

法,对心肌梗死采取更有效全面的预防。然而,VD 对心肌梗死的影响仍然存在着争议,需要更多的研究来证实。

参考文献

[1] CORREIA L C, SODRÉ F, GARCIA G, et al. Relation of severe deficiency of vitamin D to cardiovascular mortality during acute coronary syndromes[J]. *Am J Cardiol*, 2013, 111(3):324-327.

[2] EL-GOHARY O A. Effect of vitamin D on isoprenaline-induced myocardial infarction in rats: possible role of peroxisome proliferator-activated receptor- γ [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2017, 95(6):641-646.

[3] HOSSEIN-NEZHAD A, ESHAGHI S M, MAGHBOOLIZ, et al. The role of vitamin D deficiency and vitamin d receptor genotypes on the degree of collateralization in patients with suspected coronary artery disease[J]. *Bio Med Res Int*, 2014(2014):304250.

[4] CAVUSOGLU E, KASSOTIS J T, MARMUR J D, et al. Usefulness of plasma tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-4 to predict death and myocardial infarction in patients with diabetes mellitus referred for coronary angiography[J]. *Am J Cardiol*, 2017, 120(1):1-7.

[5] ROY A, LAKSHMY R, TARIK M, et al. Independent association of severe vitamin D deficiency as a risk of acute myocardial infarction in Indians[J]. *Indian Heart J*, 2015, 67(1):27-32.

[6] FERNANDEZ M N, BARCHUK M, GAGLIARDI J, et al. Vitamin D is related to markers of vulnerable plaque in acute myocardial infarction[J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2018, 16(4):355-360.

[7] 冯勤颖, 左丽, 许健, 等. 1,25 二羟基维生素 D₃ 与冠状动脉钙化积分的相关性及临床诊断价值研究[J]. *重庆医学*, 2015, 44(26):3675-3677.

[8] KIM H I, AN W S. Comparison of fetuin-A, vitamin D, monounsaturated fatty acid, and vascular calcification on plain radiography between dialysis modalities[J]. *Iran J Kidney Dis*, 2013, 7(6):453-460.

[9] PILLAR R, MG G L, ROCHA L A, et al. Severe hypovitaminosis D in chronic kidney disease: association with

blood pressure and coronary artery calcification[J]. *Hypertens Res*, 2013, 36(5):428-432.

[10] 李锋, 师志云, 郭小龙, 等. 宁夏地区 1 879 例内分泌相关疾病患者血中维生素 D 水平分析[J]. *检验医学与临床*, 2017, 14(11):1556-1558.

[11] MICHALSKI B, SZYMCZYK E, PECZEK L, et al. The role of selected adipokines and ghrelin in the prognosis after myocardial infarction in a 12-month follow-up in the presence of metabolic syndrome[J]. *Arch Med Sci*, 2017, 13(4):785-794.

[12] EKMEN N, HELVACI A, GUNALDI M, et al. Leptin as an important link between obesity and cardiovascular risk factors in men with acute myocardial infarction[J]. *Indian Heart J*, 2016, 68(2):132-137.

[13] MORITA Y, MAEDA K, KONDO T, et al. Impact of adiponectin and leptin on long-term adverse events in Japanese patients with acute myocardial infarction. Results from the Nagoya Acute Myocardial Infarction Study (NAMIS)[J]. *Circ J*, 2013, 77(11):2778-2785.

[14] KHAN R J, GEBREAB S Y, RIESTRA P, et al. Associations between vitamin d and cardiovascular disease risk factors in african americans are partly explained by circulating adipokines and c-reactive protein; the jackson heart study[J]. *J Nutr*, 2016, 146(12):2537-2543.

[15] HEIDARI B, NARGESI A A, HAFEZI-NEJAD N, et al. Assessment of serum 25-hydroxy vitamin D improves coronary heart disease risk stratification in patients with type 2 diabetes[J]. *Am Heart J*, 2015, 170(3):573-579.

[16] YILMAZ S S, HIZLI D, YILMAZ E, et al. Effect of vitamin D on postoperative adhesion formation in a rat uterine horn adhesion model[J]. *J Reprod Med*, 2013, 58(11/12):511-516.

[17] CANNELL J J, GRANT W B, HOLICK M F. Vitamin D and inflammation[J]. *Dermato Endocrin*, 2015, 6(1):e983401.

[18] SAGARAD S V, SUKHANI N, MACHANUR B, et al. Effect of vitamin D on anginal episodes in vitamin D deficient patients with chronic stable angina on medical management[J]. *J Clin Diagn Res*, 2016, 10(8):24-26.

(收稿日期:2018-01-12 修回日期:2018-03-29)

• 综述 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.18.044

诱导多能干细胞在遗传性血液病中的应用与前景

刘 益, 胡韦维 综述, 张鹏辉[△] 审校
(重庆医科大学附属儿童医院检验科 400014)

关键词:诱导多能干细胞; 遗传性血液病; 基因编辑

中图分类号:R318.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)18-2826-04

异基因造血干细胞移植(HSCT)是目前根治遗传性、恶性血液系统疾病的最重要的手段,然而配型成

[△] 通信作者, E-mail: Zhangph7203@sina.com。

功率低、易发生急性移植物抗宿主病严重限制了其在临床治疗中的广泛应用。诱导多能干细胞(iPSCs)具有细胞来源广、可直接从患者自身获得、在体外可诱导分化为造血祖细胞的优点。随着基因编辑技术不断发展,靶向修复患者 iPSCs 从而治疗遗传疾病已成为可能。本文就 iPSCs 在遗传性血液病中的研究进展作一综述。

1 iPSCs 技术

干细胞是指一类具有自我更新能力与多向分化潜能的原始未分化的细胞群体,因其具有多向分化潜能,自其发现以来便备受临床研究、再生医学界的关注,将已分化的体细胞通过重编程技术,使其重回干细胞状态,一直是国内外科学研究热点。目前常用的重编程技术有 3 种:核移植(NT)、细胞融合、iPSCs 技术。iPSCs 技术是新近发明的重编程技术,目前广泛应用于细胞治疗、药物筛选、毒理测试和研究疾病机制中。它具有细胞来源广、可直接从患者体细胞中获得的优点,避免了伦理问题和免疫排斥反应。伴随基因编辑技术的快速发展,以用 iPSCs 为基础,进行基因靶向修饰日趋成熟。

2007 年 TAKAHASHI 等^[1]通过逆转录病毒将 Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc(OSKM 因子)4 种转录因子导入人成纤维细胞中,获得了一种在形态、增殖能力、表面抗原、端粒酶活性及干细胞相关基因表观遗传状态均与胚胎干细胞相似的细胞,即 iPSCs。随着研究不断深入,皮肤成纤维细胞、角质层细胞、小肠上皮细胞、神经肝细胞、外周血单个核细胞、肝细胞、胰腺 β 细胞等已被证实可重编程为 iPSCs;同时 Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc 4 种转录因子可以被其他因子如 Tet1、Sox3、I-Myc 等替代^[2-4]。去除高致癌的 c-Myc,仅用 Oct4、Sox2、Klf4 3 种转录因子也可将体细胞诱导为 iPSCs^[5]。而更安全、便捷的化学小分子介导的体细胞诱导重编程技术也在小鼠内、中、外胚层细胞中取得成功^[6-7]。为 iPSCs 治疗人类疾病奠定了理论基础。

2 iPSCs 在遗传性血液病中的应用

遗传性血液病是由遗传因素导致骨髓造血功能紊乱的疾病,造血干细胞移植是目前根治遗传性血液病的重要手段,然而其来源有限、风险极大,临床上常以对症支持治疗为主,大大降低了患者的生存年限和生活质量。iPSCs 的出现为遗传性血液病的治疗带来了新思路,下面以范可尼贫血、镰刀型细胞贫血病、地中海贫血为代表,简述 iPSCs 在遗传性血液病中的应用。

2.1 范可尼贫血(FA) FA 是一种先天性再生障碍性贫血,属于常染色体隐性遗传病,患者体细胞对 DNA 交联剂异常敏感,易发生染色体断裂,致骨髓造

血功能衰竭,出现全血细胞减少,常伴有先天性骨骼、心脏等畸形。长期以来敲除 FA 基因的小鼠无法表现出人类骨髓三系下降的表型。2009 年 RAYA 等^[8]将包含 VAV 启动子的失活慢病毒转入 FA 患者的成纤维细胞中进行基因修复,并把包含 OSKM 4 种转录因子的逆转录病毒导入修复后的细胞中成功获得了 FA-iPSCs,同 OP9 细胞共培养后得到表型正常的红系和髓系造血祖细胞,FA-iPSCs 及分化成红系或髓系造血祖细胞仍保留对 DNA 交联剂敏感的特点,然而该实验证实 iPSCs 不能直接从 FA 患者体细胞诱导获得,必须先将患者体细胞进行修复后方可成功诱导。随后,MUELLER 等^[9]证明低氧状态下 FA 患者的体细胞可不经基因修复直接诱导成 iPSCs。OSBORN 等^[10]设计了针对 FA 基因 15 号外显子 1461C>A 的 sgRNA,利用 CRISPR/Cas9 修补患者的 iPSCs,并证实该位点同源重组修复(HDR)概率高于非同源重组修复(NHEJ),保证了基因编辑技术治疗 FA 的精确性与安全性,为将来应用 iPSCs 联合基因修复技术治疗该病奠定基础。

2.2 镰刀型细胞贫血病(SCD) SCD 是由点突变引起 β 珠蛋白第 6 位谷氨酸被缬氨酸替代,导致血红蛋白结构异常,该病在世界范围内分布广泛,具有高的致死性和发病率。2007 年,HANNA 等^[11]将来自人源性 SCD 小鼠成纤维细胞诱导成 iPSCs,电转正常 β 珠蛋白基因至 iPSCs 后,利用拟胚体(EB)技术将其分化为造血祖细胞,再注入回 SCD 小鼠中,最终在小鼠体内检测到正常 β 珠蛋白基因表达。ZOU 等^[12]将包含了药物筛选位点的 loxP 序列和锚定突变位点的锌指核酸酶(ZFN)序列的质粒转入 SCD 患者(βS/βS)来源的 iPSCs 中,将 1 条突变的 βS 修复为正常的 βA,得到了基因型为 βA/βS 的 iPSCs,用 Cre 重组酶将 loxP 序列敲除并分化为红细胞后,可得到 25%~40%的正常 βA 表达。2016 年 LI 等^[13]找到一种更高效、安全的诱导 SCD 患者 iPSCs 方法,他们将 EB 病毒上的 oriP/EBNA1 区连致 HDAd 载体内,解决了 HDAd 载体无法进行重编程的问题,后将包含 Oct4、Sox2、Klf4、L-Myc、Lin-28、p53shRNA 序列的 HDAd/EBV 载体导入敲除病毒编码区的腺病毒中,降低了腺病毒的毒性和免疫活性,大幅度提高了诱导效率,利用 CRISPR/Cas9 技术将针对 SCD 的 sgRNA、Cas9 蛋白及 HDR 单链寡核酸修复模板(ssODN)注入 iPS 细胞系中,修复效率高达 67.9%(βA/[βS+βA])。修复后的 iPS 细胞行全基因组测序未发现肿瘤抑制基因或其他致病基因改变,这为修复患者来源的 iPSCs 提供了快速、高效、安全的方法,也为治疗其他基因突变疾病奠定基础。

2.3 β-地中海贫血 β-地中海贫血是常见的遗传疾

病,由 β 珠蛋白基因的缺失或突变引起,正常 β 珠蛋白的减少致使血红蛋白不能携带足够氧气满足机体代谢需要,中间型、重型患者常需终生输血、祛铁治疗。2009 年, YE 等^[14]成功获得了 β -地中海贫血患者成纤维细胞来源的 iPSCs,同时还将来自 β -地中海贫血胎儿产前基因筛查的羊水或绒毛细胞诱导成 iPSCs;最近, iPSCs 也被证实可由 β -地中海贫血患者的外周血或脐带血细胞产生^[15],为日后治疗胎儿重型地中海贫血提供了重要平台。WANG 等^[16]用同源重组的方法修复了 β -地中海贫血患者来源的 iPSCs,将修复后的 iPSCs 定向分化为造血祖细胞并注入免疫缺陷鼠中,成功检测到人正常 β 珠蛋白表达。MA 等^[17-18]先后应用转录激活因子效应物核酸酶 (TALEN) 技术和 ZFN 技术修复了 β -地中海贫血患者 iPS 细胞株上 β -珠蛋白的基因突变,修复后的 iPSCs 仍具有正常核型与多向分化能力,同 OP9 系统共培养后可向红系分化,应用外显子测序技术检测 ZFN 修复前、修复后及向造血祖细胞分化时的 β -地中海贫血 iPSCs 发现,基因突变多发生于重编程和基因修复过程中,与 iPSCs 的传代次数和培养时间无关。随着 CRISPR/Cas9 技术的发展, iPSCs 技术与 CRISPR/Cas9 技术联合治疗 β -地中海贫血相关研究被不断报道, LIU 等^[19]应用 CRISPR/Cas9 联合小分子化合物修正 β -地贫 iPSCs 突变的 β -珠蛋白基因,在保证修正后细胞保持正常核型与完全多能性的同时,提高了修正效率且无脱靶作用,为应用 CRISPR/Cas9 联合 iPSCs 治疗血红蛋白病提供了新方法。XIE 等^[20]将 CRISPR/Cas9 与 piggyBac 技术相结合,在修复 β -地贫 iPSCs 后不残留基因痕迹,为未来应用 iPSCs 治疗地中海贫血提供了有力依据。

3 展 望

iPSCs 技术为治疗血液系统疾病的提供了新的方向,但将其投入临床治疗尚需克服很多难关。首先,分化后的靶细胞移植入体内后其分化方式和分化机制仍有待研究,同时 iPSCs 也存在着诱导效率低和安全性问题。随着研究的进一步深入,现已发现诱导过程中表达细胞周期蛋白 B1、细胞周期蛋白依赖性激酶 1、抑癌基因 p53、细胞周期调节基因 INK4A 抑制剂和某些特定的 miRNA 可提高诱导效率,而与体细胞相比,成体干细胞更易转变为 iPS 细胞^[21-23]。同时,细胞因子载体也由最初的逆转录病毒改为更安全的腺病毒、仙台病毒、质粒等。近年来,降低外源基因随机整合的实验方法也获得了成功,相信随着对重编程过程和表观遗传状态研究的逐步加深,人们可以找到更安全、高效的诱导方法^[24]。iPSCs 技术与基因编辑技术、基因表达调控技术相结合后将为遗传性血液病的治疗开启新的篇章。

参考文献

- [1] TAKAHASHI K, TANABE K, OHNUKI M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors[J]. *Cell*, 2007, 131(5): 861-872.
- [2] GAO Y W, CHEN J Y, LI K, et al. Replacement of Oct4 by Tet1 during iPSC induction reveals an important role of DNA methylation and hydroxymethylation in reprogramming[J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 12(4): 453-469.
- [3] ABDELALIM E M, EMARA M M, KOLATKAR P R. The SOX transcription factors as key players in pluripotent stem cells[J]. *Stem Cells Dev*, 2014, 23(22): 2687-2699.
- [4] PEI H Y, FUA H Y, HIRAI H, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from Chinese hamster embryonic fibroblasts[J]. *Stem Cell Res*, 2017(21): 132-136.
- [5] FANG I M, YANG C M, YANG C H, et al. Transplantation of induced pluripotent stem cells without C-Myc attenuates retinal ischemia and reperfusion injury in rats [J]. *Exp Eye Res*, 2013, 113(4): 49-59.
- [6] HOU P, LI Y, ZHANG X, et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds[J]. *Science*, 2013, 341(6146): 651.
- [7] YE J Q, GE J, ZHANG X, et al. Pluripotent stem cells induced from mouse neural stem cells and small intestinal epithelial cells by small molecule compounds [J]. *Cell Res*, 2016, 26(1): 34-45.
- [8] RAYA Á, RODRÍGUEZPIZÀ I, GUENECHEA G, et al. Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells [J]. *Nature*, 2009, 460(7251): 53.
- [9] MUELLER L U, SCHLAEGER T M, DEVINE A L, et al. Induced pluripotent stem cells as a tool for gaining new insights into Fanconi anemia [J]. *Cell Cycle*, 2012, 11(16): 2985-2990.
- [10] OSBORN M J, LONETREE C L, WEBBER B R, et al. CRISPR/Cas9 targeted gene editing and cellular engineering in fanconi anemia[J]. *Stem Cells Dev*, 2016, 25(20): 1591-1603.
- [11] HANNA J, WERNIG M, MARKOULAKI S, et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin[J]. *Science*, 2007, 318(5858): 1920-1923.
- [12] ZOU J Z, MA L P, HUANG X S, et al. Site-specific gene correction of a point mutation in human iPS cells derived from an adult patient with sickle cell disease[J]. *Blood*, 2011, 118(17): 4599-4608.
- [13] LI C, DING L, SUN C W, et al. Novel HDAd/EBV reprogramming vector and highly efficient Ad/CRISPR-Cas sickle cell disease gene correction[J]. *Sci Rep*, 2016(6): 30422.
- [14] YE LIN, CHANG J C, LIN C, et al. Induced pluripotent stem cells offer new approach to therapy in thalassemia and sickle cell anemia and option in (下转第 2835 页)

在风险评估后的 5 个月内未发现该类风险事件,但由于该风险事件的风险严重程度较高,检测度非常低,风险系数较高,故建议仍纳入下一轮高风险控制项目,继续进行监测。

3 讨 论

风险评估的目的在于不断地完善和持续改进实验室质量管理水平,降低或消除实验室的风险,保证患者医疗过程的安全性。鉴于急诊肌钙蛋白检测结果在心肌梗死疾病的诊断和治疗中重要作用,实验室选择了该项目作为风险管理的首选项目,利用风险管理工具结合本实验室实际工作建立了急诊肌钙蛋白检测的风险管理程序,根据帕累托分析法确定了关键环节的潜在风险事件,对识别出的高风险事项制订了控制和监控措施。目前发布的关于风险管理的指导性文件中,存在评估标准不统一的问题,这样会导致不同的实验室对相同风险事件的评估结果不同,郝晓柯等^[11]将质量指标与风险管理进行整合为风险管理的提供了新的思路,本研究利用实验室质量指标对风险评估中的高风险项进行监测和评价,不但防止了风险事件对检验结果造成不良影响,还能通过质量指标值的变化直接对质量改进计划的效果进行客观评价。

参考文献

[1] British Standards Institution. Medical devices-application of risk management to medical devices;BS EN ISO 14971 [S]. British;British Standards Institution,2012.

[2] Clinical and Laboratory Standards Institute. Laboratory quality control based on risk management; approved guideline;EP23-A[S]. Wayne,PA. US;CLSI,2011.
[3] Clinical and Laboratory Standards Institute. Risk management techniques to identify and control laboratory error sources[M]. 2nd ed. PA;ALSI,2009.
[4] 续薇. 医学实验室风险管理[J]. 中华检验医学杂志, 2015,38(9):589-591.
[5] 牛广华,高玉洁,崔百慧. 临床实验室按照 FMEA 模式构建凝血功能检测项目的风险管理程序[J]. 中华检验医学杂志,2016,39(1):13-17.
[6] 国际标准化组织,郭永建. ISO/TS 22367:2008 医学实验室-通过风险管理和持续改进减少失误[J]. 中国输血杂志,2012,25(12):1339-1341.
[7] 章晓燕,王薇,王治国. 减少临床实验室差错的程序和风险分析[J]. 国际检验医学杂志,2016,37(1):140-142.
[8] 章晓燕,王薇,王治国. 制定基于风险的临床检验质量控制计划[J]. 检验医学与临床,2016,13(4):568-570.
[9] 周睿,胡卫江,李勇,等. 风险管理在医学实验室的应用[J]. 中华检验医学杂志,2012,35(12):1087-1090.
[10] 中国合格评定国家认可中心. 医学实验室质量和能力认可准则:ISO 15189,2012[S]. 北京:中国合格评定国家认可中心,2012.
[11] 郝晓柯,曾宪飞. 风险管理及 6 sigma 体系与临床实验室质量管理的整合[J]. 中华检验医学杂志,2014,37(1):17-20.

(收稿日期:2018-02-16 修回日期:2018-05-02)

(上接第 2828 页)

prenatal diagnosis in genetic diseases[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2009,106(24):9826-9830.
[15] 曾敏慧,蒋满波,文艳飞,等. 地中海贫血患者来源外周血及脐带血细胞诱导式多能干细胞的建系和造血分化[J]. 广东医学,2015(11):1633-1637.
[16] WANG Y X,ZHENG C G,JIANG Y H,et al. Genetic correction of beta-thalassemia patient-specific iPS cells and its use in improving hemoglobin production in irradiated SCID mice[J]. Cell Res,2012,22(4):637-648.
[17] MA N,LIAO B J,ZHANG H,et al. Transcription activator-like effector nuclease (TALEN)-mediated gene correction in integration-free β -thalassemia induced pluripotent stem cells[J]. J Biol Chem,2013,288(48):34671-34679.
[18] MA N,SHAN Y L,LIAO B J,et al. Factor-induced reprogramming and zinc finger nuclease-aided gene targeting cause different genome instability in β -thalassemia induced pluripotent stem cells (iPSCs)[J]. J Biol Chem,2015,290(19):12079-12089.
[19] LIU Y L,YANG Y,KANG X J,et al. One-Step biallelic and scarless correction of a beta-Thalassemia mutation in Patient-Specific iPSCs without drug selection[J]. Mol T-

her Nucleic Acids,2017(6):57-67.
[20] XIE F,YE L,CHANG J C,et al. Seamless gene correction of β -thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyBac[J]. Genome Res,2014,24(9):1526-1533.
[21] RASMUSSEN M A,HOLST B,TUMER Z,et al. Transient p53 suppression increases reprogramming of human fibroblasts without affecting apoptosis and DNA damage[J]. Stem Cell Reports,2014,3(3):404-413.
[22] ZHAO W,LI Q T,AYERS S,et al. Jmjd3 inhibits reprogramming by upregulating expression of INK4a/Arf and targeting PHF20 for ubiquitination[J]. Cell,2013,152(5):1037-1050.
[23] ZHANG N P,LYU Y,PAN X B,et al. miR-146b-5p promotes the neural conversion of pluripotent stem cells by targeting Smad4[J]. Int J Mol Med,2017,40(3):814-824.
[24] LI S P,LAN H,MEN H S,et al. Derivation of Transgene-Free rat induced pluripotent stem cells approximating the quality of embryonic stem cells[J]. Stem Cells Transl Med,2017,6(2):340-351.

(收稿日期:2018-01-23 修回日期:2018-04-19)