

· 综 述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.03.028

基于 CRISPR/Cas9 技术治疗 G6PD 缺乏症的运用前景*

周燕霞 综述,张鹏辉[△] 审校

(重庆医科大学附属儿童医院临检中心/儿童发育疾病教育部重点实验室/儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地/认知发育与学习记忆障碍转化医学重庆市重点实验室,重庆 400014)

[摘要] 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)缺乏症是由于 G6PD 基因突变引起的 X 连锁最常见的血液系统遗传疾病,目前的治疗以预防为主,严重者采用对症治疗。在基因水平上修复其突变位点将极大地改善这一现状,具有较好的应用前景。最新的基因编辑技术,即成簇规则间隔短回文重复序列及相关蛋白 9(CRISPR/Cas9)可通过同源性指导的修复来修正突变基因。这项技术正在体外应用于人类诱导多能干细胞(iPSCs)中,以纠正多种严重的遗传疾病,但目前鲜见用于 G6PD 缺乏症的治疗研究。本文重点介绍新型基因编辑技术 CRISPR/Cas9 治疗 G6PD 缺乏症的可行性和运用前景。

[关键词] 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺陷症;成簇规则间隔短回文重复序列及相关蛋白 9;基因治疗;iPSCs

[中图分类号] R318

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2019)03-0473-03

葡萄糖-6-磷酸酶(G6PD)缺乏症又称为蚕豆病。希腊的儿科医生最早发现食用蚕豆的儿童中可能出现严重的贫血和血红蛋白尿。随后,研究发现对羟喹啉敏感者的红细胞缺乏 G6PD 酶,而 G6PD 缺乏症可能受到疟疾选择,之后该领域的研究逐渐受到人们的关注。

G6PD 缺乏症主要发现于东南亚、非洲、中东和地中海沿岸,全世界约 4 亿患者,男性多于女性^[1]。我国 G6PD 缺乏症的分布呈南高北低趋势,广东、广西、海南等地人群患病率高。但随着人口流动性增加,患病率较低的地区也呈现增高趋势。

1 G6PD 缺乏症

G6PD 是一种从原核生物到动物都存在的 X 染色体连锁的胞质酶。人类 G6PD 基因位于 Xq28,长约 20 kb,编码 515 个氨基酸。G6PD 缺乏症是由于 G6PD 基因突变引起的,其突变主要集中在第 4、5、6、8、10 号外显子^[2]。人类基因突变数据库(HGMD)与 GÓMEZ-MANZO 等^[3]报道的 G6PD 基因突变型为 217 种,多为单个碱基置换导致的错义突变,少数为无义突变、剪接突变和小缺失,已发现的所有突变都在基因的编码区,且绝大多数影响蛋白结构的稳定性^[4]。我国人群中已发现 G6PD 基因突变位点超过 20 种,以 95A>G,1 376G>T,1 388G>A 最常见,占总突变的 50%~60%^[5]。

G6PD 缺乏症患者红细胞膜表面的 G6PD 酶缺乏,这导致了红细胞磷酸戊糖途径中谷胱甘肽还原酶的辅酶-还原型辅酶 II(NADPH)生成减少,使得维持红细胞膜稳定性的还原型谷胱甘肽(GSH)减少而不能抵抗氧化损伤,最终导致红细胞破坏并溶血^[6]。

WHO 根据 G6PD 酶的活性缺乏程度及临床表现,将该病分成 I~V 5 种亚型。G6PD 缺乏症临床表现的严重程度与酶功能障碍的等级相关^[7],主要分为新生儿黄疸、急性溶血性贫血和慢性非球形红细胞溶血性贫血 3 类。

2 G6PD 缺乏症的预防与治疗

G6PD 缺乏症患者多数平时无临床症状,早期诊断和干预非常重要。在 G6PD 缺乏症的高发地区,所有新生儿应开展 G6PD 缺乏症筛查和健康教育,禁用、慎用某些食物^[8]及药物(如抗疟疾药物^[9]、磺胺类药物、镇痛药、砒类药物^[10]、亚甲蓝和萘等^[11])。当出现急性溶血时,应立即停止接触和摄入可疑食物和药物并给予对症治疗,贫血较重时可输注 G6PD 正常的红细胞,防治肾衰竭。对于新生儿黄疸,根据胆红素的水平及个体情况,给予药物、蓝光照射或换血疗法,蓝光治疗是最常用且安全有效的方法,能有效降低胆红素浓度,预防胆红素脑病的发生。由 G6PD 缺乏所致的慢性非球形红细胞溶血性贫血(CNSHA)患者,一般无特殊治疗,但出现再障危象时输血是救命的措施之一。

3 G6PD 缺乏症治疗前景及展望

G6PD 缺乏症的本质为基因突变,基因治疗是其根本疗法。近年来,成簇规律间隔短回文重复序列及相关蛋白 9(CRISPR/Cas9)精确的基因编辑技术为基因治疗开启了新方向,可与诱导多功能干细胞(iPSCs)技术相结合,为患者定制个性化治疗方案。

3.1 iPSCs iPSCs 是基因治疗的理想细胞工具,是将一些多能遗传基因导入成熟体细胞中,使其重编程为与胚胎干细胞(ESC)具有相似特征的一种干细胞^[12],可以

* 基金项目:重庆市科委项目(Cstc2016shmszx130032)。 作者简介:周燕霞(1990-),在读硕士,主要从事遗传病基因治疗方面的研究。

[△] 通信作者,E-mail:zhangph7203@sina.com。

用于包括 G6PD 缺乏症在内等各种遗传疾病的疾病建模。随着 iPSCs 技术的出现,各种体细胞来源的 iPSCs 研究迅速出现^[13-14],证明了患者来源的 iPSCs 治疗血液疾病如镰状细胞贫血和地中海贫血症的潜力。使用基因编辑技术,通过纠正源于患者的 iPSCs 中潜在的致病性突变来构建临床相关的治愈性干细胞,然后将其分化为所需的祖细胞用于植入和细胞替代疗法。

3.2 CRISPR/Cas9 系统 CRISPR/Cas9 是新出现的一种由 RNA 指导 Cas9 核酸酶对靶基因进行编辑的基因编辑系统,是细菌和古细菌在长期演化过程中形成的一种适应性免疫防御系统^[15]。其原理为 crRNA (CRISPR-derived RNA) 通过碱基配对与 tracrRNA (trans-activating RNA) 结合形成 tracrRNA/crRNA 复合物,此复合物引导 Cas9 蛋白在与 crRNA 配对的序列靶位点剪切双链 DNA。通过人工设计这两种 RNA,可改造成具有引导作用的 sgRNA (single guide RNA),引导 Cas9 对 DNA 的定点切割。原型间隔序列毗邻基序 (PAM) 是 CRISPR/Cas9 至关重要的一部分,序列为 5'-NGG-3'^[16]。PAM 区是一段高度保守的序列,它在识别靶向 DNA 中有重要的作用,只有靶序列位于 PAM 的 5' 端附近时,Cas9 才对靶序列进行切割。

与已经开发了的其他基因编辑技术相比,Cas9 核酸酶是已知的第 1 个能够共定位 RNA、DNA 和蛋白质的分子,其特点包括:(1)易于设计,可人工设计与目的序列互补的 20-nt 的引导序列 sgRNA;(2)特异性高,不同的 sgRNA 可引导 Cas9 酶对 DNA 的定点切割;(3)成本低,周期短;(4)适合于多种细胞类型和生物体的高通量和多路基因编辑的系统^[17];(5)脱靶效率高且目的序列 5' 到 3' 端需靠近 PAM 区等。通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术,可实现基因插入、敲除、定点替换及染色体重组等,这为生物体的研究和改造带来了巨大潜力。

3.3 CRISPR/Cas9 技术在遗传性疾病中的应用

CRISPR/Cas9 作为可编程系统被发现后,相关应用研究迅速升温,从农作物编辑、转录和表观遗传学调控到各种疾病治疗等方面均得到应用,目前,用于癌症治疗^[18]和降低 HIV 病毒载量^[19]的 I 期临床试验正在积极开展,应用前景十分广阔。由于其强大的基因组编辑能力,CRISPR/Cas9 系统的优势领域是遗传性疾病。该技术常应用于多种遗传性疾病,如杜氏肌营养不良^[20]、 α 1-抗胰蛋白酶缺乏症^[21]、Crygc 基因突变引发的白内障^[22]、X 连锁慢性肉芽肿病^[23]、囊性纤维化^[24]等。

在血液系统遗传性疾病中,OHMORI 等^[25]利用 CRISPR/Cas9 技术在体内创建和校正了血友病 B 的小鼠模型,为其临床应用奠定基础。XIE 等^[26]利用 CRISPR/Cas9 修复地中海贫血患者来源的 iPSCs 中的致病基因,并将修复后的 iPSCs 诱导分化成红细胞,检

测此细胞能产生正常的 β -球蛋白,解决了地中海贫血症所引起的病变。HUANG 等^[27]用 CRISPR/Cas9 系统对镰状细胞性贫血患者 iPSCs 的 HBB 基因进行基因编辑,基因修正后的 iPSCs 可以诱导分化至网织红细胞阶段,且表达正常的 β -球蛋白。这些研究都提示利用 CRISPR/Cas9 联合 iPSCs 技术治疗 G6PD 缺乏症的可行性。

3.4 CRISPR/Cas9 应用于 G6PD 缺乏症 SPENCER 等^[28]利用 CRISPR/Cas9 系统产生了 G6PD 基因敲除体细胞(肝)细胞系,敲除 G6PD 基因后 G6PD 表达下降,提示 CRISPR/Cas9 系统可用于 G6PD 基因组的编辑。TANG 等^[29]运用合适的 sgRNA 和同源供体复合的 Cas9 蛋白注射入单细胞人胚胎中,证明有效的同源重组可介导 G6PD 基因中点突变的校正。已报道 G6PD 基因突变中约 83.9% 为单基因突变,其中约一半为 WHO-I 型,可导致严重的慢性溶血性贫血,临床治疗效果不佳^[5]。根据 CRISPR/Cas9 系统的编辑原理,sgRNA 可引导 Cas9 蛋白在 PAM 区上游的 3~8 碱基处切割目的 DNA^[30],则利用 CRISPR/Cas9 技术可修复 G6PD 缺乏症的大部分突变位点,包括 95A>G,1 376G>T,1 024C>T 等我国最常见的几种突变。人工设计针对导致 G6PD 缺乏症突变位点的特异性 sgRNA,引导 Cas9 蛋白对突变位点进行切割,同时提供 DNA 修复模板进行同源修复 (HDR),达到修复突变位点的目的。可将 G6PD 缺乏症患者的体细胞重编程为 iPSCs,利用 CRISPR/Cas9 技术修复 G6PD 缺乏症患者来源的 iPSCs 中的致病突变,再将修复后的 iPSCs 诱导分化为红系祖细胞移植到 G6PD 缺乏症患者体内,达到治疗的目的。

总之,CRISPR/Cas9 系统联合 iPSCs 技术是一种治疗 G6PD 缺乏症的理想策略。该系统作为遗传性疾病新型治疗技术的前沿,具有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] ZAIDI A U, CALLAGHAN M U, RAVINDRANATH Y. Favism and glucose-6-Phosphate dehydrogenase deficiency[J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(11):1067.
- [2] MINUCCI A, MORADKHANI K, HWANG M J, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations database: review of the "old" and update of the new mutations[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2012, 48(3):154-165.
- [3] GÓMEZ-MANZO S, MARCIAL-QUINO J, VANOYE-CARLO A, et al. Glucose-6-Phosphate dehydrogenase: update and analysis of new mutations around the world[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(12):E2069.
- [4] SARKER S K, ISLAM M T, ECKHOFF G, et al. Molecular analysis of glucose-6-Phosphate dehydrogenase gene mutations in bangladeshi individuals[J]. *PLoS One*, 2016, 11(11):e0166977.
- [5] YAN J B, XU H P, XIONG C, et al. Rapid and reliable detec-

- tion of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) gene mutations in Han Chinese using high-resolution melting analysis[J]. *J Mol Diagn*, 2010, 12(3): 305-311.
- [6] LUZZATTO L, ARESE P. Favism and glucose-6-Phosphate dehydrogenase deficiency[J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(1): 60-71.
- [7] LAOUINI N, BIBI A, AMMAR H, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Tunisia: molecular data and phenotype-genotype association[J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(2): 851-856.
- [8] SKÖLD M B, SVENDSEN R P, PEDERSEN E B. Favism after ingestion of fava beans in a three-year-old child with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency[J]. *Ugeskr Laeger*, 2017, 179(20): V01170004.
- [9] POIROT E, VITTINGHOFF E, ISHENGOMA D, et al. Risks of hemolysis in glucose-6-Phosphate dehydrogenase deficient infants exposed to chlorproguanil-dapsone, mefloquine and sulfadoxine-pyrimethamine as part of intermittent presumptive treatment of malaria in infants[J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0142414.
- [10] PAMBA A, RICHARDSON N D, CARTER N, et al. Clinical spectrum and severity of hemolytic anemia in glucose 6-phosphate dehydrogenase-deficient children receiving dapsone[J]. *Blood*, 2012, 120(20): 4123-4133.
- [11] LUZZATTO L, SENECA E. G6PD deficiency: a classic example of pharmacogenetics with on-going clinical implications[J]. *Br J Haematol*, 2014, 164(4): 469-480.
- [12] 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.
- [13] YU J Y, VODYANIK M A, SMUGA-OTTO K A, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells[J]. *Science*, 2007, 318(5858): 1917-1920.
- [14] WANG L L, CHEN Y H, GUAN C Y, et al. Using low-risk factors to generate non-integrated human induced pluripotent stem cells from urine-derived cells[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 245.
- [15] CONG L E, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823.
- [16] MALI P, ESVELT K M, CHURCH G M. Cas9 as a versatile tool for engineering biology[J]. *Nat Methods*, 2013, 10(10): 957-963.
- [17] TAKURO H, IZUHO H. Genome engineering using the CRISPR/Cas system[J]. *World J Med Gene*, 2014, 4(3): 69-76.
- [18] REARDON S. First CRISPR clinical trial gets green light from US panel[EB/OL]. [2018-6-22]. <https://www.nature.com/news/first-crispr-clinical-trial-gets-green-light-from-us-panel-1>.
- [19] TEBAS P, STEIN D, TANG W W, et al. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV[J]. *N Engl J Med*, 2014, 370(10): 901-910.
- [20] LONG C Z, MCANALLY J R, SHELTON J M, et al. Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA[J]. *Science*, 2014, 345(621): 1184-1188.
- [21] SMITH C, ABALDE-ATRISTAIN L, HE C X, et al. Efficient and allele-specific genome editing of disease loci in human iPSCs[J]. *Mol Ther*, 2015, 23(3): 570-577.
- [22] WU Y X, ZHOU H, FAN X Y, et al. Correction of a genetic disease by CRISPR-Cas9-mediated gene editing in mouse spermatogonial stem cells[J]. *Cell Res*, 2015, 25(1): 67-79.
- [23] SÜRÜN D, SCHWÄBLE J, TOMASOVIC A, et al. High efficiency gene correction in hematopoietic cells by Donor-Template-Free CRISPR/Cas9 genome editing[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018(10): 1-8.
- [24] SCHWANK G, KOO B K, SASSELLI V, et al. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients[J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(6): 653-658.
- [25] OHMORI T, NAGAO Y, MIZUKAMI H, et al. CRISPR/Cas9-mediated genome editing via postnatal administration of AAV vector cures haemophilia B mice[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 4159.
- [26] 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.
- [27] HUANG X S, WANG Y, YAN W, et al. Production of Gene-Corrected adult beta globin protein in human erythrocytes differentiated from patient iPSCs after genome editing of the sickle point mutation[J]. *Stem Cells*, 2015, 33(5): 1470-1479.
- [28] SPENCER N Y, YAN Z Y, CONG L, et al. Definitive localization of intracellular proteins: novel approach using CRISPR-Cas9 genome editing, with glucose 6-phosphate dehydrogenase as a model[J]. *Anal Biochem*, 2016(494): 55-67.
- [29] TANG L C, ZENG Y T, DU H Z, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human zygotes using Cas9 protein[J]. *Mol Genet Genomics*, 2017, 292(3): 525-533.
- [30] MALI P, YANG L H, ESVELT K M, et al. RNA-Guided human genome engineering via Cas9[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 823-826.