

# siRNA 对血红蛋白 H 病红系细胞 β 珠蛋白的调控作用

程海灵 刘容容

广西医科大学第一附属医院血液科, 南宁 530021

通信作者: 刘容容, Email: rong2liu@hotmail.com

**【摘要】** 目的 研究靶向 siRNA 对外定向分化培养的红系细胞 β-珠蛋白的调控作用, 为血红蛋白 H (Hemoglobin H, HbH) 病的基因治疗提供新的理论支持。方法 ①根据 β-珠蛋白基因表达结果, 在红系细胞中筛选出最佳 siRNA 序列及其有效作用剂量, 检测有效剂量的最佳 siRNA 对红系细胞 β-珠蛋白表达的调控和细胞凋亡的影响。②将有效剂量的最佳 siRNA 作用于 HbH 病红系细胞, 检测转染后细胞 β-珠蛋白表达、活性氧 (ROS) 和细胞凋亡率, 综合评估转染 siRNA 对 HbH 病红系细胞的影响。结果 ①siRNA<sub>2</sub> 可在转染后 96 h 内显著下调体外培养的红系细胞 β-珠蛋白的表达, 但对 α-珠蛋白无明显调控作用。siRNA<sub>2</sub> 的沉默效应和效应持续时间均与作用剂量有关。②siRNA<sub>2</sub> 可下调 HbH 病红系细胞 β-珠蛋白表达, 减少细胞内 ROS 生成, 并减少细胞凋亡率。结论 靶向性 siRNA 可下调 HbH 病红系细胞 β-珠蛋白表达, 减少细胞内 ROS 产生, 下调细胞凋亡率。

**【关键词】** 地中海贫血; 血红蛋白 H 病; β-珠蛋白; siRNA

**基金项目:** 国家自然科学基金 (81460025、81700712)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2021.12.009

## Regulation effect of siRNA on β-globin in erythrocytes of hemoglobin H disease

Cheng Hailing, Liu Rongrong

Department of Hematology, The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

Corresponding author: Liu Rongrong, Email: rong2liu@hotmail.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the regulatory effect of targeted siRNA on β-globin in erythroid cells cultured by targeted differentiation in vitro and provide new theoretical support for gene therapy for hemoglobin H (HbH) disease. **Methods** Based on the β-globin gene expression results, the optimal siRNA sequence and its effective action dose were screened in erythroid cells, and the effect of the effective dose of the optimal siRNA on the regulation of β-globin expression and apoptosis in erythroid cells was examined. The effective dose of the optimal siRNA was applied to erythroid cells with HbH disease. The effects of transfected siRNAs on red line cells with HbH disease were comprehensively evaluated by measuring the expression of β-globin, reactive oxygen species (ROS), and apoptosis rates. **Results** Within 96 hours after transfection, siRNA<sub>2</sub> significantly downregulated β-globin expression in vitro cultured erythroid cells, but not α-globin. siRNA silencing effect and duration of effect were dose-dependent. siRNA<sub>2</sub> downregulated β-globin expression, reduced intracellular ROS production, and decreased apoptosis rate in erythroid cells with HbH disease. **Conclusion** Targeted siRNAs can downregulate β-globin expression, reduce intracellular ROS production, and downregulate apoptosis rate in erythroid cells with HbH disease.

**【Key words】** Thalassemia; Hemoglobin H disease; β-globin; siRNA

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81460025, 81700712)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2021.12.009

血红蛋白 H (Hemoglobin H, HbH) 病是中间型 α-地中海贫血 (地贫), 主要由于 16 号染色体上的 3 个 α-基因发生了缺失或突变, 从而导致 α-珠蛋白合成不足, β-珠蛋白相对过剩, 过剩的 β 链形成

HbH。HbH 性质不稳定, 容易分解为游离 β-肽链, 在红细胞内沉淀聚集形成 H 包涵体, 对细胞膜造成氧化损伤, 改变膜的特性并损害其功能<sup>[1-2]</sup>。已有多个研究显示, 减少 α-珠蛋白的表达有助于改善 β-地贫

患者临床症状,安全、可耐受,可长期获益<sup>[3-5]</sup>。然而,关于减少 $\beta$ -珠蛋白在 $\alpha$ -地贫中的研究目前尚未检索到相关文献。本研究我们探索 siRNA 对 HbH 病红系细胞 $\beta$ -珠蛋白的调控作用,为通过下调 $\beta$ -珠蛋白治疗 HbH 病提供理论基础。

## 材料与方 法

1. 细胞来源与培养:采集健康供者的骨髓液和 HbH 病患者的骨髓液,标本的采集获我院伦理委员会批准[批件号:2021(KY-E-024)],经所有研究对象知情同意并签署知情同意书。经磁珠分选 CD34<sup>+</sup>造血干细胞,在二阶段培养体系中扩增和定向分化,先在含 2  $\mu$ l/ml StemSpan Erythroid Expansion Supplement 及 1% 青霉素-链霉素的 StemSpan SFEM II 培养基中扩增 7 d;后在含 3% 人 AB 血清、3 U/ml EPO 和 1% 青霉素-链霉素的 StemSpan SFEM II 培养基中定向分化。

2. 主要试剂:分选磁珠购于德国 Miltenyi 公司;StemSpan Erythroid Expansion Supplement、StemSpan SFEM II 培养基购于加拿大 Stem cell 公司;人 AB 血清购于美国 Gemini Bio 公司;siRNA 序列由美国 Thermo Fisher 公司设计与合成(表 1),siRNA 阴性对照、siRNA 荧光对照、活性氧(ROS)试剂盒、Annexin V-PI 凋亡检测试剂盒购于美国 Thermo Fisher 公司;电转液与电转杯购于美国 BIO-RAD 公司;RNA 逆转录试剂盒购于日本 Takara 公司;qPCR 试剂盒购于瑞士 Roche 公司;RNA 提取试剂盒购于美国 Axygen 公司; $\beta$ -globin 抗体、GAPDH 抗体购于美国 Cell Signaling 公司。

3. siRNA 电转染:取定向分化培养后细胞(2~3) $\times 10^6$ 个,加入 200  $\mu$ l 电转染液于 0.4 cm 电转杯重悬细胞,设置实验组(分别加入 siRNA<sub>1</sub>、siRNA<sub>2</sub>、siRNA<sub>3</sub>)、空白对照组(不加入 siRNA)、阴性对照组(加入与人类转录序列没有显著相似性的非靶向 siRNA-neg)和用于检测转染率的荧光对照组(加入带荧光标记的非靶向 siRNA-max),根据组别要求加入 siRNA,在 220 V、25 ms 的条件下进行电转染。

4. RT-PCR 检测:收集细胞[每组(2~3) $\times 10^6$ ],提取总 RNA,参照逆转录试剂盒说明书合成 cDNA,在扩增仪进行 RT-PCR,反应条件:94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94  $^{\circ}$ C 变性 45 s,60  $^{\circ}$ C 退火 45 s,72  $^{\circ}$ C 30 s,共 45 个循环,最后 64~95  $^{\circ}$ C 溶解曲线测定,计算 $\alpha$ - $\beta$ -珠蛋白基因相对表达。

5. Western blotting 检测:收集细胞[每组(2~3) $\times 10^6$ ],加入 RIPA 细胞裂解液和 PMSF 提取细胞总蛋白,在梯度浓度为 8%~16%的预制胶上以 140 V 电泳,在 4  $^{\circ}$ C 条件下,180 mA 电泳转膜至 PVDF 膜上,快速封闭液封闭 15 min, $\beta$ -globin 和 GAPDH 一抗封闭过夜,二抗室温下孵育 1 h,在 ChemiDoc<sup>TM</sup> XRS<sup>+</sup>成像系统中成像,用 Image Lab 软件分析条带灰度值。

6. 细胞凋亡检测:收集细胞(每集约 5 $\times 10^5$ )200  $\times$ g 离心 5 min,去除培养基。分别在 PBS 和缓冲液中各洗涤 1 次,用 100  $\mu$ l 缓冲液重悬细胞并加入 5  $\mu$ l Annexin V 试剂,室温下避光孵育 10~15 min,缓冲液中洗涤细胞,200  $\mu$ l 1 $\times$ 缓冲液重悬细胞,加入 5  $\mu$ l 的 PI 试剂。在 4  $^{\circ}$ C 的环境中避光保存与运输,4 h 内在流式细胞仪上进行检测分析细胞凋亡率。

7. ROS 水平检测:收集细胞 200 $\times$ g 离心 5 min,去除培养基。参照说明书配置 ROS 工作液,用 100  $\mu$ l ROS 工作液重悬各组细胞。在含有 5% CO<sub>2</sub> 的 37  $^{\circ}$ C 培养箱中避光孵育 60 min。孵育完毕后,无需洗涤,尽快用流式细胞术分析细胞内 ROS 水平。

8. 统计分析处理:采用 SPSS 23.0 进行统计学分析,多组数据比较采用方差分析,组内两两比较采用 LSD、Dunnett's T3 事后检验,探索不同时间与剂量对基因沉默影响采用多因素方差分析,凋亡与 ROS 分析采用 *t* 检验或者 Mann-Whitney *U* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

表 1 转染 $\alpha$ -地中海贫血患者红系细胞 $\beta$ -珠蛋白基因的 siRNA 设计序列

名称	序列
siRNA <sub>1</sub>	5'-GGGCAAGGTGAACGTGGATGAAGTT-3'
siRNA <sub>2</sub>	5'-GGTCTGTGTGCTGGCCCATCACTTT-3'
siRNA <sub>3</sub>	5'-GGCTAATGCCCTGGCCACAAGTAT-3'

## 结 果

一、调控正常红系细胞 $\beta$ -珠蛋白表达的 siRNA 筛选

1. 筛选调控 $\beta$ -珠蛋白基因表达的有效 siRNA 序列:正常红系细胞电转染 siRNA<sub>2</sub>后 24 h 和 48 h  $\beta$ 珠蛋白基因相对表达量分别为(72 $\pm$ 11)%和(73 $\pm$ 12)%,与空白对照组比较差异均有统计学意义(*P* = 0.008, *P* = 0.020)。siRNA<sub>1</sub>和 siRNA<sub>3</sub>对 $\beta$ -珠蛋白基因表达有也下调作用,但与空白对照组比较差

异均无统计学意义( $P$ 值均 $>0.05$ )。转染后 24 h 和 48 h, 细胞的 $\alpha$ -珠蛋白基因表达水平在各组间差异均无统计学意义( $P$ 值均 $>0.05$ ) (图 1)。本研究选择 siRNA<sub>2</sub> 作为调控 $\beta$ -珠蛋白基因的最佳序列, 进行下一步实验。

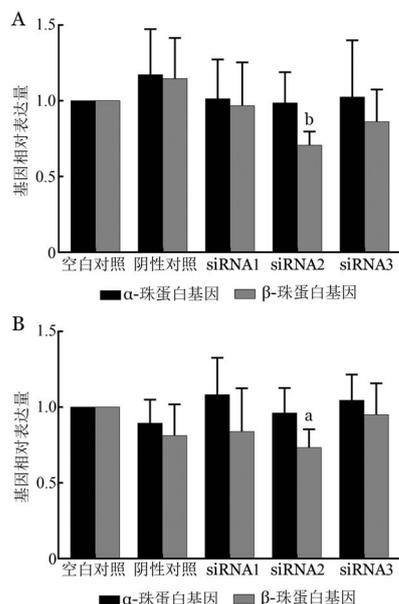


图 1 转染不同 siRNA 后 24 h (A)、48 h (B) 正常红系细胞 $\alpha$ -和 $\beta$ -珠蛋白基因相对表达水平( $^*P < 0.05$ ,  $^bP < 0.01$ )

## 2. 筛选 siRNA<sub>2</sub> 序列的有效作用剂量:

(1) 在基因表达水平上筛选 siRNA<sub>2</sub> 序列的有效作用剂量: 电转染后 24 h, 4 个不同剂量的 siRNA<sub>2</sub> 对正常红系细胞 $\beta$ 珠蛋白基因表达均有显著下调作用 [  $(0.77 \pm 0.16)\%$  ( $P = 0.005$ )、 $(0.64 \pm 0.03)\%$  ( $P < 0.001$ )、 $(0.63 \pm 0.14)\%$  ( $P < 0.001$ )、 $(0.57 \pm 0.05)\%$

( $P < 0.001$ )]; 转染后 48 h, 150 pmol 与 200 pmol 的 siRNA<sub>2</sub> 可显著下调 $\beta$ -珠蛋白基因表达 [  $(0.71 \pm 0.15)\%$  ( $P = 0.012$ )、 $(0.61 \pm 0.18)\%$  ( $P = 0.002$ ) ]。转染后 72 h 和 96 h, 仅有 200 pmol siRNA<sub>2</sub> 可显著下调 $\beta$ -珠蛋白基因表达 [  $(0.78 \pm 0.07)\%$  ( $P = 0.006$ )、 $(0.86 \pm 0.03)\%$  ( $P = 0.020$ ) ]。与空白对照组比较, 以上基因下调差异均有统计学意义。而 $\alpha$ -珠蛋白基因表达水平在各浓度组间差异均无统计学意义( $P$ 值均 $>0.05$ )。综上所述, 转染 48 h 内, 不同浓度的 siRNA<sub>2</sub> 均可下调红系细胞 $\beta$ -珠蛋白基因表达; 转染后 72 h, 仅有 200 pmol 仍维持着沉默效应, 且该效应可持续至 96 h。可见, 高剂量组的沉默效应更显著, 持续时间更长。各剂量组对 $\alpha$ -珠蛋白基因的表达水平均无下调作用(图 2)。

(2) siRNA<sub>2</sub> 调控 $\beta$ -珠蛋白基因表达的时间效应: siRNA<sub>2</sub> 作用剂量与时间对 siRNA<sub>2</sub> 沉默效应均有显著影响( $P$ 值均 $<0.001$ ), 转染后 72 h 和 96 h 的 $\beta$ -珠蛋白基因表达水平均显著高于转染后 24 h 和 48 h ( $P$ 值均 $<0.01$ ), 其他剂量组也显示出相同趋势: 随着转染后时间的延长, siRNA<sub>2</sub> 对 $\beta$ -珠蛋白基因的沉默效应逐渐减弱, 甚至消失(图 3)。

3. 有效剂量的 siRNA<sub>2</sub> 对红系细胞 $\beta$ -珠蛋白表达水平的调控: 在转染后 48、72、96 h, 与阴性对照组和空白对照组相比较, 200 pmol 组的 $\beta$ -珠蛋白表达水平明显下调, 差异均有统计学意义( $P$ 值均 $<0.05$ )。siRNA<sub>2</sub> 对 $\beta$ -珠蛋白的下调效应随时间延长逐渐减弱, 其作用趋势与 $\beta$ -珠蛋白 mRNA 表达一致(图 4)。

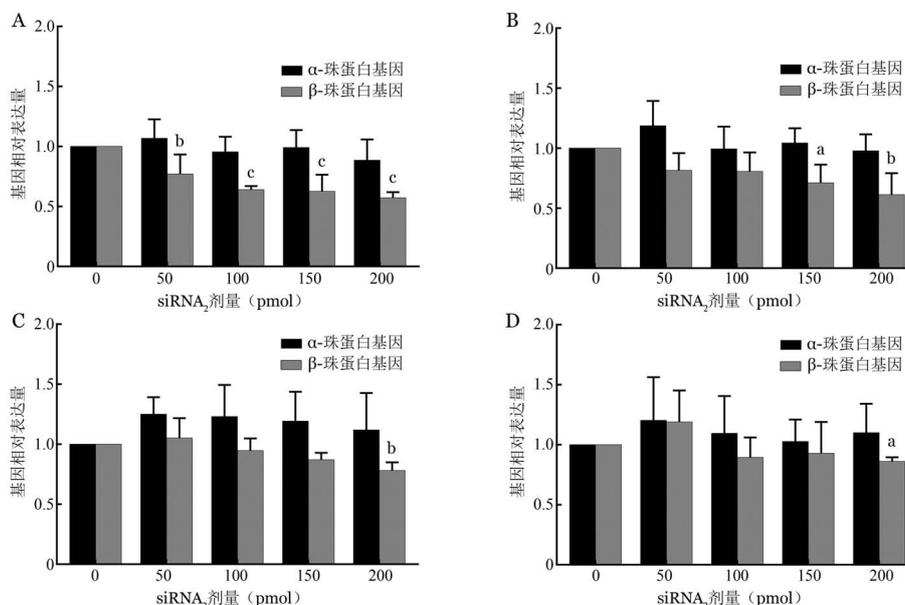


图 2 转染 siRNA<sub>2</sub> 后 24 h (A)、48 h (B)、72 h (C)、96 h (D) 正常红系细胞 $\alpha$ -和 $\beta$ -珠蛋白基因相对表达水平( $^*P < 0.05$ ,  $^bP < 0.01$ ,  $^cP < 0.001$ )

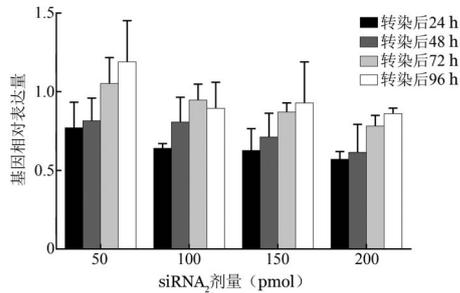
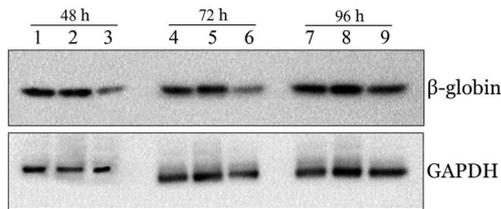


图 3 正常红系细胞电转染不同剂量 siRNA<sub>2</sub> 后不同时间 β-珠蛋白基因相对表达水平



1、4、7: 空白对照组; 2、5、8: 200 pmol siRNA-neg 组 (阴性对照组); 3、6、9: 200 pmol siRNA<sub>2</sub> 组  
图 4 Western blot 检测正常红系细胞转染 siRNA<sub>2</sub> 后不同时间 β-珠蛋白的表达水平

4. 有效剂量的 siRNA<sub>2</sub> 对细胞凋亡率的影响: 与空白对照组比较, 实验组早期凋亡率均呈轻度增高, 差异均无统计学意义 ( $P$  值均  $> 0.05$ ); 而晚期凋亡率均出现轻度下调, 其中转染后的 48 h 与 72 h 凋亡结果, 与空白对照组比较, 差异均有统计学意义 ( $P = 0.039, 0.005$ )。转染后各个时间段细胞的总凋亡率与空白对照组比较差异均无统计学意义 ( $P$  值均  $> 0.05$ ) (图 5)。

## 二、siRNA<sub>2</sub> 对 HbH 病红系细胞的调控

1. siRNA<sub>2</sub> 对 HbH 病患者红系细胞 β-珠蛋白基因表达的调控: 转染 200 pmol siRNA<sub>2</sub> 24、48、72 h 后, β-珠蛋白基因表达显著下调 ( $P = 0.026, 0.049, 0.034$ ), 96 h β-珠蛋白基因表达恢复平衡 (图 6)。

2. siRNA<sub>2</sub> 对 HbH 红系细胞 β-珠蛋白表达的调控: 转染后 48 h, 与空白对照组相比较, 200 pmol

siRNA<sub>2</sub> 组的 β-珠蛋白表达水平明显下调 (图 7), 差异均有统计学意义 ( $P < 0.001$ )。

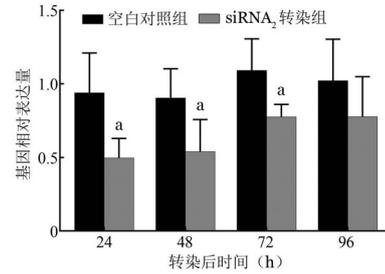


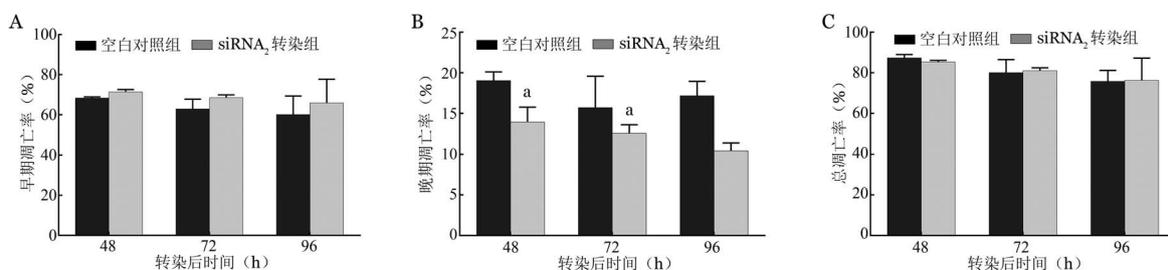
图 6 血红蛋白 H 病红系细胞转染 200 pmol siRNA<sub>2</sub> 后不同时间 β-珠蛋白基因相对表达水平 (\* $P < 0.05$ )

3. siRNA<sub>2</sub> 对红系细胞内 ROS 水平的影响: HbH 病红系细胞内的 ROS 水平明显高于正常红系, 差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ )。正常红系细胞转染 200 pmol siRNA<sub>2</sub> 后细胞内的 ROS 水平高于空白对照, 差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ )。与之相反, HbH 病红系细胞转染 200 pmol siRNA<sub>2</sub> 后细胞内的 ROS 水平低于空白对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ )。

4. siRNA<sub>2</sub> 对 HbH 红系细胞凋亡的影响: 与空白对照比较, 除转染后 48 h 的晚期凋亡率出现增高外, 其余实验组细胞的早期凋亡率、晚期凋亡率、总凋亡率均出现下调, 且转染后 72 h 的早期凋亡率与总凋亡率对比空白对照组差异均有统计学意义 ( $P = 0.021, 0.009$ ) (图 8)。

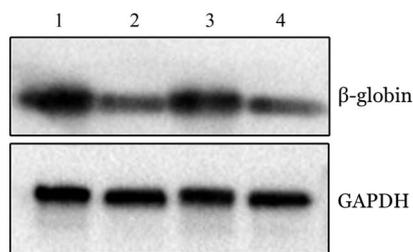
## 讨 论

由于珠蛋白基因缺陷, α-β-珠蛋白链失衡, 相对过剩的珠蛋白链沉积于红细胞内, 氧化损伤细胞膜和细胞器, 阻滞红系成熟并诱导红细胞凋亡<sup>[6-8]</sup>, 这与地贫的溶血和无效红细胞生成有关<sup>[9-10]</sup>, 减少过剩的 β-珠蛋白合成是治疗 HbH 病溶血的关键。通过 RNAi 方式减少 β-地贫过剩的 α-珠蛋白, 改善贫血状况的设想已在动物模型中获得验证 (表现为 HGB 升



A: 早期凋亡率; B: 晚期凋亡率; C: 总凋亡率

图 5 正常红系细胞转染后转染 200 pmol siRNA<sub>2</sub> 后不同时间细胞凋亡率 (\* $P < 0.05$ )

1, 3: 空白对照组; 2, 4: 200 pmol siRNA<sub>2</sub>组图7 血红蛋白H病红系细胞转染 siRNA<sub>2</sub>后 48 h  $\beta$ -珠蛋白的表达水平

高、RBC增多)<sup>[11-12]</sup>。然而,调控过剩 $\beta$ -珠蛋白肽链在HbH病中的研究目前尚未检索到相关文献。

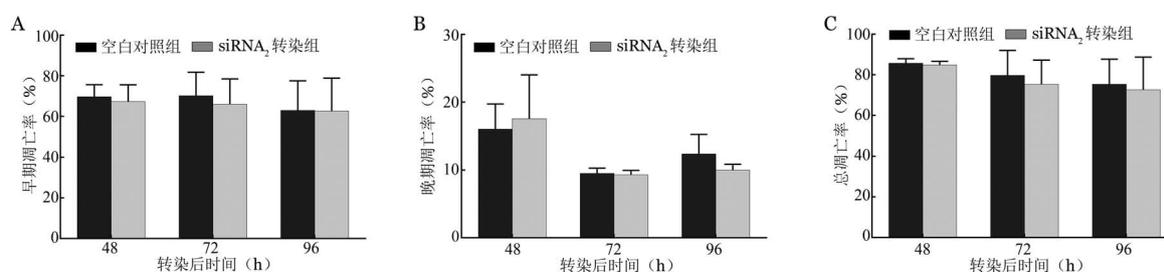
过去人们对HbH病缺乏足够的关注,近年研究<sup>[2,13]</sup>证实,HbH病不只是一种贫血疾病,它更倾向于一种包含贫血、铁过载、肝脾肿大、骨骼畸形、内分泌疾病和心脏疾病等的综合征,各种并发症的发生风险也随着铁在体内的积累而增加,这突出了早期有效干预对非输血依赖地中海贫血(NTDT)患者的必要性<sup>[14]</sup>。目前,HbH病的治疗方法包括支持治疗、输血治疗、铁螯合治疗、脾切除治疗及必要时的造血干细胞移植<sup>[15]</sup>。诱导胎儿血红蛋白的药物治疗及探索性的基因治疗应用于 $\beta$ -地贫治疗中<sup>[8,16]</sup>。造血干细胞移植仍然是目前治愈地贫的唯一方法<sup>[17]</sup>,但HLA全相合供者的缺乏、移植排斥反应、移植物抗宿主病(GVHD)及其他与治疗相关毒性的风险,限制着移植的应用。

本实验培养正常人与HbH病患者的红系细胞,通过电穿孔方式转染siRNA,筛选出对细胞 $\beta$ -珠蛋白基因沉默效应最强的siRNA序列及其有效剂量,评估其细胞毒性,并检测红系细胞的ROS水平。证实了靶向 $\beta$ -珠蛋白链mRNA的siRNA<sub>2</sub>对体外定向分化培养的人红系细胞 $\beta$ -珠蛋白有调控作用,siRNA<sub>2</sub>的沉默效应和持续时间与作用剂量有关,且有效剂量的siRNA<sub>2</sub>对细胞凋亡无明显影响,体外培

养体系中siRNA<sub>2</sub>沉默效应随着作用时间延长而减弱。筛选获得的有效siRNA在显著下调体外培养的HbH病红系细胞 $\beta$ -珠蛋白的表达水平并减少细胞内ROS产生和细胞凋亡率。siRNA精准靶向目标基因的沉默效应,对恢复 $\alpha$ -珠蛋白与 $\beta$ -珠蛋白的平衡有着巨大的潜力,这正是治疗HbH病溶血的关键。

在地贫中,游离的 $\alpha$ -或 $\beta$ -珠蛋白链可导致ROS生成增加,ROS攻击细胞膜的磷脂双分子层及膜蛋白结构,引起氧化损伤,损害膜生物的功能,大量的ROS在细胞分化成熟过程中,可能阻滞红系成熟,甚至诱导细胞凋亡,最终加剧了地贫患者外周循环溶血和无效红细胞生成<sup>[18-21]</sup>。Voon等<sup>[11]</sup>研究显示野生型小鼠红细胞内的ROS明显少于 $\beta$ -地贫模型鼠,而在 $\alpha$ -珠蛋白与 $\beta$ -珠蛋白表达相对平衡的复合 $\alpha$ - $\beta$ -地贫模型小鼠中,红细胞内的ROS与野生型小鼠相近。在本实验中,我们比较正常的红系细胞与HbH病红系细胞ROS水平,结果显示,HbH病红系细胞ROS水平显著高于正常红系,正常红系细胞在转染200 pmol siRNA<sub>2</sub>后,与空白对照组比较,细胞内的ROS水平增高;而HbH病红系细胞转染200 pmol siRNA<sub>2</sub>后,与空白对照组比较,细胞内的ROS水平降低。上述结果与Voon等<sup>[11]</sup>的结果相符, $\alpha$ -珠蛋白与 $\beta$ -珠蛋白数量失衡与红细胞内ROS水平有关,恢复 $\alpha$ -珠蛋白与 $\beta$ -珠蛋白数量平衡可减少细胞内ROS产生,从而减轻地贫患者的外周循环溶血和无效红细胞生成。在本实验中,我们观察到转染siRNA<sub>2</sub>后HbH红系细胞 $\beta$ -珠蛋白表达减少,细胞内ROS水平下降,细胞凋亡率下调。然而细胞凋亡率下调较小,这可能与电穿孔对细胞造成的损伤有关,且细胞的体外培养难以真实地模拟体内环境,具体的机制尚有待进一步研究。

与基因编辑相比,siRNA有方便、灵活、低脱靶风险的优点,目前在多领域治疗研究中取得了不错



A: 早期凋亡率; B: 晚期凋亡率; C: 总凋亡率

图8 血红蛋白H病红系细胞转染后转染200 pmol siRNA<sub>2</sub>后不同时间细胞凋亡率(\*P < 0.05)

的进展,一些基于 siRNA 干预的治疗方法已经进入了临床研究<sup>[22-25]</sup>,如与年龄相关的黄斑变性、糖尿病性黄斑水肿、呼吸道病毒感染、人类免疫缺陷病毒感染和多种肿瘤。2018年8月10日, siRNA 药物 Onpatro (Patisiran) 获得了第一份全球批准用于治疗成人由遗传性甲状腺素转运蛋白介导的淀粉样变性 (hATTR) 引起的多发性神经疾病。随后被欧盟药品管理局 (EMA) 批准用于治疗成人 hATTR 1 或 2 期多发性神经疾病。这是首个被批准上市 siRNA 药物,具有里程碑式的意义,为 siRNA 应用带来了新的曙光。对于 NTDT 患者来说值得期待。

综上,本研究证实了 siRNA 可下调 HbH 病红系细胞  $\beta$ -珠蛋白的表达并减少细胞内 ROS 的产生和细胞凋亡率,有望成为治疗 HbH 病的新途径。然而,本研究也存在不足之处, siRNA<sub>2</sub> 对 HbH 病红系细胞凋亡率的下调幅度较小,考虑这与电转染对细胞的损伤有关,下一步将通过建立 HbH 病的鼠模型进行体内实验,进一步探究 siRNA 的有效性与安全性。

#### 参考文献

- [1] Piel FB, Weatherall DJ. The  $\alpha$ -thalassemias [J]. N Engl J Med, 2014, 371(20):1908-1916. DOI: 10.1056/NEJMra1404415.
- [2] Chui DH, Fucharoen S, Chan V. Hemoglobin H disease: not necessarily a benign disorder [J]. Blood, 2003, 101(3):791-800. DOI: 10.1182/blood-2002-07-1975.
- [3] Mettananda S, Fisher CA, Hay D, et al. Editing an  $\alpha$ -globin enhancer in primary human hematopoietic stem cells as a treatment for  $\beta$ -thalassemia [J]. Nat Commun, 2017, 8(1):424. DOI: 10.1038/s41467-017-00479-7.
- [4] Chiu RW, Lau TK, Leung TN, et al. Prenatal exclusion of beta thalassaemia major by examination of maternal plasma [J]. Lancet, 2002, 360(9338):998-1000. DOI: 10.1016/S0140-6736(02)11086-5.
- [5] Mettananda S, Gibbons RJ, Higgs DR.  $\alpha$ -Globin as a molecular target in the treatment of  $\beta$ -thalassemia [J]. Blood, 2015, 125(24):3694-3701. DOI: 10.1182/blood-2015-03-633594.
- [6] Rund D, Rachmilewitz E. Beta-thalassemia [J]. N Engl J Med, 2005, 353(11):1135-1146. DOI: 10.1056/NEJMra050436.
- [7] Lang F, Qadri SM. Mechanisms and significance of eryptosis, the suicidal death of erythrocytes [J]. Blood Purif, 2012, 33(1-3):125-130. DOI: 10.1159/000334163.
- [8] Musallam KM, Rivella S, Vichinsky E, et al. Non-transfusion-dependent thalassemias [J]. Haematologica, 2013, 98(6):833-844. DOI: 10.3324/haematol.2012.066845.
- [9] Pootrakul P, Sirankapracha P, Hemsorach S, et al. A correlation of erythrokinetics, ineffective erythropoiesis, and erythroid precursor apoptosis in Thai patients with thalassemia [J]. Blood, 2000, 96(7):2606-2612.
- [10] Fucharoen S, Viprakasit V. Hb H disease: clinical course and disease modifiers [J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2009:26-34. DOI: 10.1182/asheducation-2009.1.26.
- [11] Voon HP, Warden H, Vadolas J. siRNA-mediated reduction of alpha-globin results in phenotypic improvements in beta-thalassemic cells [J]. Haematologica, 2008, 93(8):1238-1242. DOI: 10.3324/haematol.12555.
- [12] Xie SY, Ren ZR, Zhang JZ, et al. Restoration of the balanced alpha/beta-globin gene expression in beta654-thalassemia mice using combined RNAi and antisense RNA approach [J]. Hum Mol Genet, 2007, 16(21):2616-2625. DOI: 10.1093/hmg/ddm218.
- [13] Schrier SL, Angelucci E. New strategies in the treatment of the thalassemias [J]. Annu Rev Med, 2005, 56:157-171. DOI: 10.1146/annurev.med.56.082103.104718.
- [14] 中华医学会血液学分会红细胞疾病学组. 非输血依赖型地中海贫血诊断与治疗中国专家共识(2018年版) [J]. 中华血液学杂志, 2018, 39(9):705-708. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2018.09.001.
- [15] Vichinsky E. Advances in the treatment of alpha-thalassemia [J]. Blood Rev, 2012, 26 Suppl 1:S31-34. DOI: 10.1016/S0268-960X(12)70010-3.
- [16] Rachmilewitz EA, Giardina PJ. How I treat thalassemia [J]. Blood, 2011, 118(13):3479-3488. DOI: 10.1182/blood-2010-08-300335.
- [17] 赖永榕. 我如何治疗地中海贫血 [J]. 中华血液学杂志, 2018, 39(11): 892-894. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2018.11.003.
- [18] Fibach E, Dana M. Oxidative Stress in  $\beta$ -Thalassemia [J]. Mol Diagn Ther, 2019, 23(2):245-261. DOI: 10.1007/s40291-018-0373-5.
- [19] Romanello KS, Teixeira K, Silva J, et al. Global analysis of erythroid cells redox status reveals the involvement of Prdx1 and Prdx2 in the severity of beta thalassemia [J]. PLoS One, 2018, 13(12):e0208316. DOI: 10.1371/journal.pone.0208316.
- [20] De Franceschi L, Bertoldi M, Matte A, et al. Oxidative stress and  $\beta$ -thalassemic erythroid cells behind the molecular defect [J]. Oxid Med Cell Longev, 2013, 2013:985210. DOI: 10.1155/2013/985210.
- [21] Cheng ML, Ho HY, Tseng HC, et al. Antioxidant deficit and enhanced susceptibility to oxidative damage in individuals with different forms of alpha-thalassaemia [J]. Br J Haematol, 2005, 128(1):119-127. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2004.05257.x.
- [22] Wittrup A, Lieberman J. Knocking down disease: a progress report on siRNA therapeutics [J]. Nat Rev Genet, 2015, 16(9): 543-552. DOI: 10.1038/nrg3978.
- [23] Sarett SM, Werfel TA, Lee L, et al. Lipophilic siRNA targets albumin in situ and promotes bioavailability, tumor penetration, and carrier-free gene silencing [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, 114(32):E6490-E6497. DOI: 10.1073/pnas.1621240114.
- [24] Stein CA, Castanotto D. FDA-Approved Oligonucleotide Therapies in 2017 [J]. Mol Ther, 2017, 25(5):1069-1075. DOI: 10.1016/j.ymthe.2017.03.023.
- [25] Whitehead KA, Langer R, Anderson DG. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery [J]. Nat Rev Drug Discov, 2009, 8(2):129-138. DOI: 10.1038/nrd2742.

(收稿日期:2021-03-02)

(本文编辑:刘爽)