

文章编号: 1004-0374(2009)01-0067-05

血红蛋白疾病基因治疗研究进展

马海燕, 张敬之*

(上海交通大学医学遗传研究所, 上海交通大学附属儿童医院, 上海200040)

摘要: 血红蛋白疾病是由于血红蛋白分子突变造成其结构或合成异常引起的一类疾病, 分为血红蛋白病和地中海贫血两大类。前者表现为血红蛋白分子的珠蛋白肽链结构异常, 如镰刀状贫血; 后者表现为珠蛋白肽链合成速率的降低, 如 β -地中海贫血。本文主要以 β -地中海贫血和镰刀状贫血为例, 从DNA水平、RNA水平和基因调控及干细胞移植等方面介绍血红蛋白疾病基因治疗的研究进展, 并结合生命科学的最新发现, 对该领域将来可能出现的新的治疗方法提出展望。

关键词: β -地中海贫血; β -珠蛋白基因; 基因治疗

中图分类号: R556.7; R394 **文献标识码:** A

An overview on the study of gene therapy of hemoglobin disorders

MA Hai-yan, ZHANG Jing-zhi*

(Shanghai Institute of Medical Genetics, Shanghai Children's Hospital,
Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200040, China)

Abstract: Hemoglobin disorders are the diseases caused by mutations leading to structural or synthetic abnormalities of hemoglobin. Conventionally, it is divided into two groups: hemoglobinopathy and thalassemia. The former is categorized by globin structural abnormality, like sickle cell disease; while the latter is termed by decrease or absence in globin chain synthesis, such as β -thalassemia. Taking the β -thalassemia and sickle cell disease as examples, the progresses on the study of gene therapy of hemoglobin disorders is reviewed in this article, including in-situ aberrant correction, normal RNA splicing restoring, gene regulation and hematopoietic stem cell transplantation. Based on recent achievements in life sciences, some personal views of future directions are proposed herein also.

Key words: β -thalassemia; β -globin gene; gene therapy

血红蛋白疾病是由于血红蛋白分子合成异常引起的一类疾病, 分为血红蛋白病和地中海贫血两大类。血红蛋白疾病在世界范围内广泛流行^[1]。其中, β -地中海贫血症(β -thalassemia, β -地贫)是一种与血红蛋白(Hb)合成相关的最为常见的单基因遗传疾病, 广泛分布在世界各地。引起 β -地贫的最直接原因就是血红蛋白四聚体在生成过程中 β Hb(β 血红蛋白)合成受到抑制, α Hb(α 血红蛋白)因为没有足够的 β Hb配对结合而相对过剩, 非结合的 α Hb就会以一种不稳定单体形式存在, 易于被氧化并引起毒性沉积, 进而造成细胞膜受损、幼稚红细胞骨髓内破坏、成熟红细胞僵硬、红细胞寿命明显缩短, 最终引起溶血性贫血。贫血又促使肠道吸收过多的

铁, 使心、肝、脾、骨髓等组织中铁沉积, 进而造成心肌损害、肝功不全等, 甚至造成患者心力衰竭而死亡。目前, 骨髓移植(BMT)是临床上唯一可以根治 β -地贫的方法, 但是对患者来讲限制条件太多而使其临床应用受限。而镰刀状贫血是由于 β -珠蛋白基因编码第6个密码子的序列由GAG突变成GTG, 使编码谷氨酸变为编码缬氨酸所致, 本病主要分布在非洲, 也分布在地中海地区, 是世界范围内最严重的血红蛋白病。

收稿日期: 2008-06-27; 修回日期: 2008-10-29

基金项目: 国家自然科学基金(30571777); “973”项目(2004CB518806)

*通讯作者: jzhang38@hotmail.com

基因治疗是指将外源基因或其他遗传物质转移到患者某些细胞内,通过纠正遗传缺陷、表达治疗性基因产物或灭活致病基因,或者是通过调节基因表达的途径,对遗传病进行治疗,而使相应疾病得以预防、减轻、代偿或纠正的方法。基因治疗对于单基因突变引起的遗传病变尤为合适,而 β -地贫、镰刀状贫血的发生主要就是由于基因的点突变所致,所以,应用基因治疗的手段治疗 β -地贫、镰刀状贫血成为学者研究的热点和良好的研究模型。

1 导入正常基因及 DNA 修正治疗

1.1 慢病毒载体介导的基因导入

β -地贫主要是由于 β -珠蛋白基因突变所致,因此,直接导入正常的人珠蛋白基因进行基因补偿成为一种理论上可行的方法,然而,在实际的研究过程中,由于缺乏安全有效的携带外源基因的载体而使得这方面的研究进展缓慢。2000年,May等^[2]首次使用携带人的 β -珠蛋白基因的慢病毒载体介导感染造血干细胞,并有效地改善了 β -地贫模型小鼠的贫血症状。此载体的优点是:(1)载体能包含约8kb片段的 β -珠蛋白基因组及其上游调节元件,使 β -珠蛋白基因能够高效、稳定表达;(2)可以转染静止期细胞,并能稳定表达,使慢病毒载体成为目前研究 β -地贫基因治疗的主要载体,最常用的慢病毒载体是以HIV-1为骨架。随后,其他的研究小组也相继证明了慢病毒载体介导治疗 β -地贫和其他血红蛋白疾病的疗效。2001年,Pawliuk等^[3]在镰刀状贫血模型小鼠中,利用携带人的 β^A 蛋白基因的慢病毒载体介导感染其造血干细胞,使得 β^A 珠蛋白在其红系组织内得到较高表达,有效地抑制了镰刀状血红蛋白的形成,从而极大的改善了镰刀状贫血的症状。2007年,Han等^[4]利用携带人 α -珠蛋白基因的慢病毒载体介导,对怀孕中期的 α 地贫模型鼠进行宫内注射,出生后代小鼠红系组织内人 α -珠蛋白的表达在出生3-4个月后达到最高水平(鼠内 α -珠蛋白总量的20%),但是在7个月后表达水平明显降低(<5%)。因此,利用慢病毒载体介导进行基因治疗,但治疗作用的稳定性及安全性仍需要进一步研究。2007年,Li等^[5]构建了人类 β -珠蛋白基因的转基因表达载体,通过卵周隙显微注射的方法,成功地在 β -地贫模型鼠中导入了人类 β -珠蛋白基因,并且通过小鼠繁育获得了转基因小鼠的F1、F2代。通过RT-PCR、Western Blotting和ELISA等方法进一步分析了外源基因在 β -地贫模型鼠内的整合情况,结果表明在转基因小鼠

体内能够合成人类正常的 β -珠蛋白mRNA和蛋白质,并在F0、F1、F2三代小鼠间保持稳定的水平;转基因小鼠血液学指标和病理学变化也证实其贫血症状得到了明显的改善。这为慢病毒载体介导的基因治疗在个体水平的稳定性和有效性提供了依据。

1.2 原位修复

针对 β -珠蛋白的基因突变,除了利用基因补偿的方法外,也可以利用基因置换的方法进行原位修复的基因治疗。2003年,Gruenert等^[6]利用SDF(small DNA fragment)对基因组DNA进行位点特异的纠正,通过外源的SDF与体内同源序列之间的置换,最终达到改变表型的目的。该小组针对镰刀型贫血病的HBB单基因突变序列,利用SFHR(small fragment homologous replacement)介导的方法治疗,使得至少有1% - 2%的细胞得以纠正。这为同样是单基因突变引起的 β -地贫的基因治疗研究提供了一条可行的途径。

锌指核酸酶(ZFN)由ZFP和cleavage domain组成,ZFP负责识别特异目的DNA序列;cleavage domain负责断裂DNA双链。ZFN设计时,需要在目的基因的相反方向、间隔适当的距离设计两个不同的ZFN,即Left ZFN和Right ZFN,形成二聚体以诱导产生双链DNA的断裂(图1)。

ZFN是近年来基因治疗中研究的一个热点。它是受自然存在的FokI核酸酶启发设计的杂合蛋白。FokI核酸酶是由非特异的DNA结合domain和DNA断裂domain组成,而ZFN是由能识别特异目的DNA序列的锌指DNA结合domain,与FokI内源核酸酶的断链domain组成的杂合蛋白。它能识别特异的DNA序列,并将靶序列的双链断裂,断裂的双链可以诱导同源重组介导的修复。这就为基因的矫正治疗提供了可能^[7]。2005年,Urmov等^[8]在Nature上报道了通过设计位点特异的锌指核酸酶,与携带内源基因的载体共转染K-562细胞、原代T淋巴细胞等细胞系,验证了锌指核酸酶特异、定点、高

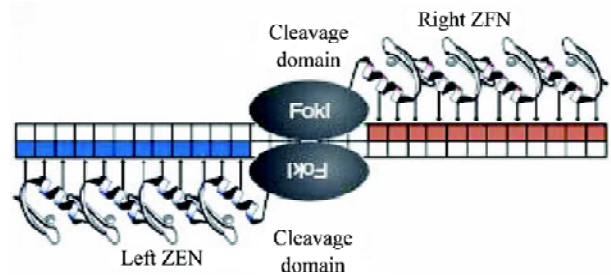


图1 锌指核酸酶与靶基因作用示意图^[7]

效地介导内源基因(*IL2R γ C*)的基因矫正。2007年,该研究小组又在CD34⁺细胞祖细胞、人的干细胞系中,利用整合酶缺陷的慢病毒载体介导ZFN-外源基因共转染细胞,结果表明外源基因在该细胞系及干细胞分化的神经细胞中都能够稳定表达^[9]。该研究还发现在没有ZFN加入的对照组中,外源基因的表达大大减少,这充分验证了锌指核酸酶介导定点修复的高效性。我们尚未发现锌指核酸酶在地贫、SCD模型小鼠中做相关实验,但是该项研究结果同样为地贫、镰刀状贫血的基因治疗提供一种新的方法。

2 异常剪接的纠正治疗

2.1 反义RNA介导

反义RNA主要是指与mRNA互补的RNA分子。反义RNA与mRNA特异性的互补结合抑制了该mRNA的翻译。最早是在*E. coli*的产肠杆菌素的Co1 E1质粒中发现的,许多实验证明在真核生物中也存在反义RNA。通过人工合成反义RNA的基因,并将其导入细胞内转录成反义RNA,能抑制某特定基因的表达,阻断该基因的功能。

β -地贫除极少数是由于基因缺失引起以外,绝大多数是由于 β -珠蛋白基因不同类型的点突变所致。这些点突变分别导致转录受阻,mRNA前体剪接加工错误,翻译失效,或合成不稳定的珠蛋白而阻碍 α - β 二聚体的形成,使珠蛋白链不平衡等。 β^{654} 地贫是中国人特有的一种地贫疾病,它是由于 β 珠蛋白基因第二内含子第654位核苷酸的碱基C突变为T所致^[1]。针对 β -地贫的发病机制,1993年,Dominski和Kole等^[10]采用反义核酸基因治疗的策略,在非细胞系统中加入特异封闭pre-mRNA异常剪接位点的2'-O-甲基-反义DNA,结果异常剪接的mRNA减少而正常剪接的mRNA升高。这说明,应用反义核酸技术对 β 地贫进行调控基因治疗是可行的。但是传统的反义核酸治疗导入的寡聚核酸不稳定,容易被细胞内核酸酶降解,2'-O-甲基虽然能给予一定的保护,但是其合成昂贵,并且需要持续用药。针对这些问题,Zeng等^[11]和Gong等^[12]首次设计并构建了针对 β -地贫中异常mRNA的反义RNA的真核表达载体,通过阻断 β^{654} 异常剪接、恢复正常剪接的途径,达到了增加 β 肽链的目的,并在mRNA和珠蛋白肽链合成的水平上,证实了所构建的反义RNA表达载体在体外转录/体外剪接系统、培养的 β^{654} 重组HeLa细胞和 β^{654} 地贫患者红系细胞之中,均显示出有效的纠正 β^{654} 剪接缺陷的作用。而且,该表达载体的稳定性、特异性也得到

了很好的验证。

2.2 干扰RNA介导

RNAi是通过siRNA介导的特异性高效抑制基因表达途径,由siRNA介导,经Dicer酶识别并靶向切割同源性靶mRNA,在转录和翻译水平特异性的抑制基因表达。RNAi在基因功能研究和基因药物应用中具有广泛的前景。

2002年,Brummelkamp等^[13]首次使用小鼠H1启动子构建了小发卡RNA(small hairpin RNA, shRNA)表达载体pSUPER,并证实转染该载体可有效、特异性地剔除哺乳动物细胞内目的基因的表达,为利用RNAi技术进行基因治疗研究奠定了基础。 β 地贫的发生,是由于正常的 β 肽链合成受到抑制,使得过多的 α 肽链无法与之结合,沉积在细胞表面,导致氧化损伤和细胞凋亡,造成无效红细胞生成。因此, α/β 比例平衡关系与 β 地贫的严重程度相关联。除了增加正常 β 珠蛋白基因的表达,减少 α 链的合成也可以对地贫起到治疗作用。因此,可以利用RNAi技术来降低过剩的 α 链,缓解 β 地贫的病理变化。2006年,Samakoglu等^[14]通过在镰刀状贫血患者的CD34⁺细胞中共表达shRNA和 γ -珠蛋白降低了内源性 β^e 的表达。2007年,Xie等^[15]成功的利用慢病毒载体在 β 地贫模型鼠中制备了针对 α -珠蛋白的shRNA(short hairpin RNA)转基因小鼠(α i-Hbb^{th-4}/Hbb⁺)、错误剪接的 β -珠蛋白的反义RNA(antiRNA)转基因小鼠(β a-Hbb^{th-4}/Hbb⁺)以及 α i-shRNA、 β a-antiRNA双阳的转基因小鼠(α i β a-Hbb^{th-4}/Hbb⁺),通过shRNA减少过剩 α -珠蛋白的生成、反义RNA增加正确剪接的 β -珠蛋白,使得 α/β 肽链的比例趋于正常,尤其是在双阳小鼠 α i β a-Hbb^{th-4}/Hbb⁺中, α/β 的比值接近于正常值。通过RT-PCR技术检测, β -地贫模型鼠中,转基因小鼠,尤其是双阳小鼠体内,过剩的 α -珠蛋白的mRNA量大大降低,正常剪接的 β -珠蛋白的mRNA量显著上升。血液学、病理学等各方面的检测结果也证实,转基因小鼠尤其是双阳小鼠在个体水平的贫血症状得到了很大的改善。

2.3 核酶介导

与干扰RNA类似,核酶(ribozyme)因其可以减少相应基因mRNA的量而成为抑制特定基因表达的有效工具。核酶是一组可以与特异RNA序列作用的、具有酶特性的RNA分子。特定设计的核酶,可以抑制有害的病毒或细胞内mRNA的表达,已经作为一种有效地基因治疗方法^[16,17]。已有报道利用核酶治疗和 β -地贫同属单基因突变遗传病的镰刀型贫血病。Lan等^[18]在血细胞前体细胞

中, 利用转入核酶, 降解 β^s - 珠蛋白 mRNA, 特异地抑制了 β^s - 珠蛋白基因的表达。Shen 等^[19]也利用核酶在镰刀型贫血病的治疗中进行了探索, 通过在红细胞系中分别引入作用于 α - 珠蛋白序列特异位点的核酶 zb21A 基因和针对 β^s - 珠蛋白的多核酶基因, 减少了 α - 珠蛋白和 β^s - 珠蛋白 mRNA 水平, 使得细胞内的 γ - 珠蛋白 mRNA 与 β^s - 珠蛋白 mRNA 的比例明显上升。这种方法同样可以用于地中海贫血病的治疗。

3 药物的调控治疗

药物的调控治疗主要是通过药物刺激或重新激活 γ - 珠蛋白基因的表达, 增加胎儿血红蛋白的合成, 改善 α 与非 α 珠蛋白链的合成失衡。对镰刀状贫血而言, 通过羟基脲(HU)激活 γ - 珠蛋白基因的表达, 增加胎儿血红蛋白的合成, 而胎儿血红蛋白(HbF)可以减少镰刀型血红蛋白聚合的几率。Rodgers 等^[20]用 HU 对 10 例镰刀状贫血的患者进行药物跟踪治疗 3 个月, 发现患者体内 HbF 的量有不同程度的提高, 最高能提高至原有水平的 10 倍, 甚至在 3 个月调查结束后, HbF 水平仍然不断升高。通过检测氧饱和度发现, 在含有 HbF 的细胞中, 形成细胞内聚合的趋势减少了 33%, 有效地改善了镰刀状贫血的症状。另外, 在对地中海贫血的治疗研究中, Zeng 等^[21]发现两名患有中国人特有的 β^{654} 突变的地贫的患者, 在采用低浓度 HU 治疗后, 极大的促进了红细胞生成, 各项血液学指标得到明显改善, 体内总的血红蛋白量提高, 但是, 患者体内的 HbF 并没有升高, 这提示, HU 可能对 β - 珠蛋白基因有调控作用, 能增加 β - 珠蛋白肽链的合成。这就为地中海贫血的药物治疗提供了新的理论依据。除羟基脲外, 临床上使用的治疗药物还有丁酸盐类药物、促红细胞生成素、5- 氮胞苷等, 但是由于其大剂量使用具有毒副作用而限制了在临床上的使用^[22]。

4 干细胞移植治疗

地中海贫血为世界范围内的单基因遗传病, 临床上应用的输血治疗、螯合治疗及羟基脲等治疗方法虽然可以改善患者的临床症状, 提高患者的生命质量, 但是, 始终无法根治地贫、消除治疗过程出现的副作用。目前, 造血干细胞移植是唯一能根治血红蛋白病的治疗方法。最早利用造血干细胞成功治疗血红蛋白病的报道, 是 1981 年意大利对多达 1 000 名患者进行的造血干细胞移植治疗。Yesilipek^[23]

从 1998 年到 2006 年期间, 对 60 名 β - 地贫患者进行了造血干细胞的移植治疗, 结果发现, 有 31% (14/45) 形成稳定嵌合, 转移后的成活率达到 84.0%。然而, HLA 配型相符的供体细胞的寻找、移植后的免疫排斥反应等为造血干细胞的移植治疗设定了障碍。

2005 年, Chang 等^[24]从镰刀状贫血模型鼠中获得胚胎干细胞(ES 细胞), 利用同源重组将其 β^s 突变基因校正为 β^A 正常基因, 修复后的 ES 细胞分化成的造血细胞大多能合成正常珠蛋白和 β^s - 珠蛋白。这为避开干细胞移植存在的诸多障碍、利用人的 ES 细胞治疗镰刀状贫血及地中海贫血等疾病提供了一条途径。除此之外, 2007 年底, Brambrink 等^[25]、Takahashi 等^[26]相继报道了利用反转录病毒载体将四种转录因子导入人的成体纤维细胞, 并成功诱导其成为具有分化潜能的干细胞- 诱导多功能干细胞(iPS)。这在理论上为干细胞的治疗带来了希望。随后, Hanna 等^[27]将小鼠的皮肤成纤维细胞诱导成为具有分化潜能的细胞后, 将 β - 珠蛋白基因导入细胞内, iPS 分化成血细胞前体细胞后导入原镰刀型贫血模型小鼠受精卵内, 研究结果表明, 该方法治疗后的小鼠, 其血液学的各项指标有了明显的改善。这提示, 利用 iPS 方法进行自体修复、避免免疫排斥反应, 可能为单基因突变遗传病的基因治疗提供新的途径。若结合锌指核酸酶介导的原位修复, 在该干细胞内引入可调性的自杀机制, 或许能更大程度地解决其有效性和安全性方面的问题, 有关这方面工作目前尚未见文献报道, 但这将是个有前途的方法, 同样可以用于地贫、镰刀状贫血治疗。

5 问题与展望

地中海贫血和镰刀状细胞贫血是世界上首先被阐明其遗传缺陷分子基础的疾病, 同时珠蛋白基因又是第一个被克隆和研究的基因。因此, 20 多年前当珠蛋白基因刚被克隆和测序时, 人们就期待血红蛋白疾病成为第一个通过体细胞基因治疗技术而被治疗的遗传性疾病。然而, 随后的研究表明珠蛋白基因的时空表达控制过程极为复杂, 另外, 转移的外源珠蛋白基因或抗镰刀血红蛋白的基因必须随珠蛋白基因簇在个体发育不同阶段适时表达。然而, 目前我们对珠蛋白基因表达的时空调控机制并不是完全清楚, 因此, 尽管经历近二十年的探索, 对血红蛋白疾病的基因治疗仍未取得令人满意的效果, 对血红蛋白疾病的基因治疗仍然存在不少困

难, 如转入的目的基因在体内的表达水平较低, 在对转入目的基因的个体的长期观察中, 外源目的基因的表达平均只有内源珠蛋白表达量的3%; 目的基因在宿主基因组内整合的位置效应、载体沉默现象, 以及作为基因治疗重要工具的载体的包装容量、安全性等都有待于提高^[28]。不过, 通过对地中海贫血和镰刀状贫血基因治疗研究的不断实践, 研究者们达成了一点共识, 就是必须对珠蛋白基因调控系统有充分的了解, 对外源基因的表达时机和表达量能进行有效准确的调控后才有可能使体细胞基因治疗获得成功^[1]。

ÖÄĐ»£ÖÔDÄ, ĐĐ»ÈÏÖ×Èö, ðËÛ¶Ô±³ÄÄµÄÏ-ĐÄÖ,
µ/£

[参 考 文 献]

- [1] 曾溢滔主编. 人类血红蛋白[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 82-207
- [2] May C, Rivella S, Callegari J, et al. Therapeutic haemoglobin synthesis in β -thalassaemic mice expressing lentivirus-encoded human β -globin. *Nature*, 2000, 406(6791): 82-6
- [3] Pawliuk R, Westerman KA, Fabry ME, et al. Correction of sickle cell disease in transgenic mouse model by gene therapy. *Science*, 2001, 294(5550): 2368-71
- [4] Han XD, Lin C, Chang J, et al. Fetal gene therapy of α -thalassemia in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(21): 9007-11
- [5] Li W, Xie SY, Guo XB, et al. A novel transgenic mouse model produced from lentiviral germline integration for the study of β -thalassemia gene therapy. *Haematologica*, 2008, 93(3): 357-62
- [6] Gruenert DC, Bruscia E, Novelli G, et al. Sequence-specific modification of genomic DNA by small DNA fragment. *J Clin Invest*, 2003, 112(5): 637-41
- [7] Miller JC, Holmes MC, Wang JB, et al. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(7): 778-85
- [8] Urmov FD, Miller JC, Lee Y-L, et al. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature*, 2005, 435(7042): 646-51
- [9] Lombardo A, Genovese P, Beausejour CM, et al. Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(11): 1298-306
- [10] Dominski Z, Kole R. Restoration of correct splicing in thalassaemic pre-mRNA by antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(18): 8673-7
- [11] Zeng YT, Gu XF, Chen YD, et al. Reversal of aberrant splicing of β -thalassaemia allele by antisense RNA *in vitro* and *in vivo*. *Chn Med J (Engl)*, 1999, 112(2): 107-11
- [12] Gong L, Gu XF, Chen YD, et al. Reversal of aberrant splicing of β -thalassaemia allele by antisense RNA expression vector in cultured human erythroid cells. *Br J Haematol*, 2000, 111(1): 351-8
- [13] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, 2002, 296(5567): 550-3
- [14] Samakoglu S, Lisowski L, Budak-Alpdogan T, et al. A genetic strategy to treat sickle cell anemia by coregulating globin transgene expression and RNA interference. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(1): 89-94
- [15] Xie SY, Ren ZR, Zhang JZ, et al. Restoration of the balanced α / β -globin gene expression in β^{654} -thalassaemia mice using combined RNAi and antisense RNA approach. *Human Mol Genet*, 2007, 16(21): 2616-25
- [16] Forster AC, Symons RH. Self-cleavage of virusoid RNA is performed by the proposed 55-nucleotide active site. *Cell*, 1987, 50(1): 9-16
- [17] Chowrira BM, Burke JM. Binding and cleavage of nucleic acids by "hairpin" ribozyme. *Biochem*, 1991, 30(35): 8518-22
- [18] Lan N, Howrey RP, Lee S-W, et al. Ribozyme mediated repair of sickle β -globin mRNAs in erythrocyte precursors. *Science*, 1998, 280(5369): 1593-6
- [19] Shen TJ, Rogers H, Yu XB, et al. Modification of globin gene expression by RNA targeting strategies. *Exp Hematol*, 2007, 35(8): 1209-18
- [20] Rodgers GP, Dover GJ, Noguchi CT, et al. Hematologic responses of patients with sickle cell disease to treatment with hydroxyurea. *N Engl J Med*, 1990, 322: 1037-45
- [21] Zeng YT, Huang SZ, Ren ZR, et al. Hydroxyurea therapy in β -thalassaemia intermedia: improvement in haematological parameters due to enhanced β -globin synthesis. *Br J Haematol*, 1995, 90: 557-63
- [22] 刘容容, 赖永榕. β -地中海贫血的治疗进展. *国际输血及血液学杂志*, 2006, 29: 109-11
- [23] Yesilipek MA. Stem cell transplantation in hemoglobinopathies. *Hemoglobin*, 2007, 31(2): 251-6
- [24] Chang JC, Ye L, Kan YW. Correction of the sickle cell mutation in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(4): 1036-40
- [25] Brambrink T, Foreman R, Welstead GG, et al. Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(2): 151-9
- [26] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007, 131(5): 861-72
- [27] Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*, 2007, 318(5858): 1920-3
- [28] Persons DA, Nienhuis AW. Gene therapy for the hemoglobin disorders: Past, present and future. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(10): 5022-4