

血友病A基因治疗的研究进展

李晓兰 张健萍 张磊 程涛 张孝兵

Research advances on gene therapy for hemophilia A Li Xiaolan, Zhang Jianping, Zhang Lei, Cheng Tao, Zhang Xiaobing

Corresponding author: Zhang Xiaobing, State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, CAMS & PUMC, Tianjin 300020, China. Email: zhangxbhk@gmail.com

血友病(hemophilia)是凝血因子缺乏导致的一类遗传性出血性疾病,包括血友病A(HA)和血友病B(HB)。HA表现为凝血因子Ⅷ(FⅧ)缺乏,约占全部血友病的80%,是由位于X染色体上的FⅧ(F8)基因突变导致FⅧ缺乏或功能缺陷而引起^[1]。HB表现为凝血因子Ⅸ(FⅨ)缺乏,约占全部血友病患者的20%,由位于X染色体上的FⅨ(F9)基因突变引起。根据患者血浆中FⅧ活性(FⅧ:C),HA分为轻型(FⅧ:C>5%~40%)、中间型(FⅧ:C 1%~5%)和重型(FⅧ:C<1%)。轻型和中间型HA患者症状比较轻微,而重型患者有明显的自发出血倾向,通常并发出血性滑膜炎,有致死风险^[2]。目前,补充外源性FⅧ制剂(替代治疗)是重型HA的主要治疗方法。

HA作为单基因遗传病,治愈的唯一途径是基因疗法。第一代基因治疗是利用非病毒载体或改造过的病毒载体,将正常基因导入患者细胞,以取代或纠正致病基因。针对HA的第一代基因治疗已经在多种小型和大型动物模型中获得成功,然而临床试验尚未达到令人满意的疗效^[3-5]。另外,载体随机整合到基因组后,或将激活致癌基因或失活抑癌基因,增加致癌风险。第二代基因治疗是利用基因编辑技术修复致病基因(原位修复)或在特定位点敲入正常基因(异位敲入)的靶向疗法和(或)基于患者来源的诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS细胞)的个体化疗法,其安全性较第一代基因疗法大大提高。我们综述HA基因治疗在过去20多年取得的主要进展,讨论目前面临的问题以及新技术突破对基因治疗领域带来的机遇。

一、第一代基因治疗

第一代基因治疗常用的病毒载体有重组腺相关病毒载

体(recombinant adeno-associated viral, rAAV)、逆转录病毒载体(retrovirus, RV)和慢病毒载体(lentivirus, LV)等。

(一)rAAV

rAAV由三种衣壳蛋白(VP1、VP2和VP3)和编码目的基因的单链DNA组成,进入靶细胞后单链DNA转变成双链DNA,以游离形式稳定存在于细胞中。

在早期的HB基因治疗的研究中,通过直接肌肉注射将携带人F9基因的rAAV导入肌细胞的策略在小鼠和狗模型中获得成功^[6-7],但在临床试验中,FIX的表达却未达到治疗水平^[8]。目前这一策略已被基本淘汰。后来,人们构建了肝细胞特异性增强子/启动子驱动表达的rAAV-F9基因载体,实现FIX在肝细胞中的特异性表达,通过肝动脉、门静脉或静脉注射治愈了HB鼠、狗和灵长类动物^[9-11],为临床试验奠定了基础。2010年,Nathwani等^[12]采用免疫原性较低的rAAV8携带密码子优化的F9基因,在6例没有抑制物产生病史的HB患者中进行基因治疗,所有患者FIX的表达均达到治疗水平,且持续时间长达3年。这是目前为止临床试验中首次采用基因治疗成功治愈血友病的案例。

rAAV可携带4.5 kb左右的DNA序列,而F8基因cDNA全长为9 kb,B结构域缺失(BDD)-F8 cDNA为4.4 kb,加上启动子等表达调控元件后,超过rAAV的载荷极限,包装效率非常低,因而限制了rAAV在HA基因治疗中的应用。

(二)LV

LV是通过改造人类免疫缺陷病毒-1(HIV-1)构建而成,包装极限为10 kb左右,可转导分裂细胞和非分裂细胞。经三代改造后,LV的安全性已经大大提高;虽然整合到基因组中仍有插入突变的风险,但已有研究表明它倾向整合到良性位点^[13]。因此,近年来人们试图利用这种载体将F8基因导入表皮细胞、造血干细胞(HSC)等来治疗HA。

1. 利用内皮细胞表达FⅧ:新近研究报道,内皮细胞是表达FⅧ的主要、甚至是唯一部位^[14]。因此,在内皮细胞中过表达FⅧ可能与生理过程最为接近。内皮细胞的最佳来源是外周血源内皮细胞(blood outgrowth endothelial cell, BOEC),这是一类在骨髓中产生然后进入外周循环的血管内皮祖细胞,表达CD31和CD34,可迁移到缺血部位并分化为血管内皮细胞,促进新血管生成^[15]。

Matsui等^[16]首先使用BOEC研究HA基因疗法。他们从外周血分离出BOEC,基因改造和扩增后,移植到小鼠皮下。移植当天和移植后4周内给予环磷酰胺抑制HA小鼠免疫反应,以控制抑制性抗体的产生。转基因BOEC分泌的FⅧ达到了治疗水平,但仅持续了27周,随着BOEC逐渐死亡或被机体清除,FⅧ降低到治疗前水平。为了提高移植后

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.07.022

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973)项目(2015CB964902);国家自然科学基金创新研究群体(81421002);协和青年科研基金(33320140065)

作者单位:300020 天津,中国医学科学院、北京协和医学院血液病医院(血液学研究所);实验血液学国家重点实验室

通信作者:张孝兵,Email: zhangxbhk@gmail.com

BOEC 的存活率, Tatsumi 等采用细胞层片技术 (cell-sheet technology) 在培养皿中培养单层 BOEC, 然后直接将单层 BOEC 移植到小鼠皮下。移植前短暂的免疫抑制处理有效控制了抑制物的产生。BOEC 在小鼠皮下形成了血管组织, FVIII 持续高水平表达 300 d 以上^[17]。这些结果表明, 靶向内皮细胞的策略可以使 FVIII 持续高水平表达。但是, 在 HA 狗的试验中, 免疫抑制剂未能有效控制抑制物的产生, HA 狗对异源性 FVIII 产生了广泛的免疫反应^[18]。因此, 在大型动物和人中如何有效控制免疫反应是该策略所面临的巨大挑战。

2. HSC/巨核细胞异位表达 FVIII: 近 30% 的 HA 患者在长期输注 FVIII 后会产生抑制物^[19]。虽然通过免疫调控方法可以适当控制抑制物, 但尚未完善, 而且治疗费用昂贵。

近年来, Wilcox 等开创了一种新的治疗方法: 利用 HSC 基因治疗方法, 使 FVIII 在巨核细胞和血小板中异位表达。他们通过一系列体外实验表明, 异源性 FVIII 可在巨核细胞系中表达和储存, 并且只有激动剂刺激后, FVIII 才能释放^[20-21]。这一结果后来在 HA 小鼠体内实验中得到证实: 血浆中 FVIII 处于低水平, 而血小板 FVIII 处于高水平, 血小板在损伤部位活化后释放储存于 α 颗粒中的 FVIII, 使小鼠在实验性表皮出血试验中存活^[22]。更重要的是, 即使 HA 小鼠存在高滴度抑制物, 在血小板异位表达的 FVIII 也可使 HA 小鼠在剪尾试验中存活下来^[23-24]。随后他们将导入 F8 基因的人 HSC (F8-HSC) 移植给免疫缺陷的 HA 小鼠, 发现人源血小板比例大于 2% 的小鼠在剪尾试验中全部存活^[25]。这些结果表明, 不论有无抑制物, 在巨核细胞中异位表达 FVIII 可以有效地治疗 HA。小鼠实验的成功促使人们进一步利用 HA 狗模型测试这一策略。首先动员 HSC 至外周血, 采集外周血分离出 HSC, 利用慢病毒载体将 BDD-hF8 基因导入 HSC 并重新移植给 HA 狗, 3 只 HA 狗中有 2 只获得了良好的治疗效果, 所有 HA 狗都没有对表达的人源 FVIII 产生抑制物^[26]。这项试验的成功提示该策略具有临床可行性。然而, 移植 HSC 之前患者需要接受化疗以抑制骨髓中正常 HSC, 使移植的转基因 HSC 能够顺利归巢到骨髓中。由于目前替代治疗已经可以有效地控制血友病症状, 而移植前预处理方案的不良反应使该方法难以通过监管部门的审批和患者接受。

综上所述, 血友病的第一代基因治疗方案在动物实验和临床前试验中取得了积极的进展。但是, 基于 rAAV 等非整合型载体的治疗方案的长期疗效有待进一步观察。使用整合型载体可以确保转基因的长期表达, 但慢病毒等整合型载体将目的基因相对随机地插入到基因组中, 有可能激活原癌基因或关闭抑癌基因的表达而引起癌变, 因此具有很大的安全隐患^[27]。随着基因编辑技术和 iPS 细胞技术的发展, 个体化、靶向性基因治疗将成为治疗遗传性疾病新的强大工具, 可望大大提高基因治疗的安全性和有效性。

二、第二代基因治疗

第二代基因治疗是利用靶向性 DNA 内切酶修复致病基因或在指定位点敲入正常基因的靶向疗法和(或)利用患者来源的 iPS 细胞的个体化疗法。基因编辑技术包括传统同

源重组技术、锌指核酸酶 (ZFN)、转录激活因子样效应蛋白核酸酶 (TALEN) 和 II 型常回文重复序列从集及相关蛋白系统 (CRISPR-Cas9)。iPS 细胞可由患者外周血单个核细胞 (PBMC) 重编程而来, 在经过基因编辑以后, 可定向分化成 HSC、内皮细胞和肝细胞等用于治疗血友病。

(一) 基因编辑技术

基因编辑技术始于二十世纪七十年代的 DNA 同源重组技术, 原理是将模板导入细胞中, 在内源性同源重组机制的作用下将目的 DNA 序列整合到指定位点。然而同源重组主要发生在 G₂ 期, 因此只适用于分裂期细胞。另外, 内源性同源重组效率低下, 耗时耗力。但是, 如果能够在 DNA 靶点制造双链 DNA 断裂, 同源重组效率会增加 1 000 倍以上。因此, 人们一直在寻找一种能够特异性地切断指定 DNA 片段的方法。近些年, 相继出现的 ZFN、TALEN 和 CRISPR-Cas9 技术, 给这一领域带来了革命性的发展^[28]。前两种技术通过设计和组装可识别 3 个或 1 个 DNA 碱基的多肽功能结构域来靶向特定位点, 然后利用结合的非特异性核酸内切酶 (如 FokI) 对识别位点进行切割, 而 CRISPR-Cas9 技术利用一条短的向导 RNA (sgRNA, 约 20 bp) 识别 DNA 位点, 利用 Cas9 蛋白对 DNA 位点进行切割, 最终造成特定位点 DNA 双链断裂。然而, ZFN 和 TALEN 技术的设计和组装复杂, 费用高昂, 限制了其应用, 简单高效的 CRISPR-Cas9 技术已经引起人们的强烈关注。当用上述方法使 DNA 双链断裂后, 细胞启动自身修复机制对 DNA 断裂部位进行修复。在没有模板的情况下, 细胞通过非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ) 途径修复 DNA 双链断裂, 可能引起移码突变, 导致基因敲除。在有模板的情况下, 细胞启动同源重组 (homologous recombination, HR) 修复, 可将外源模板上的目的基因插入至切割位点, 从而将目的基因定点敲入基因组。

CRISPR-Cas9 技术经过一系列改良, 敲入效率不断提高。Li 等^[29]通过提高转染效率、富集转染细胞、在目的基因下游整合筛选基因和优化模板设计, 在小鼠 ES 细胞系中敲除效率提高到 30%~60%, 敲入效率达 4%, 为 CRISPR-Cas9 系统在 iPS 细胞中的应用奠定了基础。进一步优化载体设计, 比如在敲入模板两端插入 sgRNA 识别位点, 细胞转染质粒后环状 DNA 被线性化, 在未选择的 CHO 细胞中敲入效率提高到 6%^[30]。利用类似方法, Byrne 等^[31]发现在人 iPS 细胞中敲入效率达到 11%。新近报道还指出, 添加小分子化合物抑制 NHEJ 途径可大大提高敲入效率^[32-33]。

最初的研究发现, sgRNA 可以容忍多达 5 个的错配, 可引起与靶向效率相当的脱靶率, 因此其安全性受到质疑^[34]。然而最近的全基因组测序结果表明, 在人多能干细胞系中 CRISPR-Cas9 引起的脱靶非常罕见^[35]。Fu 等^[36]研究发现, 当把 sgRNA 序列从 20 bp 降低为 17 或 18 bp 时, 脱靶率降低数千倍。这一系列的研究表明, CRISPR-Cas9 在未来的基因编辑等精准医学方面有广阔的应用前景。

利用基因编辑技术, 既可以在原位修复致病基因, 也可以将目的基因敲入指定位点, 异位表达目的基因。原位修复

致病基因的优点是利用了该基因天然的表达调控系统;F9基因变异多为点突变,原位修复点突变的效率可能较高。Li等^[37]将人F9突变型(hF9mut, Y155stop)敲入小鼠ROSA26基因位点,然后与小鼠F9基因(mF9)的HB小鼠杂交,构建了既不表达hFIX、也不表达mFIX的F9mut/HB小鼠模型,随后在该模型中测试ZFN技术是否能原位修复hF9mut。他们将靶向hF9mut的ZFN和模板(F9:外显子2~8)包装到AAV8载体中,通过腹腔注射植入2d龄小鼠。4周后小鼠hFIX的表达水平稳定在正常水平的3%~7%,即使切除部分肝脏后,其表达水平依然稳定。肝组织PCR鉴定表明,目的片段敲入到了指定位点。然而,原位修复有一些缺陷:①由于现在的基因编辑技术的敲入效率仍然较低,在原有表达调控序列的调控下,FVIII/FIX可能达不到治疗水平;②原位修复需要针对致病基因的不同突变位点来设计不同的载体,不利于标准化,也增加了成本;③大多数HA患者是由1~22外显子上的染色体倒位和移位所致,原位修复的模板较大将进一步降低敲入效率。

相较于原位修复,异位敲入目的基因不需要了解致病基因的变异情况,可选择表达水平高的基因位点,利用该基因的调控元件来提高目的基因的表达水平,使表达量提高数倍至数百倍。在血友病的治疗中,血清白蛋白(ALB)基因是一个有巨大应用价值的位点,因为ALB基因是肝细胞中表达量最高的基因。新近的报道证实了这一点。Barzel等^[38]利用rAAV载体将F9基因感染到肝细胞中,成功将F9基因敲入小鼠Alb位点。虽然定量PCR测定F9基因的敲入率只有0.5%,FIX的表达量达到了血浆正常水平的7%~20%,小鼠的凝血能力恢复正常。此外还发现,利用自发断裂多肽2A结构敲入的F9基因并不影响白蛋白的表达。另外,由于该策

略没有使用外源性启动子,因此排除了外源启动子激活原癌基因的风险。

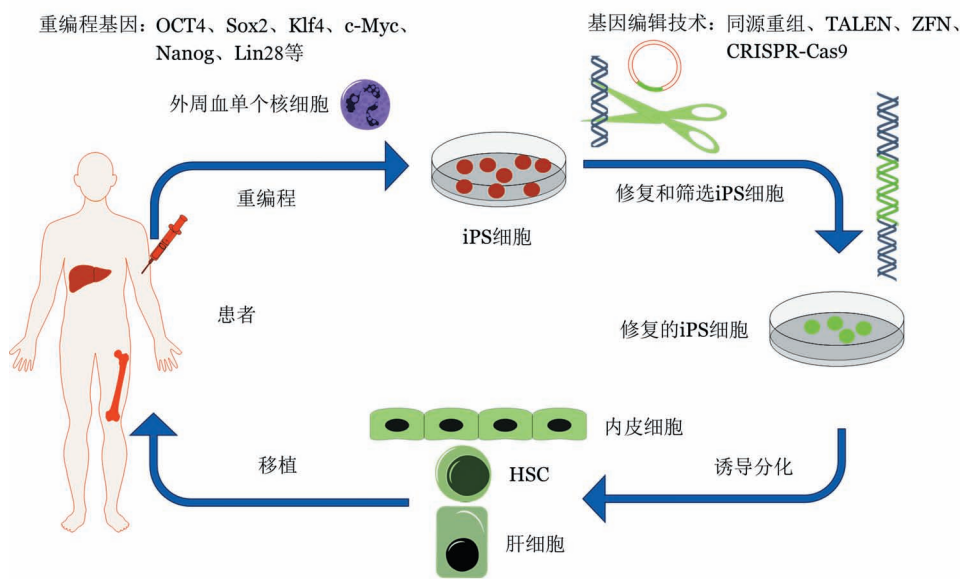
(二)iPS细胞

多能干细胞(胚胎干细胞和iPS细胞)可以在体外实现无限传代培养,理论上可提供足够的细胞进行治疗,同时可以分化为各种人体细胞,因此基于多能干细胞的治疗方案一直受到人们关注。

iPS细胞是利用病毒载体将4个转录因子(Oct4、Sox2、Klf4和Myc)转入分化的体细胞中,使其重编程而得到的类似胚胎干细胞(ESC)的一种细胞类型^[39]。iPS细胞来源于患者自身,不会产生免疫反应,为基因治疗提供了新的干细胞来源^[40]。然而病毒诱导的iPS细胞具有插入突变、重编程基因再表达等潜在的问题。通过改良方法学,利用瞬转、非病毒载体、蛋白质转染、RNA转染等策略,iPS细胞的安全性已经大大提高^[41]。此外,可诱导成iPS细胞的成体细胞来源非常广泛,包括皮肤细胞、尿液源肾上皮细胞和PBMNC等;其中,利用PBMNC诱导iPS细胞具有明显的优势:PBMNC累积突变少、来源丰富、容易获得、能够确保样本无菌,其微创性也使患者容易接受^[42-43]。

iPS细胞个体化基因疗法的策略(图1):第一步:抽取患者外周血并分离出PBMNC,导入重编程基因后诱导为iPS细胞,并在体外培养和扩增;第二步:利用基因编辑技术修复致病基因或将目的基因敲入指定位点,并筛选出已修复的iPS细胞;第三步:将已修复的iPS细胞诱导分化为HSC、内皮细胞或肝细胞,检测分化细胞表型和目的基因表达;第四步:将分化细胞移植到患者体内,用于治疗血友病等单基因遗传性疾病。

Park等^[44]利用一对TALEN使F8基因上一段长140bp



TALEN:转录激活因子样效应蛋白核酸酶;ZFN:锌指核酸酶;CRISPR-Cas9:II型常回文重复序列丛集及相关蛋白系统;iPS细胞:诱导多能干细胞;HSC:造血干细胞

图1 第二代血友病基因治疗示意图

的片段倒置而产生 HA-iPS 细胞系,随后又利用同一对 TALEN 使异位的染色体恢复正常。另一种策略是将 F8 基因插入 A1b 位点、AAVS1 安全岛位点(又名 PPP1R2C 位点)等指定位点。AAVS1 位点位于人类第 19 号染色体上,该位点是一个开放的染色体结构,能保证转基因片段的高水平表达,最重要的是,在该位点插入外源基因片段对细胞无已知的副作用,是一个经过验证的“安全港”位点^[45]。

体外修复 iPS 细胞的致病基因后,可将其诱导分化为 HSC(巨核细胞和血小板的前体细胞)、内皮细胞和肝细胞,然后植入患者体内。Yakura 等^[46]利用可以稳定游离存在和携带大片段的人工染色体 HAC 载体,将 PF4(血小板因子 4)-F8 表达元件导入 HA 小鼠来源的 iPS 细胞系中。当 iPS 细胞分化为巨核细胞/血小板后,可在 PF4 启动子的驱动下合成 FVIII。修复的 iPS 细胞也可诱导分化为在体外可以分泌 FVIII 的内皮祖细胞和成熟的内皮细胞,将内皮祖细胞植入 HA 小鼠后,HA 小鼠在剪尾试验中存活下来,其 FVIII 表达水平在 3 个月内达到正常水平的 8%~12%^[47]。另外,iPS 细胞还可以向肝细胞诱导分化^[48],将肝细胞移植给患者可达到治疗目的。

综上所述,第二代基因疗法的靶向性和个体化大大提高了治疗的安全性,是未来基因疗法的趋势。然而,在治疗中,需要对 iPS 细胞的生产进行严格的质量控制;将 iPS 细胞诱导分化后需严格评估其干性是否完全消失,以避免畸胎瘤的产生。目前,这种个体化的基因疗法十分昂贵。因此,仍然有必要探索新的治疗方法。

三、利用 Cas9-sgRNA 和 FVIII 的裸 DNA 快速高压注射实现在肝细胞中定点异位表达 FVIII

CRISPR-Cas9 技术应用于基因敲入只有 2 年多的历史,敲入效率已经超过 10%^[31]。利用 Cas9-sgRNA 定点切割 DNA 以实现基因编辑的方法还处在高速发展之中,随着敲入效率的不断提高,可望直接修复原代细胞或实现体内基因敲入,而不需要通过 iPS 细胞途径。

作为一种非病毒载体,直接使用裸 DNA 的优点是:结构简单、易于构建和生产;可以反复注射而不会刺激机体产生抗体。目前,裸核酸直接注射作为一种研究方法已被越来越多地用于小鼠、狗、猪和灵长类动物实验中,也被用于杜氏肌营养不良等临床试验中^[49]。

如前所述,在血友病的治疗中,肝细胞是一个非常重要的靶细胞,而利用裸 DNA 直接注射的方式可以快速简便地将 F9 或 F8 基因载体导入肝细胞中。在小鼠和大鼠模型中,尾静脉高压注射可高效地将目的基因导入肝细胞且对肝脏的损伤较小^[50],从而实现体内肝细胞的基因修饰。Xue 等^[51]将 Cas9 质粒和靶向抑癌基因 Pten 和 p53 的 sgRNA 质粒通过尾静脉高压注射导入肝细胞后,成功敲除了 Pten 和 p53 基因而诱发了肝癌。Yin 等^[52]也利用这种方法将靶向 Fah 基因的 Cas9-sgRNA 和 DNA 模板注射给络氨酸血症小鼠,纠正了肝细胞中的 Fah 突变,从而治愈了小鼠。在大型动物中,裸 DNA 高压注射也可成功转染肝细胞。Yoshino 等^[53]等优化

了在猪模型中快速高压注射的方法:以 5 ml/s 的速度将 150 ml 含有 3 mg DNA 的缓冲液通过导管注射到肝脏的某一选定区域,不仅提高了基因转染效率,也降低了肝损伤。

四、结语

过去二十年的临床前试验和临床试验对血友病的基因治疗策略进行了不断扩展和改进,HB 基因治疗已在临床试验获得了成功。虽然 HA 尚未在临床试验中达到理想的治疗效果,但在动物实验中积累的知识和经验表明,基因疗法治愈 HA 的目标是可以实现的。然而,现有的每种策略都有瓶颈问题亟待解决:第一,如何实现 FVIII 的长期稳定表达;第二,如何有效避免机体对 FVIII 产物产生抑制物;第三,如何避免病毒载体潜在的副作用。近年来 iPS 细胞和 CRISPR-Cas9 基因编辑技术取得了突破性进展,为血友病基因治疗开辟了新的研究方向。我们预计,HA 等单基因病的安全高效的基因治疗方案在未来的 10 年内有望研发成功。

参考文献

- [1] Bolton-Maggs PH, Pasi KJ. Haemophilias A and B [J]. Lancet, 2003, 361(9371):1801-1809.
- [2] 中华医学会血液学分会,中国血友病协作组.血友病诊断与治疗中国专家共识(2013年版)[J].中华血液学杂志,2013,34(5):461-463.
- [3] Roth DA, Tawa NE Jr, O'Brien JM, et al. Nonviral transfer of the gene encoding coagulation factor VIII in patients with severe hemophilia A [J]. N Engl J Med, 2001, 344(23):1735-1742.
- [4] Powell JS, Ragni MV, White GC 2nd, et al. Phase 1 trial of FVIII gene transfer for severe hemophilia A using a retroviral construct administered by peripheral intravenous infusion [J]. Blood, 2003, 102(6):2038-2045.
- [5] Aiuti A, Bachoud-Lévi AC, Blesch A, et al. Progress and prospects: gene therapy clinical trials (part 2) [J]. Gene Ther, 2007, 14(22):1555-1563.
- [6] Herzog RW, Hagstrom JN, Kung SH, et al. Stable gene transfer and expression of human blood coagulation factor IX after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(11):5804-5809.
- [7] Herzog RW, Yang EY, Couto LB, et al. Long-term correction of canine hemophilia B by gene transfer of blood coagulation factor IX mediated by adeno-associated viral vector [J]. Nat Med, 1999, 5(1):56-63.
- [8] Kay MA, Manno CS, Ragni MV, et al. Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector [J]. Nat Genet, 2000, 24(3):257-261.
- [9] Wang L, Takabe K, Bidlingmaier SM, et al. Sustained correction of bleeding disorder in hemophilia B mice by gene therapy [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(7):3906-3910.
- [10] Wang L, Nichols TC, Read MS, et al. Sustained expression of therapeutic level of factor IX in hemophilia B dogs by AAV-mediated gene therapy in liver [J]. Mol Ther, 2000, 1(2):154-

- 158.
- [11] Nathwani AC, Davidoff AM, Hanawa H, et al. Sustained high-level expression of human factor IX (hFIX) after liver-targeted delivery of recombinant adeno-associated virus encoding the hFIX gene in rhesus macaques[J]. *Blood*, 2002, 100(5): 1662-1669.
- [12] Nathwani AC, Tuddenham EG, Rangarajan S, et al. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B [J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(25): 2357-2365.
- [13] Naldini L, Blomer U, Gallay P, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector [J]. *Science*, 1996, 272(5259): 263-267.
- [14] Shahani T, Covens K, Lavend'homme R, et al. Human liver sinusoidal endothelial cells but not hepatocytes contain factor VIII [J]. *J Thromb Haemost*, 2014, 12(1): 36-42.
- [15] Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, et al. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood [J]. *J Clin Invest*, 2000, 105(1):71-77.
- [16] Matsui H, Shibata M, Brown B, et al. Ex vivo gene therapy for hemophilia A that enhances safe delivery and sustained in vivo factor VIII expression from lentivirally engineered endothelial progenitors[J]. *Stem Cells*, 2007, 25(10): 2660-2669.
- [17] Tatsumi K, Sugimoto M, Lillicrap D, et al. A novel cell-sheet technology that achieves durable factor VIII delivery in a mouse model of hemophilia A[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e83280.
- [18] Ozelo MC, Vidal B, Brown C, et al. Omental implantation of BOECs in hemophilia dogs results in circulating F VIII antigen and a complex immune response [J]. *Blood*, 2014, 123(26): 4045-4053.
- [19] Pratt KP. Inhibitory antibodies in hemophilia A [J]. *Curr Opin Hematol*, 2012, 19(5): 399-405.
- [20] Wilcox DA, Shi Q, Nurden P, et al. Induction of megakaryocytes to synthesize and store a releasable pool of human factor VIII [J]. *J Thromb Haemost*, 2003, 1(12):2477-2489.
- [21] Shi Q, Wilcox DA, Fahs SA, et al. Expression of human factor VIII under control of the platelet-specific alphaIIb promoter in megakaryocytic cell line as well as storage together with VWF [J]. *Mol Genet Metab*, 2003, 79(1):25-33.
- [22] Yarovoi HV, Kuftrin D, Eslin DE, et al. Factor VIII ectopically expressed in platelets: efficacy in hemophilia A treatment [J]. *Blood*, 2003, 102(12): 4006-4013.
- [23] Shi Q, Wilcox DA, Fahs SA, et al. Factor VIII ectopically targeted to platelets is therapeutic in hemophilia A with high-titer inhibitory antibodies[J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(7):1974-1982.
- [24] Shi Q, Fahs SA, Wilcox DA, et al. Syngeneic transplantation of hematopoietic stem cells that are genetically modified to express factor VIII in platelets restores hemostasis to hemophilia A mice with preexisting F VIII immunity [J]. *Blood*, 2008, 112(7): 2713-2721.
- [25] Shi Q, Kuether EL, Chen Y, et al. Platelet gene therapy corrects the hemophilic phenotype in immunocompromised hemophilia A mice transplanted with genetically manipulated human cord blood stem cells[J]. *Blood*, 2014, 123(3):395-403.
- [26] Du LM, Nurden P, Nurden AT, et al. Platelet-targeted gene therapy with human factor VIII establishes haemostasis in dogs with haemophilia A [J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 2773.
- [27] Howe SJ, Mansour MR, Schwarzwaelder K, et al. Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(9):3143-3150.
- [28] Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering [J]. *Trends Biotechnol*, 2013, 31(7):397-405.
- [29] Li K, Wang G, Andersen T, et al. Optimization of genome engineering approaches with the CRISPR/Cas9 system [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8):e105779.
- [30] Cristea S, Freyvert Y, Santiago Y, et al. In vivo cleavage of transgene donors promotes nuclease-mediated targeted integration [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2013, 110(3):871-880.
- [31] Byrne SM, Ortiz L, Mali P, et al. Multi-kilobase homozygous targeted gene replacement in human induced pluripotent stem cells [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(3):e21.
- [32] Chu VT, Weber T, Wefers B, et al. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(5):543-548.
- [33] Maruyama T, Dougan SK, Truttmann MC, et al. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining [J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(5):538-542.
- [34] Fu Y, 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.
- [35] Veres A, Gosis BS, Ding Q, et al. Low incidence of off-target mutations in individual CRISPR-Cas9 and TALEN targeted human stem cell clones detected by whole-genome sequencing [J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(1):27-30.
- [36] 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.
- [37] Li H, Haurigot V, Doyon Y, et al. In vivo genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia [J]. *Nature*, 2011, 475(7355): 217-221.
- [38] Barzel A, Paulk NK, Shi Y, et al. Promoterless gene targeting without nucleases ameliorates haemophilia B in mice [J]. *Nature*, 2015, 517(7534): 360-364.
- [39] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. *Cell*, 2006, 126(4): 663-676.
- [40] Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, Yamada S, et al. Induced pluripotent stem cells: advances to applications [J]. *Stem Cells Cloning*, 2010, 3:29-37.
- [41] Hu K. All roads lead to induced pluripotent stem cells: the technologies of iPSC generation [J]. *Stem Cells Dev*, 2014, 23

- (12):1285-1300.
- [42] Zhang XB. Cellular reprogramming of human peripheral blood cells [J]. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2013, 11 (5): 264-274.
- [43] Su RJ, Neises A, Zhang XB. Generation of iPS cells from human peripheral blood mononuclear cells using episomal vectors [J]. Methods Mol Biol, 2014. DOI:10.1007/7651_2014_139.
- [44] Park CY, Kim J, Kweon J, et al. Targeted inversion and reversion of the blood coagulation factor 8 gene in human iPS cells using TALENs [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111 (25):9253-9258.
- [45] Luo Y, Liu C, Cerbini T, et al. Stable enhanced green fluorescent protein expression after differentiation and transplantation of reporter human induced pluripotent stem cells generated by AAVS1 transcription activator-like effector nucleases [J]. Stem Cells Transl Med, 2014, 3(7):821-835.
- [46] Yakura Y, Ishihara C, Kurosaki H, et al. An induced pluripotent stem cell-mediated and integration-free factor VIII expression system [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 431 (2):336-341.
- [47] Xu D, Alipio Z, Fink LM, et al. Phenotypic correction of murine hemophilia A using an iPS cell-based therapy [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(3):808-813.
- [48] Sauer V, Roy-Chowdhury N, Guha C, et al. Induced pluripotent stem cells as a source of hepatocytes [J]. Curr Pathobiol Rep, 2014, 2(1):11-20.
- [49] Wolff JA, Budker V. The mechanism of naked DNA uptake and expression [J]. Adv Genet, 2005, 54:3-20.
- [50] Zhou T, Kamimura K, Zhang G, et al. Intracellular gene transfer in rats by tail vein injection of plasmid DNA [J]. AAPS J, 2010, 12(4):692-698.
- [51] Xue W, Chen S, Yin H, et al. CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver [J]. Nature, 2014, 514 (7522): 380-384.
- [52] Yin H, Xue W, Chen S, et al. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype [J]. Nat Biotechnol, 2014, 32(6):551-553.
- [53] Yoshino H, Hashizume K, Kobayashi E. Naked plasmid DNA transfer to the porcine liver using rapid injection with large volume [J]. Gene Ther, 2006, 13(24):1696-1702.

(收稿日期:2015-04-30)

(本文编辑:徐茂强)

·读者·作者·编者·

2015 年本刊可直接用英文缩写的常用词汇

磷酸盐缓冲液 PBS

胎牛血清 FBS

血红蛋白 HGB

白细胞计数 WBC

血小板计数 PLT

核因子- κ B NF- κ B

聚合酶链反应 PCR

逆转录-聚合酶链反应 RT-PCR

酶联免疫吸附实验 ELISA

动脉血氧分压 PaO₂动脉血二氧化碳分压 PaCO₂

辅助性 T 淋巴细胞 Th

丙氨酸转氨酶 ALT

天冬氨酸转氨酶 AST

谷氨酰转氨酶 GGT

碱性磷酸酶 ALP

乳酸脱氢酶 LDH

凝血酶原时间 PT

部分激活的凝血活酶时间 APTT

EB 病毒 EBV

巨细胞病毒 CMV

乙型肝炎病毒 HBV

丙型肝炎病毒 HCV

人类免疫缺陷病毒 HIV

自然杀伤细胞 NK 细胞

白细胞介素 IL

干扰素 IFN

肿瘤坏死因子 TNF

红细胞生成素 EPO

血小板生成素 TPO

干细胞生长因子 SCF

粒细胞集落刺激因子 G-CSF

粒-巨噬细胞集落刺激因子 GM-CSF

巨噬细胞集落刺激因子 M-CSF

链霉素抗生素蛋白-过氧化物酶 S-P

粒-巨噬细胞集落形成单位 CFU-GM

细胞毒性 T 淋巴细胞 CTL

佛波醇酯 TPA

噻唑蓝实验 MTT 实验

弥漫性血管内凝血 DIC

磁共振成像 MRI

正电子发射断层扫描 PET

乙二胺四乙酸 EDTA

十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳

SDS-PAGE

二甲基亚砜 DMSO

荧光原位杂交 FISH

美国国家综合癌症网络 NCCN

本刊编辑部