



饶书权, 中国医学科学院血液病医院, 研究员, 博士生导师。主要研究方向: (1) 新型CRISPR基因编辑工具和递送工具的开发; (2) 遗传性疾病的功能基因组学和基因治疗; (3) 生理或病理条件下髓系细胞的发育调控。开发了能在人原代细胞中开展CRISPR高通量文库筛选的新型基因编辑递送系统; 揭示了多个与髓系细胞发育有关的新基因及其分子机制。近5年来以第一作者或通讯作者在*Cell Stem Cell*、*Genome Med*、*JCI*、*AJHG*、*Brief Bioinform*和*Hum Genet*等高水平期刊发表论文20余篇, 累计影响因子超过700, 得到了相关领域国际学术界的广泛关注和肯定。



姚瑶, 中国医学科学院血液病(中国医学科学院血液学研究所), 副研究员。主要研究方向为(1) 血液系统遗传病的致病基因克隆以及致病机制研究; (2) 血液系统遗传病的基因治疗与基因诊断的转化医学研究; (3) 高通量测序技术以及生物信息学分析方法的开发与临床转化。既往研究中通过综合生物信息学手段与造血干细胞基因编辑技术揭示了髓系细胞发育的关键调控因子、先天性粒细胞减少症的致病机制等。近5年来以第一作者或共同第一作者在*Signal Transduct Target Ther*、*Commun Biol*、*Cell Stem Cell*、*Genome Med*等国际期刊上发表论文数篇。

先天性中性粒细胞减少症: 从基础到临床

薛琛 龙静 姚瑶* 饶书权*

(中国医学科学院血液病医院(中国医学科学院血液学研究所), 实验血液学国家重点实验室, 国家血液系统疾病临床医学研究中心, 细胞生态海河实验室, 天津 300020)

摘要 先天性中性粒细胞减少症(congenital neutropenia, CN)是一组罕见的遗传性骨髓衰竭性疾病, 以患者外周血中性粒细胞数目减少为主要特征。现已发现数百个与CN有关的遗传变异, 相关基因包括*ELANE*和*HAXI*等。由于缺乏CN的疾病模型, 这些遗传变异导致的CN的分子机制至今尚未被完全阐明, 严重制约了CN的药物和基因治疗研发。近年来, 以CRISPR/Cas为代表的基因编辑技术快速发展, 为理解和治疗CN提供了新的思路。该综述将重点讨论CN的遗传学、分子机制和临床治疗研究进展。

关键词 先天性中性粒细胞减少症; CRISPR/Cas; 基因治疗; 遗传性疾病

收稿日期: 2021-11-05 接受日期: 2021-12-06

中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(批准号: 2021-I2M-1-041)、中国医学科学院中央级公益性科研院所基本科研业务费项目(批准号: 2021-RC310-015)和实验血液学国家重点实验室(批准号: Z21-03)资助的课题

*通讯作者。Tel: 022-23909349, E-mail: yaoyao@ihcams.ac.cn; Tel: 022-23909349, E-mail: raoshuquan@ihcams.ac.cn

Received: November 5, 2021 Accepted: December 6, 2021

This work was supported by the CAMS Innovation Fund for Medical Sciences (CIFMS) (Grant No.2021-I2M-1-041), the Non-profit Central Research Institute Fund of Chinese Academy of Medical Sciences (Grant No.2021-RC310-015) and the State Key Laboratory of Experimental Hematology Research Grant (Grant No.Z21-03)

*Corresponding authors. Tel: +86-22-23909349, E-mail: yaoyao@ihcams.ac.cn; Tel: +86-22-23909349, E-mail: raoshuquan@ihcams.ac.cn

Congenital Neutropenia: from Basic Research to the Clinic

XUE Chen, LONG Jing, YAO Yao*, RAO Shuquan*

(State Key Laboratory of Experimental Hematology, National Clinical Research Center for Blood Diseases,
Haihe Laboratory of Cell Ecosystem, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital,
Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China)

Abstract Congenital neutropenia is a heterogeneous group of rare inherited bone marrow failure syndromes, which is characterized by impaired maturation of neutrophil granulocytes, and as a result, defined as dramatically reduced peripheral blood ANC (absolute neutrophil counts). Up till now, hundreds of genetic variants, involving *ELANE*, *HAX1* and others, have been identified in patients of congenital neutropenia; however, due to lack of disease models, the molecular mechanisms of these genetic variants leading to congenital neutropenia have not yet been fully elucidated, which severely hampers development of therapeutic drugs and genome editing. In recent years, the development of gene editing technologies has paved new avenue for understanding the pathological mechanisms of congenital neutropenia and exploring novel therapeutic methods. This review will mainly focus on the progress of genetics and molecular mechanisms of congenital neutropenia, as well as clinical translations.

Keywords congenital neutropenia; CRISPR/Cas; gene therapy; genetic disease

先天性中性粒细胞减少症(congenital neutropenia, CN)是一组罕见的遗传性骨髓衰竭性疾病, 主要治疗方法是静脉注射重组粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)。然而, 长期使用重组 G-CSF 会显著增加 CN 患者向继发性骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndrome, MDS)或急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)转化的风险^[1]。此外, 超过 10% 的重症 CN 患者在受重组 G-CSF 治疗之后, 其外周血中性粒细胞的数目并不升高^[2-3]。异基因造血干细胞移植(allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, Allo-HSCT)是 CN 的替代治疗方案, 但是供体与受体之间的免疫遗传学差异极大地限制了造血干细胞移植的应用范围^[4]。近年来, 以 CRISPR/Cas 为代表的基因编辑技术迎来了革命性的进展, 为遗传性血液系统疾病的诊断和治疗带来了新的契机。本文将首先对 CN 的遗传学、分子机制以及临床常规治疗手段进行综述, 然后简要介绍当前基因编辑技术的研究进展及其在 CN 治疗中的应用。

1 CN 的临床和流行病学特征

CN 以患者外周血中性粒细胞数目减少为主要特征, 通过对外周血中性粒细胞绝对计数可将先天性中性粒细胞减少症分为轻度($1.0 \times 10^9 \sim 1.5 \times 10^9$ 个/L)、中度($0.5 \times 10^9 \sim 1.0 \times 10^9$ 个/L)和重度($< 0.5 \times 10^9$ 个/L)。中性

粒细胞的发生主要经历造血干细胞、原始粒细胞、早幼粒细胞、晚幼粒细胞阶段, 然后进入杆状核粒细胞阶段, 最后发育为成熟分叶核粒细胞。中性粒细胞的成熟过程由很多转录因子控制, 主要是 PU.1 和 C/EBP- α (CCAAT/enhancerbinding protein α)^[5]。CN 患者的骨髓涂片显示造血干细胞髓系发育停滞在早幼粒细胞阶段, 进而导致其后各个阶段的细胞以及成熟的中性粒细胞数目减少^[2]。中性粒细胞数目减少会增加病原微生物的感染概率, 因此 CN 患者在新生儿时期便会罹患包括中耳炎、齿龈炎、皮肤感染、肺炎、深部组织脓肿和败血症等在内的感染性疾病, 疾病严重时导致患者死亡^[2,6]。

CN 在国内仅有少数小样本及个案报道, 尚无大规模流行病学研究; 在欧美国家 CN 患病率约为百万分之 3 至百万分之 8.5, 实际测得的患病率通常取决于以下几个因素: 新生儿因感染或其他原因导致的死亡率、患者的检出率以及特定致病变异的遗传模式等^[7-8]。由于大多数新生儿或婴儿患者都没有开展全血细胞计数, CN 通常是由于发热以及反复发生的急慢性感染而被检出的, 这导致先天性粒细胞减少症的患病率可能被低估。

重组 G-CSF 被用于临床治疗 CN 之前, 患者的死亡率高达 80%~90%^[9]。重组 G-CSF 的应用极大地改善了 CN 患者的生存质量并降低了患者的死亡率(总

体存活率超过80%)^[10-11]。临床数据显示,使用重组G-CSF治疗CN患者会使外周血中性粒细胞绝对值增加至(或超过) $1 \times 10^9/L$,并显著降低CN患者感染的发作次数和严重程度^[12]。CN患者有继发性MDS或AML的风险,对374名CN患者长达10年的跟踪调查结果显示,AML的累积发病率高达22%^[13]。值得注意的是,AML的累积发病率与CN患者的遗传变异无关,而与重组G-CSF的使用剂量呈正相关。对重组G-CSF反应较弱而需要使用高剂量的CN患者,在15年后的白血病的累积发生率为40%;对重组G-CSF反应强而使用低剂量的CN患者,其在15年后的白血

病累积发生率仅为11%^[14]。

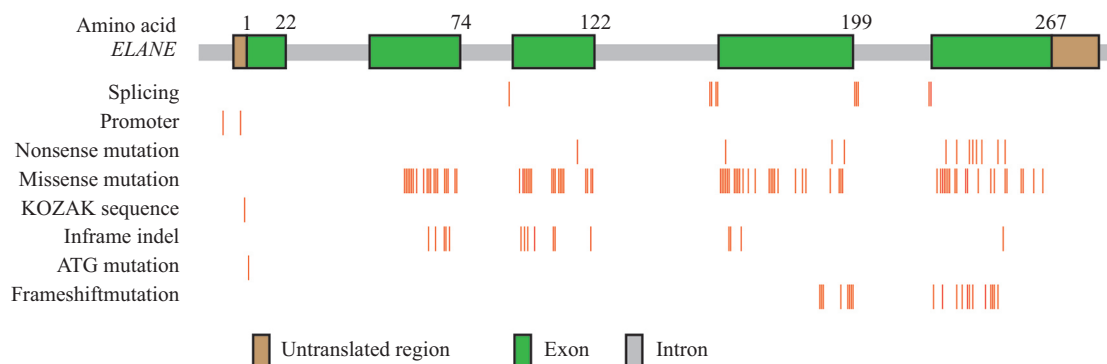
2 CN的分子遗传学研究

根据国际CN患者注册机构(Severe Chronic Neutropenia International Registry, SCNIR)的数据显示(<https://depts.washington.edu/registry/>),与CN有关的遗传变异高达300余个。相关的致病基因包括 *ELANE*(elastase)、*HAX1*(HCLS1 associated protein X-1)和 *WAS*(Wiskott-Aldrich syndrome)等,本文以以上3个基因为例,分别介绍其引起先天性中性粒细胞的分子机制和临床表现,其他致病基因可见表1。这

表1 CN部分致病基因

Table 1 Partial disease-causing mutated genes in CN

基因 Gene	疾病 Diseases	其他临床表型 Other clinical features	遗传模式 Inheritance	频率 Frequencies
<i>ELANE</i>	Severe congenital neutropenia, Cyclic neutropenia	Cyclic haematopoiesis, monocytosis, eosinophilia and evolution to AML or MDS	AD	45%
<i>SLC37A4</i>	Congenital neutropenia and glyco-gen storage disease type Ib (GSDIb)	Evolution to AML or MDS	AR	12%
<i>HAX1</i>	Severe congenital neutropenia	Evolution to AML or MDS	AR	7%
<i>G6PC3</i>	Severe congenital neutropenia	Thrombocytopenia and evolution to AML or MDS	AR	2%
<i>VPS13B</i>	Congenital neutropenia, Cohen syndrome	None	AR	2%
<i>TCIRG1</i>	Severe congenital neutropenia	None	AD	2%
<i>WAS</i>	Congenital neutropenia	Monocytopenia, lymphopenia, reduced numbers of natural killer cells, abrogated phagocyte activity and evolution to AML or MDS	XL	2%
<i>CXCR4</i>	Congenital neutropenia and WHIM syndrome	B cell defects and hypogammaglobulinaemia	AD	2%
<i>GFI1</i>	Severe congenital neutropenia	Lymphopenia and increased numbers of immature myeloid cells in the peripheral blood and evolution to AML or MDS	AD	<1%
<i>VPS45</i>	Congenital neutropenia	Anisocytosis and poikilocytosis, hypergammaglobulinaemia, renal extramedullary haematopoiesis, bone marrow fibrosis, progressive anaemia and thrombocytopenia.	AR	<1%
<i>JAGN1</i>	Severe congenital neutropenia	Evolution to AML	AR	<1%
<i>CSF3R</i>	Severe congenital neutropenia	None	AR	<1%
<i>USB1</i>	Congenital neutropenia, Clericuzio-type poikiloderma	None	AR	<1%
<i>GATA2</i>	Congenital neutropenia	Severe monocytopenia, dendritic cell and natural killer cell deficiencies, aplastic anaemia and evolution to AML or MDS	AD	<1%
<i>STK4</i>	Congenital neutropenia	Monocytopenia and T cell and B cell lymphopenia	AR	<1%
<i>CXCR2</i>	Congenital neutropenia	Myelokathexis due to impaired neutrophil release from the bone marrow to the peripheral blood	AR	<1%



数据来源于人类基因突变数据库(HGMD, <http://www.hgmd.cf.ac.uk/>)。

Data was retrieved from the Human Gene Mutation Database (HGMD, <http://www.hgmd.cf.ac.uk/>).

图1 与CN有关的ELANE基因突变

Fig.1 *ELANE* gene mutation associated with CN

些遗传变异为理解CN的发病机制以及患者的分层管理和精准医疗提供了重要依据。

2.1 *ELANE*基因显性杂合突变

*ELANE*基因显性杂合突变是CN最常见的遗传突变,大约45%的CN患者是由于*ELANE*基因显性杂合突变所致^[15-16]。*ELANE*基因编码中性粒细胞弹性蛋白酶,属于丝氨酸蛋白酶中的糜蛋白酶家族。*ELANE* mRNA首先在内质网中翻译出中性粒细胞弹性蛋白酶原,并在翻译过程中切割氨基端的27个氨基酸形成中性粒细胞弹性蛋白酶,随后经过高尔基体的分拣,进一步转运至质膜或嗜天青颗粒中;中性粒细胞弹性蛋白酶可以通过降解不同类型的蛋白质从而参与机体免疫反应以及抵抗病原微生物的入侵^[17]。根据人类基因突变数据库(Human Gene Mutation Database, HGMD)的统计显示,与CN有关的*ELANE*基因突变高达225个,包括错义突变(missense mutation)、无义突变(nonsense mutation)、移码突变(frameshift mutation)、剪接位点突变(splicing site mutation)、插入缺失(insertion/deletion, indels)等突变形式(图1)^[18]。

2.2 *HAXI*基因隐性纯合突变

*HAXI*基因可以编码两种不同的剪接异构体,长度分别为279和231个氨基酸。基因型-表型研究表明:如果*HAXI*基因突变对两种蛋白亚型均有影响,比如p.Q190X和p.R86X,会同时导致CN以及神经系统症状,包括精神发育迟滞或癫痫发作等^[19];如果*HAXI*基因突变仅对其中一种亚型有影响,比如p.W44X,也会导致CN但不伴有神经系统症状^[19]。尽管HAXI蛋白几乎在所有类型的

组织中均有表达,但是与其相互作用的蛋白[比如HCLS1(hematopoietic cell-specific lyn substrate 1)]却表现出显著的组织或细胞特异性^[20]。*HCLS1*基因编码一个造血谱系特异性蛋白,是G-CSF受体信号转导途径的重要衔接蛋白,是中性粒细胞发育调控的关键组分。*HAXI*基因突变可能是通过破坏HAXI蛋白与HCLS1蛋白的相互作用,进而使下游的信号通路失活,并最终导致中性粒细胞发育障碍^[21]。

2.3 *WAS*基因X连锁隐性突变

*WAS*基因编码一种衔接蛋白,仅表达于造血细胞内,其基本功能为调节肌动蛋白丝聚合反应。*WAS*突变可引起WAS蛋白构象改变并持续激活,增加肌动蛋白的多聚化并影响细胞的有丝分裂,从而可以阻碍多谱系细胞的正常发育,包括中性粒细胞发育障碍。具有*WAS*基因突变的CN患者临床表现为中性粒细胞减少,以及骨髓发育不良或其他系细胞减少等,同时有向AML或MDS转化的倾向^[22]。

除上述3个基因外,其他基因如*SLC37A4*^[23]、*CXCR4*^[24]、*USB1*^[25]突变同样会导致CN的发生,但由于其在人群中出现频率较低,致病机制不明确,并且同一突变导致其他临床表型,因此不再对其进行综述^[2]。

3 CN的病理机制

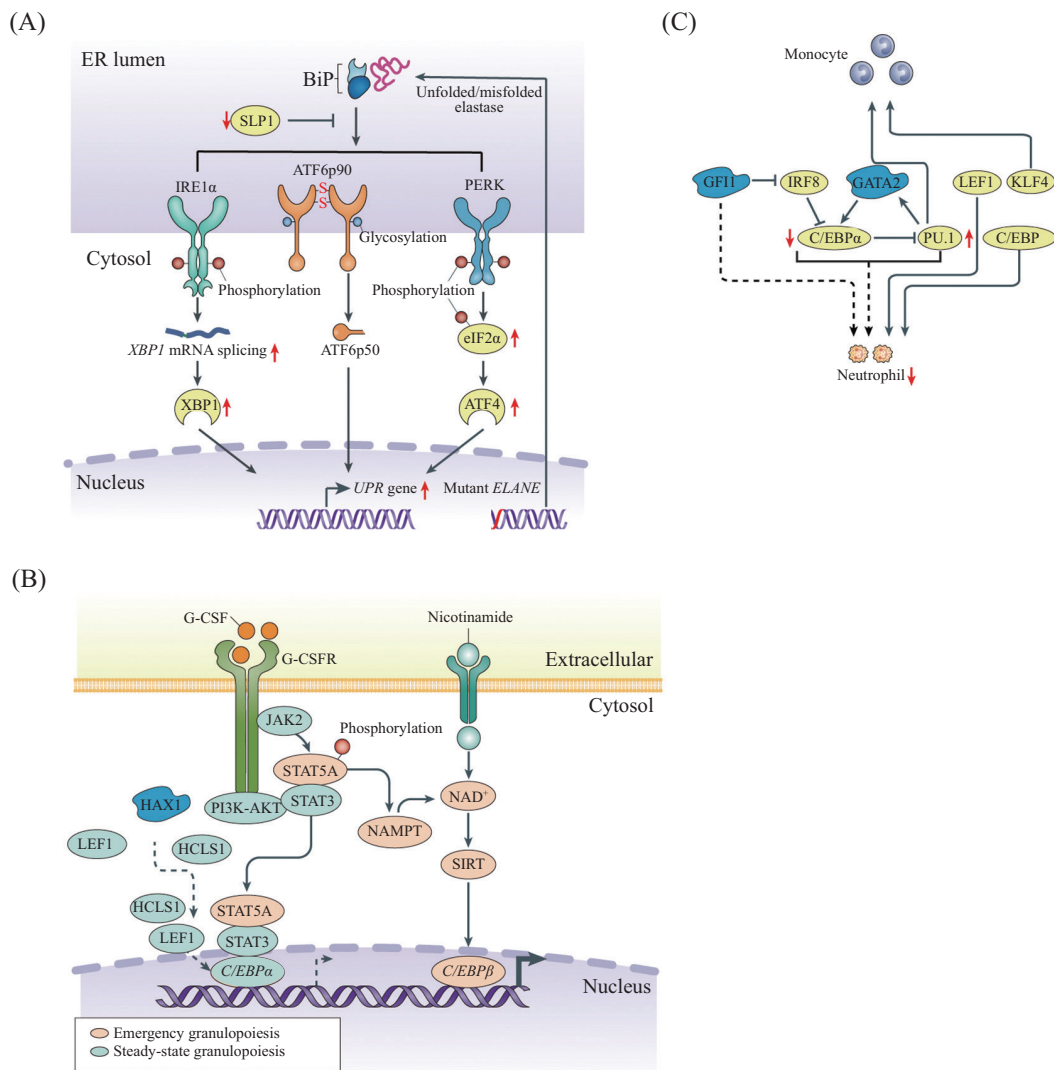
研究表明,不同的CN基因突变会作用于不同的信号通路(图2),但它们可能会通过相同的或相似的病理机制引起中性粒细胞发育障碍^[26]。

3.1 髓系前体细胞内质网应激和细胞凋亡

在髓系细胞中,突变的中性粒细胞弹性蛋白酶

不能被正确折叠、加工、分泌或降解^[27]。在胞质内异常积聚或在内质网上定位错误的突变的中性粒细胞弹性蛋白酶会通过激活IRE1 α 、ATF6和PERK受体信号转导通路, 诱发内质网应激并激活非折叠蛋白反应, 从而促进细胞凋亡(图2A)^[28-29]。与中性粒细胞弹性蛋白酶的表达开始于早幼粒细胞阶段相一致, CN患者的骨髓涂片揭示造血干细胞的发育停滞在早幼粒细胞阶段^[30]。非折叠蛋白反应激活的程度与

ELANE基因突变类型和位点密切相关, 这可能取决于中性粒细胞弹性蛋白酶异常折叠的严重程度^[29]。与ELANE基因突变类似, G6PC3基因突变也会导致内质网应激, 相关证据包括GRP78表达水平升高以及eIF2A磷酸化水平升高^[31]。值得注意的是, 并不是所有的ELANE基因突变都会通过UPR导致内质网应激。COREY教授等^[32]在小鼠32D细胞系和人NB4细胞系中过表达ELANE突变蛋白(p.G185R), 却并没



A: 携带错义突变或其他形式突变的Elastase蛋白在内质网中不能被正确折叠UPR, 导致UPR相关通路被激活, 引发细胞凋亡。B: *HAX1*等基因突变可阻断稳态的G-CSF受体信号转导途径, 导致中性粒细胞发育障碍; 而重组G-CSF补充治疗可以激活C/EBP β (CCAAT/enhancerbinding protein β)介导的中性粒细胞紧急生成途径。C: 髓系发育相关转录因子失调导致髓系细胞发育失调, 表现为中性粒细胞的数目减少, 而单核细胞数目增加。

A: mutant Elastase cannot be folded correctly in endoplasmic reticulum (ER), thus triggering unfolded protein response, related pathway activation and cell death. B: *HAX1* mutations and other mutations can block the steady-state G-CSF receptor signaling pathway, leading to impairment of neutrophil development; G-CSF supplement can turn on emergency granulopoiesis through activating the C/EBP β pathway. C: dysregulation of myeloid-related transcriptional factors may lead to unbalanced myeloid cells development, as evidenced by a decrease in the number of neutrophils and an increase in the number of monocytes.

图2 CN的病理机制

Fig.2 The pathological mechanisms of CN

有发现UPR以及早幼粒/中幼粒细胞细胞死亡;相反,他们发现ELANE突变蛋白(p.G185R)是通过改变细胞的转录组水平进而影响早幼粒细胞向中性粒细胞分化的。

此外, *HAX1* 基因突变也会导致髓系前体细胞凋亡, 相关实验证据包括 *BCL-2* (apoptosis regulator *BCL2*)、*BCL-XL* (*BCL2* associated agonist of cell death) 和 *BIRC5* (baculoviral IAP repeat-containing protein 5) 基因表达水平降低, 以及 *BFL1* (*BCL2* related protein A1) 和 *MCL1* (*MCL1* apoptosis regulator, *BCL-2* family member) 基因表达水平升高^[33-34]。 *HAX1* 基因突变还可能通过线粒体途径导致髓系前体细胞死亡, 具体机制为 *HAX1* 基因突变会导致线粒体释放的细胞色素c增加, 引起线粒体功能失调^[19]。此外, *JAGN1* 和 *SLC37A4* 基因突变同样会引起髓系前体细胞内质网应激和凋亡, 导致中性粒细胞发育障碍^[35]。

3.2 G-CSF受体信号转导途径

G-CSF受体信号通路是调控造血干细胞髓系发育和中性粒细胞生成的关键调控机制。部分CN的致病基因编码的蛋白位于G-CSF受体信号通路中, 提示G-CSF受体信号失调可能是CN的主要致病机制^[36]。值得注意的是, G-CSF受体信号通路失调发生在G-CSF受体的下游, 多与 *HAX1* 基因突变有关, 其最终结果是导致粒细胞发育稳态失衡; 与之相对应的是, 临床上使用高浓度重组G-CSF治疗剂量可以显著提高CN患者骨髓和外周血中性粒细胞的数目, 其机制可能是对粒细胞发育紧急通路的激活作用(图2B)^[36]。而对于携带 *CSF3R* 突变的CN患者, G-CSF治疗则敏感度不高。

3.3 髓系发育相关转录因子表达失调

除了中性粒细胞减少之外, 大多数CN患者还会同时表现出单核细胞和嗜酸性粒细胞数目增加^[37]。在髓系发育过程中, 单核细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞的生成受到转录因子及其他因素的动态调节。在CN患者中, 与中性粒细胞发育密切有关的转录因子 *C/EBPα* 的表达水平显著降低, 而与单核细胞发育有关的转录因子 *PU.1* 并没有显著改变^[38-39]。因此, 在转录因子的调节下, 髓系祖细胞会更多地发育为单核细胞(图2C)。此外, DNA结合蛋白抑制分子 *ID-1* 作为转录调控因子会促进中性粒细胞的发育并同时抑制嗜酸性粒细胞的发育。在中性粒细胞减少症患者中, 由于 *ID-1* 的表达出现明显下调, 因此嗜酸

性粒细胞数量会相对增多^[40]。

4 CN的临床干预策略

重组G-CSF补充是几乎所有先天性中性粒细胞减少患者的首选治疗方法, 对于已经出现严重细菌或真菌感染的SCN患者应尽快开展重组G-CSF补充和抗生素联合治疗。大多数CN患者在接受G-CSF治疗之后, 其外周血中性粒细胞的数目都能维持在正常或者接近正常水平($>1 \times 10^9/\text{升}$)^[41]。值得注意的是, 虽然重组G-CSF补充可以逆转CN患者外周血中性粒细胞缺乏, 但中性粒细胞的功能并不能完全恢复, 比如患者来源的中性粒细胞常表现出氧自由基产生缺陷和体外趋化活性降低等问题^[3,42]。此外, 重组G-CSF补充治疗会显著增加先天性中性粒细胞减少患者罹患AML或MDS的风险^[43]。

异基因造血干细胞移植是CN患者的另一治疗方法。统计数据表明, 接受异基因造血干细胞移植的CN患者的5年生存率高达80%^[31,44]。尽管如此, 异基因造血干细胞移植仍然面临以下问题, 比如由急性或慢性移植物引起的抗宿主病、细菌或真菌感染, 以及化疗或放疗导致的AML或其他继发性恶性肿瘤风险增加等。此外, 缺少人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)相合供体是异基因造血干细胞移植面临的较大阻碍, 而移植后发生的移植物抗宿主病(graft versus host disease, GVHD)是移植患者预后不良的主要原因。

5 CN的基因治疗

近年来, 以CRISPR/Cas为代表的基因编辑技术的快速发展为遗传性血液系统疾病的治疗开辟了新的思路^[45]。利用基因编辑技术对遗传性血液系统疾病患者来源的造血干细胞的遗传变异进行修复, 再将修复之后的造血干细胞回输进患者体内, 可以有效治疗包括镰状细胞贫血和血友病在内的遗传性血液系统疾病^[46-47]。由于基因治疗利用患者自体造血干细胞进行基因编辑, 能够有效避免免疫排斥反应, 并且由于自体造血干细胞缺乏免疫原性, 可以显著降低移植前的预处理强度, 因此具有广阔的应用前景。

5.1 CRISPR/Cas基因编辑系统与CN的基因治疗

传统的基因编辑技术是通过宿主细胞的同源重组(homologous recombination, HR)系统整合具有同源

序列的基因片段来实现基因编辑的^[48];然而,同源重组的低效率限制了其在基因编辑领域的应用。随着基因编辑技术的不断发展,核酸酶介导的基因编辑技术开始被广泛应用,该技术通过特异性地识别并裂解靶DNA双链,激发细胞内源性的修复机制来实现基因编辑;相关的修复机制包括同源介导的DNA双链修复(homology-directed repair, HDR)^[49]、非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)^[50]以及微同源介导的末端连接(microhomology-mediated end joining, MMEJ)^[51]。目前用于基因编辑的核酸酶主要包括以下几类:巨核酶(meganucleases)、锌指核酸酶(zinc-finger nucleases, ZFNs)和转录激活因子样效应核酸酶(transcription-activator-like effector nucleases, TALENs)和规律间隔成簇短回文重复序列及其相关核酸酶[(clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) arrays and CRISPR-

associated (Cas) proteins)]等^[52](图3)。

由于先天性中性粒细胞的遗传模式及其遗传变异都相对比较清楚,国内外多家实验室已经开始利用CRISPR/Cas基因编辑技术对其进行基因治疗。*ELANE*基因杂合突变是先天性中性粒细胞最常见的致病突变^[53]。理论上讲,利用基因编辑技术修复*ELANE*基因致病突变就可以改善先天性中性粒细胞的临床表型,从而达到治疗的目的。TRAN及其同事^[54]通过CRISPR/Cas基因编辑技术对*ELANE*基因4号外显子上的点突变(c.515 T>C)进行了修复。其基本思路为在sgRNA的引导下,利用CRISPR/Cas9核糖核蛋白复合物(ribonucleic protein, RNP)在上述点突变附近进行切割,再通过AAV将含有正常4号外显子序列的DNA模板导入细胞中,利用HDR机制对上述突变进行纠正。尽管该方法理论上可以对所有的遗传变异进行精确修复,但是其在临床应用上却存在以下问题。首先,与CN

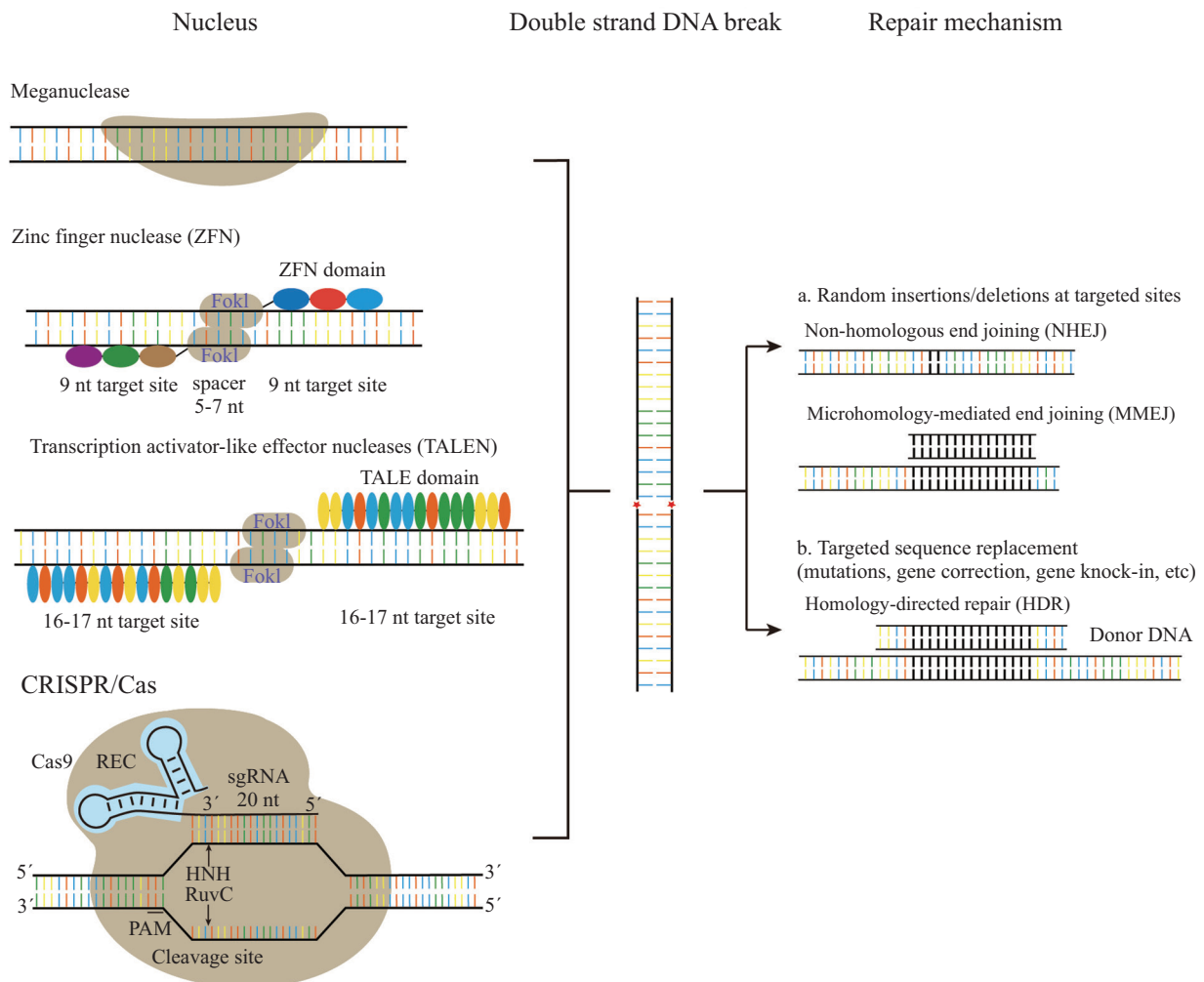


图3 核酸酶介导的基因编辑技术(根据参考文献[52]修改)

Fig.3 Nuclease-mediated gene editing technologies (modified from reference [52])

有关的*ELANE*基因突变多达300余个(图1), 靶向不同的基因突变需要设计特异性的sgRNA以及DNA供体模板。由于具有特定*ELANE*基因突变的CN患者数量有限, 因此针对不同基因突变开发的基因治疗策略在临床上的应用价值十分有限。另外, HDR效率低且不稳定(0.45%~57.00%), 进一步限制了其在临床上的应用^[55]。

为了开发可以治疗CN的通用型基因编辑策略, 哈佛医学院的BAUER教授团队^[30]通过对*ELANE*基因整个外显子区域进行高通量文库筛选, 发现靶向*ELANE*基因早期外显子(1~3号外显子)的基因编辑可以产生移码突变, 并能触发无义介导的mRNA降解(nonsense-mediated decay, NMD)进而降低*ELANE*蛋白的表达; 而造血干细胞在不表达或者低表达Elastase蛋白的情况下仍然能正常发育为具有完整功能的中性粒细胞^[56-57]。无独有偶, 德国蒂宾根大学的SKOKOWA教授^[58]也报道了类似的基因治疗策略。除了靶向*ELANE*基因早期外显子之外, BAUER教授团队^[30]还发现, 在*ELANE*基因晚期外显子(4号外显子末端和5号外显子)引入缺失2个碱基的移码突变可以显著降低*ELANE* mRNA的翻译效率, 降低*ELANE*突变蛋白的表达水平。理论上, 上述两种方法对*ELANE*基因所有的致病突变都具有治疗效果, 因此具有很高的临床应用价值。

*HAXI*基因是CN的另一个重要的致病基因^[59]。与*ELANE*基因突变的遗传模式不同, *HAXI*基因突变为常染色体隐性遗传, 因此导入正常的*HAXI*基因理论上就可以恢复CN的临床表型, 达到治疗目的。来自日本东京大学的研究团队发现使用慢病毒载体将*HAXI*正常基因型cDNA导入CN患者来源的细胞中, 可以有效恢复中性粒细胞的发育^[60]。此外, 哈佛医学院的KLUSMANN教授^[61]还尝试利用HDR方式在患者来源的诱导多功能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)模型中对*HAXI*基因突变(*HAXI*^{W4X})进行修复, 也取得了良好的治疗效果。

5.2 单碱基编辑和先导基因编辑系统在CN基因治疗中的潜在应用

催化受损的SpCas9核酸酶(dCas9或nCAs9)还可以与碱基修饰酶(胞苷脱氨酶或腺嘌呤脱氨酶)结合构建胞嘧啶碱基编辑器(C:G-to-T:A Base Editor, CBE)或腺嘌呤碱基编辑器(A:T-to-G:C Base Editor, ABE)^[62-63]。CBE可以将C•G碱基对转换为T•A碱基

对, ABE可以将A•T碱基对转变成G•C碱基对。因此, 现有的单碱基编辑可以介导4种单碱基转换, 包括C到T、A到G、T到C以及G到A。在单碱基编辑器出现之前, 在基因组中引入精确的点突变只能通过HDR来实现, 然而HDR仅发生在细胞周期的G₂和S期。为了进一步扩大基因编辑的应用范围, 哈佛大学的研究者开发了先导编辑器(prime editor), 它可以实现所有12种可能的碱基替换或转换以及多达44个碱基的基因插入和80个碱基的基因删除^[64-65]。有关CRISPR/Cas基因编辑的基本原理及其在生物医学研究中的应用, 请参考其他综述^[45,66-67]。

由于仍有部分CN患者的患病机制尚未被阐明, 仍有尚未发现的点突变和移码突变等, 所以新开发的单碱基编辑和先导基因编辑系统为CN的基因治疗提供了新的思路。虽然这些新工具的治疗潜力已经在多项研究中得到证实, 但正如CRISPR-Cas9核酸酶和之前的其他基因编辑模式一样, 新技术的临床应用在安全性和体内疗效方面仍面临很多挑战^[68-69]。比如碱基编辑有时会在目标碱基上产生错误的编辑, 或者通过对目标序列中的非目标碱基的编辑而产生旁观者的突变, 而先导编辑虽然有更高的准确率和更低的Indels频率, 但其效率不高。基因编辑疗法的长期副作用的主要关注点在癌变或癌前病变的脱靶编辑^[70]。

6 总结与展望

自上世纪80年代以来, CN在疾病诊断、遗传学和分子机制方面已经取得了快速进展。尽管重组G-CSF补充治疗和异基因造血干细胞移植显著提高了CN患者的存活率(>80%), 但会显著增加患者出现继发性骨髓增生综合征或AML的风险。CN的分子机制不明确严重制约了药物或基因治疗的研究。携带特定基因突变的患者来源的iPSC或者采用CRISPR基因编辑技术在正常人造血干细胞中模拟基因突变可以为CN的分子机制研究提供理想的细胞模型^[28,71]。携带*ELANE*基因突变的iPSC研究表明, 中性粒细胞弹性蛋白酶抑制剂sivelestat可以促进早幼粒细胞向成熟的中性粒细胞分化^[28]。因此, sivelestat可能是CN的一个替代或辅助治疗。此外, 利用基因编辑技术将CN患者来源的造血干细胞进行突变修复再结合自体造血干细胞移植在理论上可以解决所有的遗传性血液系统疾病, 尽管将造血干细胞基因

治疗商业化仍然具有很高的挑战性。

参考文献 (References)

- [1] OLOFSEN P A, FATRAI S, VAN STRIEN P M H, et al. Malignant transformation involving CXXC4 mutations identified in a leukemic progression model of severe congenital neutropenia [J]. *Cell Rep Med*, 2020, doi: 10.1016/j.xcrm.2020.100074.
- [2] SKOKOWA J, DALE D C, TOUW I P, et al. Severe congenital neutropenias [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2017, doi: 10.1038/nrdp.2017.32.
- [3] KOCH C, SAMAREH B, MORISHIMA T, et al. GM-CSF treatment is not effective in congenital neutropenia patients due to its inability to activate NAMPT signaling [J]. *Ann Hematol*, 2017, doi: 10.1007/s00277-016-2894-5.
- [4] ROTULO G A, BEAUPAIN B, RIALLAND F, et al. HSCT may lower leukemia risk in ELANE neutropenia: a before-after study from the French Severe Congenital Neutropenia Registry [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2020, doi: 10.1038/s41409-020-0800-1.
- [5] HIDALGO A, CHILVERS E R, SUMMERS C, et al. The neutrophil life cycle [J]. *Trends Immunol*, 2019, doi: 10.1016/j.it.2019.04.013.
- [6] SKOKOWA J, GERMESHAUSEN M, ZEIDLER C, et al. Severe congenital neutropenia: inheritance and pathophysiology [J]. *Curr Opin Hematol*, 2007, doi: 10.1097/00062752-200701000-00006.
- [7] DONADIEU J, BEAUPAIN B, MAHLAOUI N, et al. Epidemiology of congenital neutropenia [J]. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2013, doi: 10.1016/j.hoc.2012.11.003.
- [8] CARLSSON G, FASTH A, BERGLOF E, et al. Incidence of severe congenital neutropenia in Sweden and risk of evolution to myelodysplastic syndrome/leukaemia [J]. *Br J Haematol*, 2012, doi: 10.1111/j.1365-2141.2012.09171.x.
- [9] SPERR W R, HERNDLHOFFER S, GLEIXNER K, et al. Intensive consolidation with G-CSF support: Tolerability, safety, reduced hospitalization, and efficacy in acute myeloid leukemia patients ≥ 60 years [J]. *Am J Hematol*, 2017, doi: 10.1002/ajh.24847.
- [10] DONADIEU J, FENNETEAU O, BEAUPAIN B, et al. Congenital neutropenia: diagnosis, molecular bases and patient management [J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2011, 6: 26.
- [11] DALE D C, BOLYARD A, MARRERO T, et al. Long-term effects of G-CSF therapy in cyclic neutropenia [J]. *N Engl J Med*, 2017, doi: 10.1186/1750-1172-6-26.
- [12] SILVINATO A, BERNARDO W M, FLORIANO I, et al. Neonatal sepsis with neutropenia: granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) [J]. *Rev Assoc Med Bras*, 2020, doi: 10.1590/1806-9282.66.1.3.
- [13] ROSENBERG P S, ALTER B P, BOLYARD A A, et al. The incidence of leukemia and mortality from sepsis in patients with severe congenital neutropenia receiving long-term G-CSF therapy [J]. *Blood*, 2006, doi: 10.1182/blood-2005-11-4370.
- [14] LYMAN G H, YAU L, NAKOV R, et al. Overall survival and risk of second malignancies with cancer chemotherapy and G-CSF support [J]. *Ann Oncol*, 2018, doi: 10.1093/annonc/mdy311.
- [15] ARUN A K, SENTHAMIZHSELVI A, HEMAMALINI S, et al. Spectrum of ELANE mutations in congenital neutropenia: a single-centre study in patients of Indian origin [J]. *J Clin Pathol*, 2018, doi: 10.1136/jclinpath-2018-205235.
- [16] MAKARYAN V, ZEIDLER C, BOLYARD A A, et al. The diversity of mutations and clinical outcomes for ELANE-associated neutropenia [J]. *Curr Opin Hematol*, 2015, doi: 10.1097/MOH.000000000000105.
- [17] KUMAR S, GUPTA E, KAUSHIK S, et al. Neutrophil extracellular traps: formation and involvement in disease progression [J]. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 2018, 17(3): 208-20.
- [18] STENSON P D, MORT M, BALL E V, et al. The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies [J]. *Hum Genet*, 2017, doi: 10.1007/s00439-017-1779-6.
- [19] KLEIN C. Kostmann's disease and HCLS1-associated protein X-1 (HAX1) [J]. *J Clin Immunol*, 2017, doi: 10.1007/s10875-016-0358-2.
- [20] SKOKOWA J, KLIMIANKOU M, KLIMENKOVA O, et al. Interactions among HCLS1, HAX1 and LEF-1 proteins are essential for G-CSF-triggered granulopoiesis [J]. *Nat Med*, 2012, doi: 10.1038/nm.2958.
- [21] SKOKOWA J, WELTE K. Defective G-CSFR signaling pathways in congenital neutropenia [J]. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2013, doi: 10.1016/j.hoc.2012.11.001.
- [22] MASSAAD M J, RAMESH N, GEHA R S. Wiskott-Aldrich syndrome: a comprehensive review [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2013, doi: 10.1111/nyas.12049.
- [23] CHOU J Y, CHO J H, KIM G Y, et al. Molecular biology and gene therapy for glycogen storage disease type Ib [J]. *J Inher Metab Dis*, 2018, doi: 10.1007/s10545-018-0180-5.
- [24] MCDERMOTT D H, MURPHY P M. WHIM syndrome: immunopathogenesis, treatment and cure strategies [J]. *Immunol Rev*, 2019, doi: 10.1111/imr.12719.
- [25] AKDOGAN N, KINDIS E, BOSTAN E, et al. Poikiloderma with neutropenia, clericuzio-type accompanied by loss of digits due to severe osteomyelitis [J]. *J Clin Immunol*, 2020, doi: 10.1007/s10875-020-00815-5.
- [26] MIR P, KLIMIANKOU M, FINDIK B, et al. New insights into the pathomechanism of cyclic neutropenia [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2020, doi: 10.1111/nyas.14309.
- [27] TIDWELL T, WECHSLER J, NAYAK R C, et al. Neutropenia-associated *ELANE* mutations disrupting translation initiation produce novel neutrophil elastase isoforms [J]. *Blood*, 2014, doi: 10.1182/blood-2013-07-513242.
- [28] NAYAK R C, TRUMP L R, ARONOW B J, et al. Pathogenesis of *ELANE*-mutant severe neutropenia revealed by induced pluripotent stem cells [J]. *J Clin Invest*, 2015, doi: 10.1172/JCI80924.
- [29] NUSTEDE R, KLIMIANKOU M, KLIMENKOVA O, et al. ELANE mutant-specific activation of different UPR pathways in congenital neutropenia [J]. *Br J Haematol*, 2016, doi: 10.1111/bjh.13823.
- [30] RAO S, YAO Y, SOARES DE BRITO J, et al. Dissecting *ELANE* neutropenia pathogenicity by human HSC gene editing [J]. *Cell Stem Cell*, 2021, doi: 10.1016/j.stem.2020.12.015.
- [31] TANIMURA A, MIYOSHI K, HORIGUCHI T, et al. Mitochondrial activity and unfolded protein response are required for

- neutrophil differentiation [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, doi: 10.1159/000491464.
- [32] GARG B, MEHTA H M, WANG B, et al. Inducible expression of a disease-associated *ELANE* mutation impairs granulocytic differentiation, without eliciting an unfolded protein response [J]. *J Biol Chem*, 2020, doi: 10.1074/jbc.RA120.012366.
- [33] FADEEL B, GARWICZ D, CARLSSON G, et al. Kostmann disease and other forms of severe congenital neutropenia [J]. *Acta Paediatr*, 2021, doi: 10.1111/apa.16005.
- [34] CARIO G, SKOKOWA J, WANG Z, et al. Heterogeneous expression pattern of pro- and anti-apoptotic factors in myeloid progenitor cells of patients with severe congenital neutropenia treated with granulocyte colony-stimulating factor [J]. *Br J Haematol*, 2005, doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05428.x.
- [35] BOZTUG K, JARVINEN P M, SALZER E, et al. JAGN1 deficiency causes aberrant myeloid cell homeostasis and congenital neutropenia [J]. *Nat Genet*, 2014, doi: 10.1038/ng.3069.
- [36] SKOKOWA J, WELTE K. Dysregulation of myeloid-specific transcription factors in congenital neutropenia [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04963.x.
- [37] DONADIEU J, BEAUPAIN B, FENNETEAU O, et al. Congenital neutropenia in the era of genomics: classification, diagnosis, and natural history [J]. *Br J Haematol*, 2017, doi: 10.1111/bjh.14887.
- [38] HIRAI H, YOKOTA A, TAMURA A, et al. Non-steady-state hematopoiesis regulated by the C/EBP β transcription factor [J]. *Cancer Sci*, 2015, doi: 10.1111/cas.12690.
- [39] WOLFF L, HUMENIUK R. Concise review: erythroid versus myeloid lineage commitment: regulating the master regulators [J]. *Stem Cells*, 2013, doi: 10.1002/stem.1379.
- [40] BUITENHUIS M, VAN DEUTEKOM H W, VERHAGEN L P, et al. Differential regulation of granulopoiesis by the basic helix-loop-helix transcriptional inhibitors Id1 and Id2 [J]. *Blood*, 2005, doi: 10.1182/blood-2004-12-4883.
- [41] BARRIOS L, AGUSTINI M I, POLETTI O H, et al. Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) on murine bone marrow and spleen erythropoiesis [J]. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam*, 1998, 48(1): 18-24.
- [42] DONINI M, FONTANA S, SAVOLDI G, et al. G-CSF treatment of severe congenital neutropenia reverses neutropenia but does not correct the underlying functional deficiency of the neutrophil in defending against microorganisms [J]. *Blood*, 2007, doi: 10.1182/blood-2006-09-045427.
- [43] ZEIDLER C, WELTE K, BARAK Y, et al. Stem cell transplantation in patients with severe congenital neutropenia without evidence of leukemic transformation [J]. *Blood*, 2000, 95(4): 1195-8.
- [44] CONNELLY J A, CHOI S W, LEVINE J E. Hematopoietic stem cell transplantation for severe congenital neutropenia [J]. *Curr Opin Hematol*, 2012, doi: 10.1097/MOH.0b013e32834da96e.
- [45] ANZALONE A V, KOBLAN L W, LIU D R. Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, doi: 10.1038/s41587-020-0561-9.
- [46] MEISEL R. CRISPR-Cas9 gene editing for sickle cell disease and β -Thalassemia [J]. *N Engl J Med*, 2020, doi: 10.1056/NEJMc2103481.
- [47] NEWBY G A, YEN J S, WOODARD K J, et al. Base editing of hematopoietic stem cells rescues sickle cell disease in mice [J]. *Nature*, 2021, doi: 10.1038/s41586-021-03609-w.
- [48] CAPECCHI M R. Altering the genome by homologous recombination [J]. *Science*, 1989, doi: 10.1126/science.2660260.
- [49] RANJHA L, HOWARD S M, CEJKA P. Main steps in DNA double-strand break repair: an introduction to homologous recombination and related processes [J]. *Chromosoma*, 2018, doi: 10.1007/s00412-017-0658-1.
- [50] SHEN M W, ARBAB M, HSU J Y, et al. Predictable and precise template-free CRISPR editing of pathogenic variants [J]. *Nature*, 2018, doi: 10.1038/s41586-018-0686-x.
- [51] MCVEY M, LEE S E. MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings [J]. *Trends Genet*, 2008, doi: 10.1016/j.tig.2008.08.007.
- [52] RAO S, YAO Y, BAUER D E. Editing GWAS: experimental approaches to dissect and exploit disease-associated genetic variation [J]. *Genome Med*, 2021, doi: 10.1186/s13073-021-00857-3.
- [53] GERMESHAUSEN M, DEERBERG S, PETER Y, et al. The spectrum of *ELANE* mutations and their implications in severe congenital and cyclic neutropenia [J]. *Hum Mutat*, 2013, doi: 10.1002/humu.22308.
- [54] TRAN N T, GRAF R, WULF-GOLDENBERG A, et al. CRISPR-Cas9-mediated *ELANE* mutation correction in hematopoietic stem and progenitor cells to treat severe congenital neutropenia [J]. *Mol Ther*, 2020, doi: 10.1016/j.jymthe.2020.08.004.
- [55] NIU X, HE W, SONG B, et al. Combining single strand oligodeoxynucleotides and CRISPR/Cas9 to correct gene mutations in beta-thalassemia-induced pluripotent stem cells [J]. *J Biol Chem*, 2016, doi: 10.1074/jbc.M116.719237.
- [56] HORWITZ M S. Neutrophil elastase: nonsense lost in translation [J]. *Cell Stem Cell*, 2021, doi: 10.1016/j.stem.2021.04.007.
- [57] SKOKOWA J. Circumventing mutation to nix neutropenia [J]. *N Engl J Med*, 2021, doi: 10.1056/NEJMcibr2102952.
- [58] NASRI M, RITTER M, MIR P, et al. CRISPR/Cas9-mediated *ELANE* knockout enables neutrophilic maturation of primary hematopoietic stem and progenitor cells and induced pluripotent stem cells of severe congenital neutropenia patients [J]. *Haematologica*, 2020, doi: 10.3324/haematol.2019.221804.
- [59] WAKULA M, BALCERAK A, RUBEL T, et al. The interactome of multifunctional HAX1 protein suggests its role in the regulation of energy metabolism, de-aggregation, cytoskeleton organization and RNA-processing [J]. *Biosci Rep*, 2020, doi: 10.1042/BSR20203094.
- [60] MORISHIMA T, WATANABE K, NIWA A, et al. Genetic correction of *HAX1* in induced pluripotent stem cells from a patient with severe congenital neutropenia improves defective granulopoiesis [J]. *Haematologica*, 2014, doi: 10.3324/haematol.2013.083873.
- [61] PITTERMANN E, LACHMANN N, MACLEAN G, et al. Gene correction of *HAX1* reversed Kostmann disease phenotype in patient-specific induced pluripotent stem cells [J]. *Blood Adv*, 2017, doi: 10.1182/bloodadvances.2016003798.
- [62] KOMOR A C, KIM Y B, PACKER M S, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage [J]. *Nature*, 2016, doi: 10.1038/nature17946.
- [63] GAUDELLI N M, KOMOR A C, REES H A, et al. Programmable base editing of A*T to G*C in genomic DNA without DNA

- cleavage [J]. *Nature*, 2017, doi: 10.1038/nature24644.
- [64] ANZALONE A V, RANDOLPH P B, DAVIS J R, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA [J]. *Nature*, 2019, doi: 10.1038/s41586-019-1711-4.
- [65] KIM H K, YU G, PARK J, et al. Predicting the efficiency of prime editing guide RNAs in human cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2021, doi: 10.1038/s41587-020-0677-y.
- [66] WU W Y, LEBBINK J H G, KANAAR R, et al. Genome editing by natural and engineered CRISPR-associated nucleases [J]. *Nat Chem Biol*, 2018, doi: 10.1038/s41589-018-0080-x.
- [67] PICKAR-OLIVER A, GERSBACH C A. The next generation of CRISPR-Cas technologies and applications [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, doi: 10.1038/s41580-019-0131-5.
- [68] ZEBALLOS C M, GAJ T. Next-generation CRISPR technologies and their applications in gene and cell therapy [J]. *Trends Biotechnol*, 2021, doi: 10.1016/j.tibtech.2020.10.010.
- [69] ANTONIOU P, MICCIO A, BRUSSON M. Base and prime editing technologies for blood disorders [J]. *Front Genome Ed*, 2021, doi: 10.3389/fgeed.2021.618406.
- [70] NEWBY G A, LIU D R. *In vivo* somatic cell base editing and prime editing [J]. *Mol Ther*, 2021, doi: 10.1016/j.ymthe.2021.09.002.
- [71] LACHMANN N, ACKERMANN M, FRENZEL E, et al. Large-scale hematopoietic differentiation of human induced pluripotent stem cells provides granulocytes or macrophages for cell replacement therapies [J]. *Stem Cell Rep*, 2015, doi: 10.1016/j.stemcr.2015.01.005.