

综 述

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002492

BCL11A对胎儿血红蛋白的调控

孙绍华¹, 朱宝生², 张 杰², 吕 涛¹

(1. 昆明理工大学医学院, 昆明 650500; 2. 云南省第一人民医院医学遗传科, 昆明 650032)

【摘 要】β-地中海贫血(β-thalassemia, β-地贫)和镰状细胞贫血(sickle cell anemia, SCA)均属于 β-珠蛋白异常导致的血红蛋白病, 不同程度地流行于东南亚、南亚、北非及地中海区域。胎儿血红蛋白(fetal hemoglobin, HbF)水平升高可明显改善两者的临床症状。B 细胞淋巴瘤/白血病 11A(B cell lymphoma/leukemia 11A, BCL11A)是一种锌指结构转录因子, 在胎儿到成人血红蛋白转换过程中发挥重要的负向调节作用。BCL11A 下调会激活 γ-珠蛋白提高 HbF 表达, 使 β-地贫和 SCA 临床症状得到缓解。本文主要论述 BCL11A 对 γ-珠蛋白的调控机制、BCL11A 与 β-地贫和 SCA 的治疗, 从而为 β-珠蛋白病的研究提供理论依据。

【关键词】胎儿血红蛋白; 镰状细胞贫血; β-地中海贫血; γ-珠蛋白; B 细胞淋巴瘤/白血病 11A

【中图分类号】R394

【文献标志码】A

【收稿日期】2019-09-02

Regulation of B-cell lymphoma/leukemia 11A on fetal hemoglobin

Sun Shaohua¹, Zhu Baosheng², Zhang Jie², Lü Tao¹

(1. College of Clinical Medicine, Kunming University of Science and Technology;

2. Department of Medical Genetics, The First People's Hospital of Yunnan Province)

【Abstract】β-thalassemia and sickle cell anemia(SCA) are hemoglobin diseases caused by abnormal β-globin, occurring in South-east Asia, South Asia, North Africa and the Mediterranean region with different degrees. Elevated fetal hemoglobin(HbF) levels can significantly improve their clinical symptoms. B-cell lymphoma/leukemia 11A(BCL11A), a zinc finger structure transcription factor, plays an important negative regulatory role in fetal-to-adult hemoglobin expression. Down-regulated BCL11A activates γ-globin, so as to increase fetal hemoglobin expression, alleviating clinical symptoms of β-thalassemia and SCA. This article focuses on the mechanism of BCL11A on γ-globin, and the treatment of β-thalassemia and SCA based on BCL11A, thereby providing a theoretical basis for the study of β-globin disease.

【Key words】fetal hemoglobin; sickle cell anemia; β-thalassemia; γ-globin; B-cell lymphoma/leukemia 11A

胎儿血红蛋白(fetal hemoglobin, HbF)是由 2 条 α 链和 2 条 γ 链组成的杂合四聚体^[1]。每条链含有能与氧可逆结合的血红素基团, 在发育过程中有助于氧气的运输^[2]。而 β-珠蛋白基因簇位于 11 号染色体 11p15.3 上, 主要包括胚胎基因[ε-珠蛋白(HBE)], 2 个胎儿基因[γ-珠蛋白(HBG1 和 HBG2)]和 2 个成人基因[δ-珠蛋白(HBD)和 β-珠蛋白(HBB)]^[3], 在发育过程中从左向右依次表达(图 1)。胎儿 γ-珠蛋白基因通常随着出生逐渐被成人 β-珠蛋白基因所取代^[4]。这代表着胎儿到成人的“血红蛋白开关”转换已完成。在新生儿中, HbF 水平占总血红蛋白的 60%~80%。在胎儿出生后的 6~12 个月,

HbF 水平逐渐降至约 1%^[5]。

人群中常见的 β-珠蛋白基因疾病主要有某些类型的 β-地中海贫血(β-thalassemia, β-地贫)和少数的镰状细胞贫血(sickle cell anemia, SCA)。β-地贫在地中海区域及我国南部尤为突出, 诸如我国的云南、广西、广东、贵州等地, 多为高发地带; 其主要致病机制是 β-珠蛋白分子的表达不足, 导致过量未结合的 α-珠蛋白链在红细胞前体中沉积, 这些游离的 α-珠蛋白链损害了前体的成熟, 进而导致红细胞的无效生成, 引发贫血症状^[6]。中度以上患者大多需要输血治疗, 并伴有心率失常、肝脏疾病、内分泌疾病等风险^[7]。SCA 常见于东南亚、南亚、北非等地。它的致病机制是由于血红蛋白 β 链 N 端的第 6 个谷氨酸残基被缬氨酸残基所取代(记为: HbS[β6(A3)Glu→Val]), 进而导致含有这种血红蛋白的红细胞扭曲变形, 引发严重的 SCA 贫血症状^[8]。这不仅阻塞了毛细血管, 也阻碍了向组织内输送氧气, 患者通常伴有胸腹疼痛、脾肿大、器官损伤和呼吸系统等并发症^[9]。

作者介绍: 孙绍华, Email: 1017567995@qq.com,

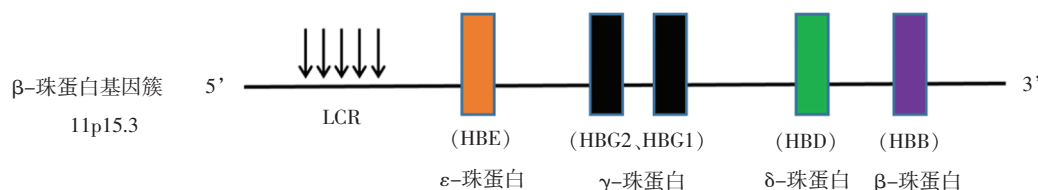
研究方向: 遗传病(β-地贫)代谢机制研究。

通信作者: 吕 涛, Email: taolv851109@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金资助项目(编号: 81660022)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20200513.1309.008.html>

(2020-05-13)



注:β-珠蛋白基因簇上含有 1 个胚胎基因(ε),2 个胎儿基因(γ、γ),2 个成人基因(δ、β),基因簇上排列顺序为:5'-ε-γ-γ-δ-β-3';而“血红蛋白的开关”是指从 γ-珠蛋白→β-珠蛋白的转换

图 1 β-珠蛋白基因簇

造血干细胞移植(hematopoietic stem cell transplantation, HSCT)是 β-血红蛋白病的确定性治疗方法,但绝大多数患者未能匹配到良好供体,不能够接受有效治疗,同时造成了严重的家庭负担^[10]。1998 年,美国 FDA 批准羟甲基(hydroxyurea, HU)用于治疗该病,但潜在的分子机制有待进一步阐明,且长期服用伴有明显副作用,药物疗效甚至引起大众怀疑^[11]。由于以上限制, HbF 合成的再活化被认为是减轻 β-地贫和 SCA 的有效策略。

1 BCL11A 与血红蛋白

B 细胞淋巴瘤因子 11A(B cell lymphoma/leukemia 11A, BCL11A)是 BCL 家族中的 Kruppel 样锌指转录因子,位于人类 2 号染色体 2p16 上。早先研究发现, BCL11A 主要参与淋巴细胞生成和神经发育过程^[12]。例如, Basak A 等^[13]确定并描述了 3 例患有罕见微缺失的 2p15-p16.1 患者,证明 BCL11A 在沉默 HbF 和人类神经发育中起关键作用。另有报道称, BCL11A 可能在肿瘤细胞系中也有相关表达,并证明了 BCL11A 蛋白水平在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancers, NSCLC)组织内是上调的^[14]。这验证了 BCL11A 是一种原癌基因的说法^[15]。

近期研究表明, BCL11A 是伴随胎儿(γ-珠蛋白)到成人(β-珠蛋白)血红蛋白生成转变的重要调节器,是 HbF 表达的负向调节剂和沉默剂^[16-17]。BCL11A 能与 β-珠蛋白基因簇多个位点相结合,包括在基因座控制区(locus control region, LCR)远端的增强子元件及 γ-珠蛋白启动子远端的 TGACCA 序列^[18]。因此, BCL11A 似乎在一定距离上发挥着 γ-珠蛋白的抑制功能,被认为是沉默 γ 珠蛋白、结合 LCR 和 δ-γ 珠蛋白基因不可缺少的元素^[19]。

BCL11A 有 4 种变体形式,分别为 BCL11A-XL(extra-long; 5.9 kb/125 kD)、BCL11A-L(long; 3.8 kb/100 kD)、BCL11A-S(short; 2.4 kb/35 kD)和 BCL11A-XS(extra-short; 1.5 kb/25 kD)^[14-15, 20]。Sankaran VG 等^[21]研究表明,在人类个体发育过程中, BCL11A-XL 全长形式在成人红细胞中有较高表达,在胎儿红细胞中有较低表达,而在原始红细胞中没有表达。这与 HbF 表达呈负相关。也就是说,当 γ-珠蛋白高表达时, BCL11A 为短变异蛋白,当 γ-珠蛋白基因沉默时,其蛋白形

式为全长蛋白。这再一次证明, BCL11A 作为人 γ-珠蛋白基因的阻遏物可能起着重要的调节作用。

进一步的分子研究表明, BCL11A 可能与几个红细胞转录因子[包括性别决定区 Y 框蛋白 6(sex-determining region Y box 6, SOX6)、Kruppel 样因子 1(Kruppel-like factor 1, KLF1)、POGZ 基因(pogo transposable element with ZNF domain, POGZ)及核小体重塑与去乙酰化酶(nucleosome remodeling and histone deacetylase, NuRD)复合物]等相互作用来促进血红蛋白转换^[22],被认为是抑制 γ-球蛋白表达的重要“候选者”^[23]。

2 BCL11A 对 γ-珠蛋白的调节机制

遗传学和全基因组关联分析(Genome-Wide Association Study, GWAS)研究表明, β-珠蛋白基因簇的 HBB(11p15.4)、HBS1L-MYB 基因间序列(6q23.3)及 BCL11A(2p16.1)3 个常见位点与 HbF 水平密切相关,适度下调红细胞中 BCL11A 将会使 HbF 增加^[24-25]。Das SS 等^[26]研究发现, BCL11A 的 2 个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)位点 N391K(rs754753303)和 C414S(rs767202635)会严重影响其蛋白质结构的稳定性,但是否影响 BCL11A 沉默 γ-珠蛋白基因的确切机制仍有待研究^[22]。

在胎儿(γ-珠蛋白)向成人(β-珠蛋白)血红蛋白转换期间, BCL11A 可以通过结合 β-珠蛋白基因簇 LCR 远端增强子元件和 γ~δ 间的区域介导 β-珠蛋白的表达,以及利用 LCR 和 γ-珠蛋白的相互作用来促使 LCR 和 β-珠蛋白形成染色质环,从而促进 β-珠蛋白的转录和 γ-珠蛋白的沉默。然而,当 BCL11A 被敲低或沉默时, β-珠蛋白基因座的构象将会发生变化,使 LCR 与 γ-珠蛋白基因相互作用,进而激活 γ-珠蛋白基因使 HbF 表达有效提高^[27-28]。除了 LCR 区域, BCL11A 还能与 β-珠蛋白基因座上的多个顺式作用元件相结合以介导 β-珠蛋白基因表达的调节^[29],尤其是 HbF 的再激活,这一过程可能是 BCL11A 与其他转录因子相互作用介导的结果。

2.1 BCL11A 与 SOX6

BCL11A 可与高迁移率转录因子 SOX6 相互结合,形成蛋白复合物协同调节 β-珠蛋白的表达转换。因复合物能够

抑制 γ -珠蛋白基因的表达,如果将复合物敲低,将会使沉默的 γ -珠蛋白基因在发育的成红细胞中再激活^[30]。这说明 SOX6 是 BCL11A 介导珠蛋白转换和 γ -珠蛋白转录中的重要辅助因子。两者的相互作用同样在人和小鼠的红细胞发育过程中得到验证,且 BCL11A 和 SOX6 均在红细胞成熟中期(5~7 d)高表达。然而,这种相互作用对血红蛋白转换影响的分子机制尚不完全清楚^[30]。最新研究表明,SOX6 在 γ -珠蛋白向 β -珠蛋白转换中起重要作用,使用基因编辑技术敲除 SOX6 同样会使 γ -珠蛋白实现再激活,而 BCL11A 同样参与这一调节过程^[31]。

2.2 BCL11A 与 KLF1

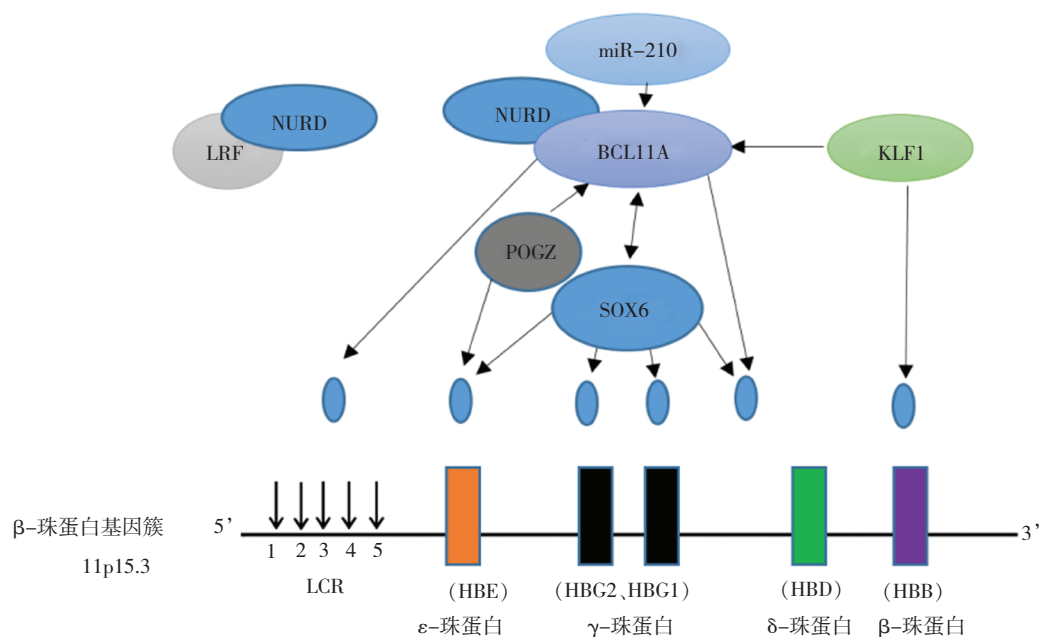
KLF1 是一种红细胞转录因子,对 β -珠蛋白表达同样具有重要意义,被认为是 BCL11A 转录因子的激活剂。KLF1 可与 BCL11A 启动子区域上游序列 CACCC 结合来调节成人血红蛋白表达^[32]。研究表明,KLF1 在胎儿到成人血红蛋白的表达转换中具有双重功能。它不仅可以激活 γ -珠蛋白沉默子 BCL11A,还可以促进 β -珠蛋白的转录来抑制 γ -珠蛋白基因沉默^[23]。最新研究表明,KLF1 可以直接参与调节 BCL11A 的表达,进而间接调节 γ -珠蛋白的表达^[33]。同时,KLF1 能与 β -珠蛋白 LCR 近端的启动子相互作用,激活 β -珠蛋白在成人红细胞中表达。因此,KLF1 的下调能够抑制 BCL11A 对 γ -珠蛋白基因的阻遏作用,同时直接介导 β -珠蛋白基因的表达^[20]。

Fanis P 等^[33]研究发现,一种新型的 KLF1 基因突变 (KLF1:p.Ser323Leu)能够缓解 β -地贫临床症状,患者无须输

血治疗。其原因可能是该突变下调了 KLF1 的表达,增加了 γ/β -珠蛋白比来实现的。同样的,在 K562 细胞中敲低 KLF1 的研究中发现 γ -珠蛋白基因被激活,HbF 含量明显增加^[34]。与 KLF1 这种双重调节功能相关的研究还发现,KLF1 的一些突变与多种血液学疾病相关,如遗传性胎儿血红蛋白持续增多症 (hereditary persistence of fetal hemoglobin, HPFH)、罕见的 In(Lu)血液表型及先天性红细胞生成性贫血 (congenital dyserythropoietic anemia, CDA) 等,但相关机制有待进一步阐明^[35]。

2.3 BCL11A 与 POGZ

POGZ 是一种锌指结构 pogo 转座因子,是 ε -珠蛋白表达阻遏物,在调节 ε -珠蛋白基因表达中起关键作用(图 2)。在红细胞中,POGZ 可与 BCL11A 启动子(-972)特异性结合,其表达水平与 BCL11A 相似。除此之外,POGZ 可与 BCL11A 特异性增强子超敏位点相结合,以此来促进 BCL11A 的转录。当 POGZ 被敲低时,POGZ 与这些位点的结合减少,进而降低 BCL11A 表达。这说明 POGZ 对 BCL11A 具有正向调节作用^[17,36]。实验研究发现,在原代人 CD34⁺祖细胞衍生的成红细胞中敲低 POGZ 时,BCL11A 表达被下调,进而增加 γ -珠蛋白的表达。另外,POGZ 可抑制人类红细胞 ε -珠蛋白基因的表达,这是由部分 POGZ 通过下调 BCL11A 来实现的^[36]。但最近几年,关于 POGZ 的研究主要集中在自闭症、孤独症、智力障碍、癫痫等神经疾病^[37]。POGZ 是否可以通过介导 BCL11A 表达来参与 ε -珠蛋白基因调控,还有待进一步论证^[37-38]。



注:本图表示出了 BCL11A 与 SOX6、POGZ、KLF1、miR-210、NURD 之间的相互关系。BCL11A 与 SOX6 具有协同作用,可以形成蛋白复合物,与 β -珠蛋白基因簇 LCR 远端增强子元件和 γ - δ 之间的区域结合,共同阻遏 γ -珠蛋白基因的表达;KLF1 在从胎儿血红蛋白到成人血红蛋白表达的转换中具有双重功能;POGZ 在调节 ε -珠蛋白表达起关键作用,对 BCL11A 的转录起正向调控作用。而 LRF 与 BCL11A 在对 HbF 水平调节上似乎具有一致甚至协同的作用,但两者的作用途径却不尽相同;上游调节因子 miR-210 可通过靶向 BCL11A 参与调节 γ -珠蛋白表达的调节

图 2 BCL11A 介导的 γ -珠蛋白模型

2.4 BCL11A 与 LRF/ZBTB7A

研究表明,BCL11A 与 NuRD 复合物相互作用,可形成 γ -珠蛋白的关键阻遏物^[34]。同时,由 ZBTB7A 基因编码的白血病淋巴瘤相关因子(leukemia/lymphoma related factor, LRF)与 NuRD 复合物同样具有相互作用,但以上 2 种结合作用并无直接联系。有意思的是,在红系细胞(human umbilical cord blood-derived erythroid progenitor, HUDEP-2)中,当 ZBTB7A 基因和 BCL11A 基因同时被敲除时,将会导致 HbF 水平增加至 95%以上,而单独敲除 ZBTB7A 或 BCL11A, HbF 水平仅增加至 50%~70%。这些结果表明,BCL11A 与 LRF 因子在对 HbF 水平调节上似乎具有一致性或协同作用,但两者的作用途径却不尽相同,分子机制仍有待阐明^[39-41]。

2.5 BCL11A 与 microRNA

除以上转录因子的参与,有关研究证明 microRNA(miRNA, miR)也参与 γ -珠蛋白基因转录的调控。比如,miR-210 的表达会导致红细胞中 BCL11A 的减少和 γ -珠蛋白 mRNA 含量的增加。这说明 BCL11A 编码的 mRNA 序列可以被 miR-210 靶向,通过抑制 BCL11A 的表达来实现 γ -珠蛋白的增加^[42]。此外,miR-138-5p、miR-486-3p 同样可通过靶向 BCL11A 来调节 γ -珠蛋白表达,这一领域也成为当今的研究热点^[29,43-44]。

3 BCL11A 与 β -地贫和 SCA 的治疗

由于 γ -珠蛋白基因再激活可以改善 β -地贫和 SCA 临床症状,首先涌现了一批能够激活 γ -珠蛋白的化合物。这些药物种类繁多,诸如以 HU 为代表的细胞周期特异性药、以 5-氮杂胞苷(5-azacytidine)为代表的 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)抑制剂,以及以丁酸盐为代表的组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase inhibitor, HDAC)抑制剂等^[12]。这些药物均可提高 HbF 表达,并与 BCL11A 调节作用密切相关。HU 是 FDA 批准用于 SCD 患者的首批药物。研究发现,在体外培养的 SCD 患者外周血 CD34⁺红系细胞中, HU 诱导 BCL11A 蛋白表达水平明显降低,并增加 HbF 含量,但 BCL11A 的 RNA 水平并未改变^[45]。DNMT 与 BCL11A 共同作用抑制了 γ -珠蛋白基因的表达^[46],利用 5-氮杂胞苷可以通过抑制 DNMT 酶活,从而有效干扰其与 BCL11A 的相互作用,达到解除对 γ -珠蛋白基因的抑制作用,进而增加 HbF 表达水平。Okhovat MA 等^[47]证明了苯基丁酸钠和丙戊酸钠在 K562 细胞均可抑制 BCL11A 的表达,上调 γ -珠蛋白基因和其他相关因子(GATA1、NFE2、EKLf、KLF4、STAT3、AHSP)的表达,且丙戊酸钠比苯基丁酸钠效果更显著($P<0.0005$)。早在 2002 年, Witt O 等^[48]发现了丁酸盐诱导 K562 细胞中 γ -珠蛋白升高与 BCL11A 的减少有关。Habibi H 等^[49]发现,在脐带血 CD34⁺红系细胞体外培养中, BCL11A 抑制剂辛伐他汀(simvastatin, SIM)可与 HDAC 抑制剂罗米地辛(romidepsin,

ROM)协同诱导 HbF 表达量增加。与单独给药相比,2 种药物的组合更明显地抑制了 BCL11A 和 HDAC 的表达、提高 γ -珠蛋白表达(HbF 产量增加了 3 倍),患者同时服这 2 种药物不仅可以减少输血治疗,还可降低副作用。除以上几种药物外,许多新的药理小分子诱导剂也正处于临床开发阶段^[50]。例如,口服 LSD1 抑制剂 ORY-3001 已证实可增加 SCA 小鼠和狒狒的 HbF 表达^[51];地西他滨在 HbE/ β -地贫中也有良好的反应等^[52]。这些药物与 BCL11A 调节作用的关系有待进一步揭晓。

随着研究的不断深入,目前基于 BCL11A 的基因编辑技术已成为 BCL11A 作为靶点治疗 β -地贫和 SCA 的研究热点。BCL11A 基因的增强子位于第 2 个内含子上,在正常人红系发育过程中,可以特异性增强 BCL11A 基因的表达,从而抑制了 HbF 中的组成元件—— γ -珠蛋白的表达。因此,通过基因编辑删除这些特异性的增强子,削弱红系细胞中 BCL11A 对 HbF 表达的负调控作用,增加 HbF 含量的方法,可以作为缓解 β -珠蛋白基因疾病病情的新策略。有研究表明,利用 TALEN 和 ZFN 系统靶向处理 BCL11A 基因+58 位置上的 DNase I 超敏区域(DNase I hypersensitive sites, DHSs)(含 GATAA 序列),均可有效降低 BCL11A 基因表达,升高 γ -珠蛋白的表达^[53]。在另 1 项研究中,Canver MC 等^[54]利用 CRISPR/Cas9 系统对人红系细胞 BCL11A 基因增强子区进行诱变,后对 HbF 高表达细胞分析后发现 gRNA(guide RNA)同样主要富集在+58 位置上的 DHS 区域(含 GATAA 序列)。这不仅说明这段包含 GATAA 的序列对 BCL11A 基因表达的调节作用至关重要,同时揭示了可以通过基因编辑技术靶向沉默 BCL11A 基因逆转 β -珠蛋白基因的表达来治疗 β -地贫和 SCA 等的新方法。另外,在人的 HUDEP-2 细胞系和 CD34⁺造血干细胞中应用 CRISPR/Cas9 系统,可以实现 BCL11A 基因造血系统特异性增强子区域序列的大片段删除修饰,降低 BCL11A 基因在血细胞中的表达,从而有效提高 HbF 表达水平,同时利用整合酶缺陷型慢病毒载体(integration-defective lentiviral vectors, IDLVs)能够优先识别 DNA 双链断裂的特点,对 CRISPR/Cas9 系统产生的脱靶位点进行评估,并使干细胞中的基因编辑效率得以优化^[55],从而证明 CRISPR/Cas9 和 IDLVs 是干细胞中基因编辑的有利工具。2019 年,有学者利用 CRISPR/Cas9 系统特异性切除了 K562 细胞系中 BCL11A 基因增强子区 200 bp 区域(含 GATAA 序列),结果同样显著诱导了 γ -珠蛋白的表达^[56]。

除了基因编辑技术,还可以利用 RNA 干扰技术,如构建短发卡 RNA(short hairpin RNA, shRNA)慢病毒载体等,降低 BCL11A 基因的表达,实现 HbF 水平的增加^[57]。相对编码人 β -珠蛋白基因的慢病毒载体治疗,以上列出的治疗方法无论是利用外源药物还是基因编辑等手段,均利用表观遗传学技术,通过改变致病基因 β -珠蛋白基因的调控因子 BCL11A,而不是直接改变遗传物质的方法为切入点,为基因治疗方案的临床应用提供了新思路。

4 讨论

本文系统地论述了 BCL11A 与 SOX6、KLF1、POGZ、LRF、microRNA 等因子相互作用共同介导 γ -珠蛋白基因再激活,实现调节 β -珠蛋白基因间表达的切换。总的来说,BCL11A 与 SOX6 具有协同作用,可以形成蛋白复合物,与 β -珠蛋白基因簇 LCR 远端增强子元件和 A γ - δ 之间的区域结合,共同阻遏 γ -珠蛋白基因的表达;KLF1 在从胎儿血红蛋白到成人血红蛋白表达的转换中具有双重功能,如下调 KLF1 表达,不仅能够抑制 BCL11A 对 γ -珠蛋白基因的阻遏作用,同时可以直接介导 β -珠蛋白的表达;POGZ 在调节 ϵ -珠蛋白表达中起关键作用,POGZ 可与 BCL11A 特异性增强子+58 kb DHSs 结合,对 BCL11A 的转录起正向调控作用。而 LRF 与 BCL11A 在对 HbF 水平调节上似乎具有一致甚至协同的作用,但两者的作用途径却不尽相同。此外,本文也论述了上游调节因子 miR-210、miR-138-5p、miR-486-3p 可通过靶向 BCL11A 参与调节 γ -珠蛋白表达的调节。

此外,本文还论述了 BCL11A 与 β -地贫和 SCA 的治疗方法的关系及其应用,无论是细胞周期特异性药、DNMT 抑制剂还是 HDAC 抑制剂等,其药效发挥均与 BCL11A 调节作用密切相关。随着研究的不断深入,目前从 BCL11A 这一靶分子为切入点,利用基因编辑技术已成为治疗 β -地贫和 SCA 的研究热点,该治疗方法弥补了传统药物无法根治、输血治疗依赖性强、异体造血干细胞移植难寻供体,以及构建人 β -珠蛋白基因慢病毒载体与自体干细胞移植相结合疗法成本高、远期安全性未知等弊端。但 ZFNs、TALENs、CRISPR/Cas9 系统均存在脱靶的问题,这也是限制其临床应用的瓶颈。针对这个问题,完善和优化基因编辑体系、建立简便有效的评估方法等将推动其最终走向临床。可以说,生物实验技术的每一次革新,都会为珠蛋白基因研究带来新的突破,BCL11A 等关键调控因子在治疗上的应用为广大 β -地贫和 SCA 患者痊愈带来曙光。

参考文献

- [1] Shaukat I, Pudel A, Mustafa S, et al. Blessing in disguise; a case of hereditary persistence of fetal hemoglobin[J]. J Community Hosp Intern Med Perspect, 2018, 8(6): 380-381.
- [2] Davis R, Gurumurthy A, Hossain MA, et al. Engineering globin gene expression[J]. Mol Ther Methods Clin Dev, 2019, 12: 102-110.
- [3] Smith EC, Orkin SH. Hemoglobin genetics: recent contributions of GWAS and gene editing[J]. Hum Mol Genet, 2016, 25(R2): 99-105.
- [4] Wienert B, Martyn GE, Funnell APW, et al. Wake-up sleepy gene: reactivating fetal globin for β -hemoglobinopathies[J]. Trends Genet, 2018, 34(12): 927-940.
- [5] Braghini CA, Costa FC, Fedosyuk H, et al. Original research: generation of non-deletional hereditary persistence of fetal hemoglobin β -globin locus yeast artificial chromosome transgenic mouse models: -175 Black HPFH and -195 Brazilian HPFH[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2016, 241(7): 697-705.
- [6] Shah FT, Sayani F, Trompeter S, et al. Challenges of blood transfusions in β -thalassemia[J]. Blood Rev, 2019, 37: 100588.
- [7] Taher AT, Cappellini MD. How I manage medical complications of β -thalassemia in adults[J]. Blood, 2018, 132(17): 1781-1791.
- [8] Liu Y, Zhong H, Bao W, et al. Patrolling monocytes scavenge endothelial-adherent sickle RBCs; a novel mechanism of inhibition of vaso-occlusion in SCD[J]. Blood, 2019, 134(7): 579-590.
- [9] Lettre G, Bauer DE. Fetal haemoglobin in sickle-cell disease: from genetic epidemiology to new therapeutic strategies[J]. Lancet, 2016, 387(10037): 2554-2564.
- [10] Cavazzana M, Antoniani C, Miccio A. Gene therapy for β -hemoglobinopathies[J]. Mol Ther, 2017, 25(5): 1142-1154.
- [11] Chondrou V, Stavrou EF, Markopoulos G, et al. Impact of ZBTB7A hypomethylation and expression patterns on treatment response to hydroxyurea[J]. Hum Genomics, 2018, 12(1): 45.
- [12] 鞠君毅, 赵权. γ -珠蛋白基因表达调控机制与临床应用[J]. 遗传, 2018, 40(6): 429-444.
- [13] Basak A, Hancarova M, Ulirsch JC, et al. BCL11A deletions result in fetal hemoglobin persistence and neurodevelopmental alterations[J]. J Clin Invest, 2015, 125(6): 2363-2368.
- [14] Zhang N, Jiang B, Zhang X, et al. The BCL11A-XL expression predicts relapse in squamous cell carcinoma and large cell carcinoma[J]. J Thorac Dis, 2015, 7(9): 1630-1636.
- [15] 雷一鸣, 黄睿淳, 石慧卿, 等. BCL11A 在胎儿血红蛋白表达调控中的作用[J]. 广东医学, 2013, 34(22): 22-25.
- [16] Abdulazeez S. Molecular simulation studies on B-cell lymphoma/leukaemia 11A (BCL11A) [J]. Am J Transl Res, 2019, 11(6): 3689-3697.
- [17] Smith EC, Luc S, Croney DM, et al. Strict *in vivo* specificity of the Bcl11a erythroid enhancer[J]. Blood, 2016, 128(19): 2338-2342.
- [18] Liu N, Hargreaves VV, Zhu Q, et al. Direct promoter repression by BCL11A controls the fetal to adult hemoglobin switch[J]. Cell, 2018, 173(2): 430-442.e17.
- [19] Bauer DE, Orkin SH. Hemoglobin switching's surprise: the versatile transcription factor BCL11A is a master repressor of fetal hemoglobin[J]. Curr Opin Genet Dev, 2015, 33: 62-70.
- [20] Trakarnsanga K, Wilson MC, Lau W, et al. Induction of adult levels of β -globin in human erythroid cells that intrinsically express embryonic or fetal globin by transduction with KLF1 and BCL11A-XL[J]. Haematologica, 2014, 99(11): 1677-1685.
- [21] Sankaran VG, Xu J, Orkin SH. Transcriptional silencing of fetal hemoglobin by BCL11A[J]. Ann N Y Acad Sci, 2010, 1202: 64-68.
- [22] Basak A, Sankaran VG. Regulation of the fetal hemoglobin silencing factor BCL11A Anindita[J]. Ann N Y Acad Sci, 2017, 1368(1): 25-30.
- [23] Bauer DE, Orkin SH. Update on fetal hemoglobin gene regulation in hemoglobinopathies[J]. Curr Opin Pediatr, 2011, 23(1): 1-8.
- [24] Funnell AP, Prontera P, Ottaviani V, et al. 2p15-p16.1 microdeletions encompassing and proximal to BCL11A are associated with elevated HbF in addition to neurologic impairment[J]. Blood, 2015, 126(1): 89-93.

- [25] Borg J, Papadopoulos P, Georgitsi M, et al. Haploinsufficiency for the erythroid transcription factor KLF1 causes hereditary persistence of fetal hemoglobin[J]. *Nat Genet*, 2010, 42(9): 801–805.
- [26] Das SS, Chakravorty N. Identification of deleterious SNPs and their effects on BCL11A, the master regulator of fetal hemoglobin expression[J]. *Genomics*, 2020, 112(1): 397–403.
- [27] Dame C, Juul SE. The switch from fetal to adult erythropoiesis[J]. *Clin Perinatol*, 2000, 27(3): 507–526.
- [28] Dadheech S, Madhulatha D, Jain S, et al. Association of BCL11A genetic variant(rs11886868) with severity in β -thalassaemia major & sickle cell anaemia[J]. *Indian J Med Res*, 2016, 143(4): 449–454.
- [29] Lohani N, Bhargava N, Munshi A, et al. Pharmacological and molecular approaches for the treatment of β -hemoglobin disorders[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(6): 4563–4577.
- [30] Sankaran VG, Menne TF, Xu J, et al. Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor[J]. *Science*, 2008, 322(5909): 1839–1842.
- [31] Shariati L, Rohani F, Heidari Hafshejani N, et al. Disruption of SOX6 gene using CRISPR/Cas9 technology for gamma-globin reactivation; an approach towards gene therapy of β -thalassemia[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(11): 9357–9363.
- [32] Heydari N, Shariati L, Khanahmad H, et al. Gamma reactivation using the spongy effect of KLF1-binding site sequence; an approach in gene therapy for beta-thalassemia[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2016, 19(10): 1063–1069.
- [33] Fanis P, Kousiappa I, Phylactides M, et al. A novel mutation in the erythroid transcription factor KLF1 is likely responsible for ameliorating β -thalassemia major[J]. *Hum Mutat*, 2019, 40(10): 1768–1780.
- [34] Fluhr S, Krombholz CF, Meier A, et al. Epigenetic dysregulation of the erythropoietic transcription factor KLF1 and the β -like globin locus in juvenile myelomonocytic leukemia[J]. *Epigenetics*, 2017, 12(8): 715–723.
- [35] Barbarani G, Fugazza C, Strouboulis J, et al. The pleiotropic effects of GATA1 and KLF1 in physiological erythropoiesis and in dyserythropoietic disorders[J]. *Front Physiol*, 2019, 10: 91.
- [36] Gudmundsdottir B, Gudmundsson KO, Klarmann KD, et al. POGZ is required for silencing mouse embryonic β -like hemoglobin and human fetal hemoglobin expression[J]. *Cell Rep*, 2018, 23(11): 3236–3248.
- [37] Samanta D, Ramakrishnaiah R, Schaefer B. The neurological aspects related to POGZ mutation; case report and review of CNS malformations and epilepsy[J]. *Acta Neurol Belg*, 2020, 120(2): 447–450.
- [38] Zhao W, Quan Y, Wu H, et al. POGZ de novo missense variants in neuropsychiatric disorders[J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2019, 7(9): e900.
- [39] Orkin SH. Recent advances in globin research using genome-wide association studies and gene editing[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2016, 1368(1): 5–10.
- [40] Sripichai O, Fucharoen S. Fetal hemoglobin regulation in β -thalassemia; heterogeneity, modifiers and therapeutic approaches[J]. *Expert Rev Hematol*, 2016, 9(12): 1129–1137.
- [41] Gasparello J, Fabbri E, Bianchi N, et al. BCL11A mRNA targeting by miR-210; a possible network regulating γ -globin gene expression[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(12): E2530.
- [42] Yao H, Vo TD, Trowbridge JJ, et al. Corepressor-dependent silencing of fetal hemoglobin expression by BCL11A[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(16): 6518–6523.
- [43] Sun KT, Huang YN, Palanisamy K, et al. Reciprocal regulation of γ -globin expression by exo-miRNAs; relevance to γ -globin silencing in β -thalassemia major[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 202.
- [44] Xu J, Sankaran VG, Ni M, et al. Transcriptional silencing of γ -globin by BCL11A involves long-range interactions and cooperation with SOX6[J]. *Genes Dev*, 2010, 24(8): 783–798.
- [45] Zhu X, Hu T, Ho MH, et al. Hydroxyurea differentially modulates activator and repressors of γ -globin gene in erythroblasts of responsive and non-responsive patients with sickle cell disease in correlation with index of hydroxyurea responsiveness[J]. *Haematologica*, 2017, 102(12): 1995–2004.
- [46] Roosjen M, McColl B, Kao B, et al. Transcriptional regulators Myb and BCL11A interplay with DNA methyltransferase 1 in developmental silencing of embryonic and fetal β -like globin genes[J]. *FASEB J*, 2014, 28(4): 1610–1620.
- [47] Okhovat MA, Ziari K, Ranjbaran R, et al. The effect of histone deacetylase inhibitors on AHSP expression[J]. *PLoS One*, 2018, 13(2): e0189267.
- [48] Witt O, Mönkemeyer S, Kanbach K, et al. Induction of fetal hemoglobin synthesis by valproate; modulation of MAP kinase pathways[J]. *Am J Hematol*, 2002, 71(1): 45–46.
- [49] Habibi H, Atashi A, Abroun S, et al. Synergistic effect of simvastatin and romidepsin on gamma-globin gene induction[J]. *Cell J*, 2019, 20(4): 576–583.
- [50] Lohani N, Bhargava N, Munshi A, et al. Pharmacological and molecular approaches for the treatment of β -hemoglobin disorders[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(6): 4563–4577.
- [51] Rivers A, Vaitkus K, Jagadeeswaran R, et al. Oral administration of the LSD1 inhibitor ORY-3001 increases fetal hemoglobin in sickle cell mice and baboons[J]. *Exp Hematol*, 2018, 67: 60–64.e2.
- [52] Kalantri SA, Ray R, Chattopadhyay A, et al. Efficacy of decitabine as hemoglobin F inducer in HbE/ β -thalassemia[J]. *Ann Hematol*, 2018, 97(9): 1689–1694.
- [53] Vierstra J, Reik A, Chang KH, et al. Functional footprinting of regulatory DNA[J]. *Nat Methods*, 2015, 12(10): 927–930.
- [54] Canver MC, Smith EC, Sher F, et al. BCL11A enhancer dissection by Cas9-mediated in situ saturating mutagenesis[J]. *Nature*, 2015, 527(7577): 192–197.
- [55] 王晔博. CRISPR/Cas9 靶向编辑技术的优化及其在干细胞中的应用[D]. 杭州: 浙江大学, 2016: 1–113.
- [56] Khosravi MA, Abbasalipour M, Concordet JP, et al. Targeted deletion of BCL11A gene by CRISPR-Cas9 system for fetal hemoglobin reactivation; a promising approach for gene therapy of beta thalassemia disease[J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 854: 398–405.
- [57] Li J, Lai Y, Shi L. BCL11A down-regulation induces γ -globin in human β -thalassemia major erythroid cells[J]. *Hemoglobin*, 2018, 42(4): 225–230.

(责任编辑: 冉明会)