认为这一领域的临床转化正在加速[16]。

MELAS 综合征 (线粒体脑肌病伴乳酸酸中毒和卒中样发作) 是另一种比较棘手的线粒体疾病，主要由 m.3243A>G 突变引起。Shoop 等人 2023 年报道了一种工程化的 mitoARCUS 核酸酶，能够在细胞中高效地消除携带 m.3243G 突变的线粒体 DNA[14]。这个策略的思路和碱基编辑不太一样，它不是去"修正"突变，而是直接"清除"突变的 mtDNA 拷贝，让野生型的 mtDNA 占据优势。笔者认为这种"选择性清除"的策略虽然显得较为简单直接，但在某些疾病场景下可能比精确修复更加实用。

在小鼠模型中，Guo 等人 2022 年的研究证明了 DdCBE 可以在小鼠体内实现高效的线粒体碱基编辑，而且更重要的是，这些编辑是可以遗传给后代的[13]。可遗传性这一点对于治疗线粒体疾病来说其实很关键，因为如果只是体细胞编辑，那每次都需要重新治疗，成本太高了。当然，这也同时引发了伦理方面的讨论，后面会再提到。

(二) 农业领域的应用

除了医学领域，线粒体基因编辑在农业上也有一定的应用前景。Nakazato 等人 2022 年在拟南芥中成功实现了线粒体基因组的靶向碱基编辑[15]，这个研究说明线粒体编辑技术并不局限于动物系统，在植物中同样可以发挥作用。植物的线粒体基因组与雄性不育性状之间有比较密切的关联，张硕等人的综述也讨论过通过编辑线粒体基因来创造细胞质雄性不育系的可能性[9]。从目前的文献来看，植物线粒体编辑的研究还处在比较早期的阶段，但考虑到作物育种的实际需求，笔者认为这个方向未来应该会有更多的工作出现。

(三) 疾病模型构建

线粒体基因编辑技术还有一个容易被忽视的应用，就是构建疾病模型。过去想研究某种线粒体突变的致病机制，往往只能从患者身上获取样本，或者用一些间接的方法来模拟。现在有了编辑工具，研究人员就可以在模式生物中精准引入特定的 mtDNA 突变，从而建立更可靠的疾病模型。比如 Kim 等人的工作本身就涉及 LHON 小鼠模型的构建和验证[11]，Cho 等人开发的 TALED 系统也为构建携带特定腺嘌呤

突变的动物模型提供了新的技术手段[12]。有了更好的模型，才能反过来推动治疗策略的开发，所以这个方向的价值是不应该被低估的。

五、线粒体基因编辑技术面临的挑战

（一）技术层面的挑战

虽然线粒体基因编辑技术发展很快，但问题也不少。脱靶效应可能是目前最让人头疼的一个。Wei 等人 2022 年的研究发现，DdCBE 在小鼠胚胎中不仅编辑了线粒体基因组，还在细胞核基因组中造成了大约 1500 个脱靶的单核苷酸变异（SNV）[10]。这个数字令人担忧，如果脱靶突变落在了某些关键的抑癌基因或者原癌基因上，后果可能很严重。Cho 等人在开发 TALEN 的时候也发现了类似的问题，他们观察到这种编辑器会导致转录组范围的 RNA 脱靶编辑[12]。虽然后来通过工程化改造降低了部分脱靶活性，但完全消除脱靶效应在目前来看还不太现实。

递送效率也是一个比较现实的困难。线粒体有双层膜结构，这本身就是一个天然的屏障。外源的大分子要穿过细胞膜、再穿过线粒体的两层膜才能到达 mtDNA，这个过程效率损失很大。现在常用的递送方式包括电穿孔、病毒载体等，但每种方法都有各自的局限性，没有一种特别理想的通用方案。

另外就是异质性（heteroplasmy）的问题。一个细胞里通常有成百上千个 mtDNA 拷贝，而且突变型和野生型往往是混合存在的。即使编辑工具能够工作，也很难保证把每一个突变的拷贝都修正过来。如果编辑后突变型 mtDNA 仍然占有一定比例，随着细胞分裂，突变型有可能又重新占据优势，导致治疗效果打折扣。

编辑范围的局限也值得注意。目前比较成熟的线粒体碱基编辑主要是 C-to-T 和 A-to-G 这两种转换，但很多致病突变并不属于这两种类型。其他类型的碱基转换，比如颠换（transversion），在技术实现上要困难得多，目前还没有特别好的解决方案。

（二）伦理与安全层面

说到线粒体基因编辑的伦理问题，最敏感的还是人类胚胎编辑。Wei 等人在人类胚胎中使用 DdCBE 的工作虽然展示了技术可行性[7]，但也引发了广泛的伦理讨论。胚胎编辑意味着修改是可遗传的，这会影响到后代的基因组成，很多人担心这会打开“设计婴儿”的大门。笔者认为，在科学上探索胚胎编辑的技术可行性本身没有问题，但距离真正应用到临床上，中间还有很长一段路要走，而且在伦理层面需要社会各方面达成共识才行。

脱靶效应带来的安全隐患在前面已经提到了。除了脱靶之外，线粒体编辑是否会影响细胞的能量代谢平衡、是否会产生长期的免疫反应，这些目前都还缺乏足够的数据来评估。

（三）监管层面

从监管的角度来看，全球范围内目前还没有一个统一的框架来规范线粒体基因编辑的研究和应用。不同国家和地区的政策差异很大，有的地方管得比较严，有的地方则相对宽松。技术发展的速度明显超过了政策制定的速度，这在一定程度上也造成了监管漏洞。2018 年的贺建奎事件就是一个教训，说明如果监管跟不上，可能会产生严重后果。

六、未来发展方向与展望

从目前的文献和技术发展趋势来看，线粒体基因编辑技术未来可能会在以下几个方向取得进展。

提高编辑精度是首要任务。针对脱靶问题，Kim 等人他们在 2025 年的工作中已经使用了高保真版本的编辑器（HiFi-DdCBE），在一定程度上降低了脱靶活性[11]。Cho 等人也通过对 TALEN 进行工程化改造来提高其特异性[12]。笔者认为，随着蛋白质工程和计算辅助设计的进步，未来出现更高精度、更低脱靶的编辑器是可以期待的。

在递送系统方面，腺相关病毒（AAV）和脂质纳米颗粒（LNP）是比较有前景的两种方案[19]。AAV 在基因治疗领域已经有了不少成功应用的先例，LNP 则在新冠疫苗中得到了大规模验证。如何把这些递送平台适配到线粒体编辑的场景中，是一个需要解决的问题。如果能够实现高效的体内递送，那线粒体基因治疗的临床转化就会向前迈出一大步。

编辑范围的拓展也是一个重要方向。Yi 等人 2024 年报道的 mitoBEs 系统实现了链选择性的线粒体 DNA 碱基编辑，扩大了可编辑的位点范围[18]。Wang 等人 2026 年的工作则尝试了一种基于工程化引导 RNA 的 CRISPR 线粒体基因治疗工具（RMTS-CRISPR），虽然 CRISPR 系统进入线粒体一直存在争议，但他们的研究提供了一种新的思路[17]。这些新工具的出现说明，这个领域还处于快速发展期，技术创新的空间很大。

从应用前景来看，除了传统的线粒体遗传病之外，衰老和代谢性疾病也是线粒体编辑技术可能介入的领域。线粒体功能下降被认为是衰老的一个重要驱动因素，如果能够通过编辑技术改善线粒体功能，或许能为延缓衰老提供新的干预手段。当然，这个想法目前还比较超前，需要更多的基础研究来支撑。

伦理和监管体系的完善同样不能落后于技术的发展。笔者认为，国际上需要建立一个类似于核技术应用领域的协调机制，对线粒体基因编辑的基础研究和临床转化进行分级管理。对于体细胞编辑，可以相对积极地推进临床试验；但对于生殖系编辑，仍然应该保持审慎的态度。

七、结论

线粒体基因编辑技术在过去几年经历了快速发展，从 DdCBE 到 TALED 再到各种改良版本，编辑工具的多样性和性能都有了明显提升。在应用层面，无论是线粒体遗传病的治疗探索、农业育种的初步尝试，还是疾病模型的构建，都展现了这一技术的潜力。不过也要看到，脱靶效应、递送效率、异质性处理等技术瓶颈还没有得到根本解决，伦理和监管方面的挑战同样不容忽视。从长远来看，笔者认为线粒体基因编辑有望成为治疗线粒体疾病的重要手段，但从实验室走向临床仍然需要时间和更多扎实的研究工作。希望随着技术的不断成熟和规范体系的建立，这一领域能够给患者带来真正的福音。

参考文献

- [1] Lim K. Mitochondrial genome editing: strategies, challenges, and applications[J]. BMB Reports, 2024, 57: 19-29.
- [2] Phan H T L, Lee H, Kim K. Trends and prospects in mitochondrial genome editing[J]. Experimental & Molecular Medicine, 2023, 55: 871-878.
- [3] Conroy G. Faulty mitochondria cause deadly diseases: fixing them is about to get a lot easier[J]. Nature, 2025, 646: 530-532.
- [4] 王逸辰, 王颖, 陈宇, 等. 线粒体基因编辑技术研究进展[J]. 浙江大学学报(医学版), 2023, 52: 460-472.
- [5] Cho S I, Lee S, Mok Y G, et al. Targeted A-to-G base editing in human mitochondrial DNA with programmable deaminases[J]. Cell, 2022, 185: 1764-1776.
- [6] Mok B Y, Kotrys A V, Raguram A, et al. CRISPR-free base editors with enhanced activity and expanded targeting scope in mitochondrial and nuclear DNA[J]. Nature Biotechnology, 2022, 40: 1378-1387.
- [7] Wei Y, Xu C, Feng H, et al. Human cleaving embryos enable efficient mitochondrial base-editing with DdCBE[J]. Cell Discovery, 2022, 8: 7.
- [8] Ball M, van Bergen N J, Compton A G, et al. Therapies for Mitochondrial Disease: Past, Present, and Future[J]. Journal of Inherited Metabolic Disease, 2025, 48: e70065.
- [9] 张硕, 阚俊虎, 周家伟, 等. 植物线粒体基因组编辑研究进展[J]. 生物技术通报, 2024, 40: 41-52.
- [10] Wei Y, Li Z, Xu K, et al. Mitochondrial base editor DdCBE causes substantial DNA off-target editing in nuclear genome of embryos[J]. Cell Discovery, 2022, 8: 27.
- [11] Kim S, Kim J, Cha S, et al. In vivo mitochondrial base editing restores genotype and visual function in a mouse model of LHON[J]. Nature Communications, 2025, 16: 10923.
- [12] Cho S I, Lim K, Hong S, et al. Engineering TALE-linked deaminases to facilitate precision adenine base editing in mitochondrial DNA[J]. Cell, 2024, 187: 95-109.
- [13] Guo J, Chen X, Liu Z, et al. DdCBE mediates efficient and inheritable modifications in mouse mitochondrial genome[J]. Molecular Therapy - Nucleic Acids, 2022, 27: 73-80.

- [14] Shoop W K, Lape J, Trum M, et al. Efficient elimination of MELAS-associated m.3243G mutant mitochondrial DNA by an engineered mitoARCUS nuclease[J]. *Nature Metabolism*, 2023, 5: 2169-2183.
- [15] Nakazato I, Okuno M, Zhou C, et al. Targeted base editing in the mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana*[J]. *PNAS*, 2022, 119: e2121177119.
- [16] 刘若武, 张晗. Leber 遗传性视神经病变的基因治疗进展[J]. *山东大学耳鼻喉眼学报*, 2024, 38: 154-158.
- [17] Wang Y, Su X, Chen Y, et al. A CRISPR-based mitochondrial gene therapy tool derived by engineering guide RNAs[J]. *Cell Reports*, 2026, 45: 116958.
- [18] Yi Z, Zhang X, Tang W, et al. Strand-selective base editing of human mitochondrial DNA using mitoBEs[J]. *Nature Biotechnology*, 2024, 42: 498-509.
- [19] Powering new therapeutics with precision mitochondrial editing[J]. *Nature Biotechnology*, 2025, 43: 831-832.