

• 综述 •

范可尼贫血的研究进展

陈桂林^{1△} 刘新月¹

[关键词] 范可尼贫血;染色体断裂试验;二代测序;造血干细胞移植

doi:10.13201/j.issn.1004-2806.2020.01.017

[中图分类号] R556 [文献标志码] A

Advances in research of Fanconi anemia

Summary Fanconi anemia (FA) is a rare autosomal or X-linked recessive inheritance disease, which is characterized by progressive bone marrow failure, diversely congenital malformations, and susceptibility to both acute myeloid leukemia and solid tumors. FA proteins participate in the repair of extraordinarily deleterious lesions, inter-strand crosslinks, and maintaining genomic stability during DNA replication. Biallelic mutations in FA genes disrupt the FA pathway, which lead to dysfunction of the hematopoietic stem and progenitor cells and susceptibility to acute myeloid leukemia and solid tumors, as well as congenital abnormalities. Usually, the FA laboratory diagnosis relies on chromosomal breakage test, gene mutation analysis and bone marrow chromosome analysis. At present, high throughput second generation sequencing technique is commonly used in clinical practice. To date, researchers have identified 22 FA subtypes. Generally, the FA treatment includes androgen therapy, hematopoietic stem cell transplantation and gene therapy. This review describes the research progress of diagnosis and treatment of FA.

Key words Fanconi anemia; chromosomal breakage test; second generation sequencing; hematopoietic stem cell transplantation

范可尼贫血(Fanconi anemia, FA)是一种罕见的常染色体或X染色体隐性遗传性疾病,其发病率为(1~5)/10⁷,为先天性造血衰竭性疾病中最常见的一种,主要与基因组的不稳定性有关。现已发现22种FA亚型,仅FANCB亚型为X染色体隐性遗传^[1]。FA传统上被认为是一种儿科疾病,因文献中报道FA的诊断中位年龄在7岁以下,只有9%的患者发生在成年^[2]。FA临床表现异质性明显,主要有骨髓造血衰竭、先天性畸形(如畸形手臂、身材矮小、心肾畸形等)、性腺功能减退、听力下降及皮肤色素过度沉着等,并极易合并各种恶性肿瘤。其中,FA患者发生急性髓性白血病的概率是普通人群的700倍^[3]。随着对FA发病机制研究的不断深入,FA的诊治方法也取得了一定的进展,下面将近年来FA的研究进展综述如下。

1 发病机制

FA患者细胞对二环氧丁烷(DEB)、丝裂霉素(MMC)等DNA交联剂高度敏感,说明FA患者的DNA损伤修复功能出现异常^[4]。目前已发现22种致病基因(FANCA、B、C、D1、D2、E、F、G、I、J、L、M、N、O、P、Q、R、S、T、U、V与W),每一个致病基因对应一种亚型(表1)。

FA每个亚型均对DNA交联剂敏感,并且每

个亚型具有相似的临床症状,这提示FA基因编码的产物可能在同一信号通路中起作用。研究证实,FA蛋白确实参与同一通路,人们将这一通路命名为FA通路,考虑到有些FA蛋白是BRCA相关蛋白,又称为FA/BRCA通路,该通路的激活由DNA复制或DNA损伤诱发,尤其是由DNA交联剂引发的损伤。在此过程中,以FANCL为催化亚基的范素连接酶E3,催化FANCD2及其类似物FANCI。在此之后,单范素化的FANCD2和FANCI形成核病灶,并与许多其他FA和非FA蛋白相互作用,修复受损的DNA。FANCD2的单范素化是这一途径的中心,并被认为是具有代表性的通路激活事件。

由于交联DNA阻碍转录和复制,因此在细胞周期的各个阶段都需要去除链间交联(interstrand crosslinks, ICLs),FA通路在链间交联ICLs以及在DNA复制过程中维持基因组稳定等方面起关键作用。FA基因在ICLs修复中协同工作,协调多种修复过程,如跨损伤合成、同源重组以及非同源端连接通路等,共同维持基因组的稳定。FA基因突变引起该通路异常可导致骨髓衰竭、各种恶性肿瘤及先天性多发畸形等^[5]。

造血干细胞(HSPCs)的缺陷被认为是FA骨髓衰竭和白血病的主要原因^[6]。最新的证据表明,能量代谢失调是FA HSPCs缺陷的可能机制之一^[7]。例如,与野生型HSPCs相比,相对于糖酵解

¹华中科技大学同济医学院附属协和医院血液病研究所(武汉,430022)

[△]现在单位为武汉市肺科医院(武汉,430000)

通信作者:刘新月, E-mail: lxy87306548@sina.com

表 1 FA 发病相关的基因信息

FA 分型	基因位点	染色体位点	FA 患者百分比/%	编码蛋白/Kd
FA-A	FANCA(2175)	16q24.3	64.0	163
FA-B	FANCB(2187)	Xp22.31	2.0	95
FA-C	FANCC(2176)	9q22.3	12.0	63
FA-D1	FANCD1/BRCA2(675)	13q12.13	2.0	380
FA-D2	FANCD2(2177)	3p25.3	4.0	155 162
FA-E	FANCE(2178)	6p21.22	1.0	60
FA-F	FANCF(2188)	11p15	2.0	42
FA-G	FANCG/XRCC9(2189)	9p13	8.0	68
FA-I	FANCI(55215)	15q26.1	1.0	150
FA-J	FANCJ/BRIP1(83990)	17q23.2	2.0	130
FA-L	FANCL(55120)	2p16.1	0.4	43
FA-M	FANCM(57697)	14q21.3	0.1	250
FA-N	FANCN/PALB2(79728)	16p12	0.7	130
FA-O	RAD51C(5889)	17q23	0.1	47
FA-P	FANCP/SLX4(84464)	16p13.3	0.5	200
FA-Q	FANCQ/ERCC4(2072)	16p13.12	0.1	101
FA-R	FANCR/RAD51(5888)	15q15.1	0.1	45
FA-S	FANCS/BRCA1(672)	17q21.31	0.1	200
FA-T	FANCT/UBE2T(29089)	1q32.1	<0.1	22.5
FA-U	XRCC2	7q36.1	<0.1	34
FA-V	REV7, MAD2L2	1p31	<0.1	24
FA-W	—	16q23.1	<0.1	~90

的能量代谢而言, FA HSPCs 更依赖氧化磷酸化 (OXPHOS), 并通过 p53 依赖机制对氧化应激进行糖酵解至 OXPHOS 转换^[6], 从而减弱戊糖磷酸途径和细胞抗氧化功能, 进而增加 DNA 损伤及 HSPCs 的耗竭。然而, p53 如何调节 FA HSPCs 中的能量代谢尚不清楚。此外, 有研究支持 FA 患者的可用 HSPCs 池在出生时就已经受到损害, 且 FA 骨髓的增殖不如正常骨髓^[8], G0/G1 期细胞增多, 磷酸化 H2AX 的存在表明了 DNA 损伤信号的增加。人胚胎干细胞中 FANCA 或 FANCD2 的 shRNA 表达下降导致造血祖细胞及其分化的子代细胞数量显著减少, 将祖细胞暴露于交联剂中会加剧增殖缺陷。这些发现将 FA 通路的 ICLs 修复功能与其在干细胞发育中的作用联系起来^[8]。

另外, 炎症病理参与 FA 骨髓衰竭已被报道, 但其机制尚不清楚, 可能与 NK 细胞数量减少和 (或) NK 细胞活性受损, 以及其他免疫异常有关^[9]。

FA 患者对癌症具有易感性, 尤其是急性髓性白血病和鳞状细胞癌, 急性髓性白血病的易感性可能与骨髓衰竭的造血干细胞不稳定有关, 头颈部鳞状细胞癌的易感性可能是因为 FA 患者更易合并有人类乳头瘤病毒的感染。研究发现下游通路基因突变的患者, 如 FANCJ、FANCD1/BRCA2m、FANCN/PALB2, 肿瘤发生的时间更早, 且病情更重。其中, FANCD1/BRCA2m 和 FANCN/PALB2 患者均为极早 (<2 岁) 胚胎性肿瘤^[8]。FA 信号通

路与人类癌症之间的最初联系可以追溯到 1971 年, 直到最近 FA 的这方面研究才有迅速的进展。许多研究已经证明了携带生殖系 FA 基因突变的非 FA 癌症患者与人类癌症发展之间的关系^[10]。这表明 FA 抑癌信号在这些肿瘤的发生过程中起着至关重要的作用, 因为这些突变早在胚胎发生之初就已经存在。通过基因咨询, 了解这一点对预防癌症非常有用。一定数量的 mtFANCS 或 mtFANCD1 携带者接受预防性乳房切除和 (或) 卵巢切除术, 可以阻断乳腺癌和卵巢癌易感性。最近的文献报道了 FA 信号在线粒体中的参与, 以及 FANCD2-V2 在正常细胞中的表达高于相应的恶性细胞, 因此, 可以认为 FA 信号从肿瘤转化的开始就对人类细胞起到了很大的保护作用。

此外, FA 蛋白还参与氧化还原、细胞端粒酶缩短速度等过程, 其异常可能与先天性多发畸形、皮肤色素过度沉着等有关。但目前而言, FA 蛋白的作用机制仍未完全阐明, 各个 FA 蛋白又可能独立于 FA 信号通路在其他信号通路中起作用。因此, 关于 FA 通路及其各蛋白之间的相互作用需要更多的科学研究。

2 诊断方法

FA 患者临床表现异质性明显, 经常累及多个系统, 年幼时可出现一系或多系血细胞减少, 伴先天多发畸形 (如畸形手臂、心肾畸形等), 存在智力发育障碍, 早期发生实体肿瘤等。典型患者不易漏

诊,但约 1/5 的 FA 患者无上述畸形,仅表现为再生障碍性贫血或是实体肿瘤,容易漏诊和误诊,错过最佳治疗时机。因此,对 FA 患者应该强调早发现,早治疗。FA 常用的实验室检查方法有染色体断裂试验、基因突变分析、流式细胞仪检测细胞周期、彗星试验等。

染色体断裂试验是目前诊断 FA 的金标准,FA 患者的细胞对 MMC、DEB 等 DNA 交联剂高度敏感,经 DNA 交联剂处理的 FA 患者外周血淋巴细胞易发生染色体断裂^[11]。然而,MMC/DEB 试验在体细胞嵌合患者中会出现假阴性,在 Nijmegen breakage 综合征患者中会出现假阳性,应注意鉴别诊断。目前,对于 FA 疾病的认识已经从染色体水平发展到基因水平。基因检测对于诊断 FA 以及明确导致发病的特定突变基因至关重要。目前临床上常用的方法是高通量二代测序技术,具有速度快、准确率高、覆盖广等优点。其中,FA-A、FA-C 和 FA-G 是 FA 中最常见的突变类型,三者约占所有 FA 患者的 84%。FA-B、FA-D1、FA-D2、FA-E 和 FA-F 突变的发生率占有所有 FA 患者的 11%。其中,FA-B 为唯一的 X 染色体隐性遗传基因^[12]。由于 BRCA2 与 FA-D1 基因同源,所以 FA 中的 FA-D1 型易患乳腺癌及卵巢癌。FA-D2 编码的蛋白质在 FA 信号通路所介导的 DNA 损伤修复途径中起重要作用,FA-E 和 FA-F 编码的蛋白质参与了 FA 修复途径中核心复合物的形成^[12]。FA 患者中 FA-I、FA-J、FA-L、FA-M、FA-N、FA-O、FA-P、FA-Q、FA-S 以及最近报道的 FA-R 和 FA-T 突变发生率均为 5%左右^[13]。此外,流式细胞仪检测细胞周期和彗星试验也可用于 FA 患者的检测,但在临床上应用相对较少。

3 治疗

骨髓衰竭是 FA 患者死亡的主要原因,仅少数患者可能死于非血液系统疾病,如实体肿瘤或先天性器官异常等。在还有残存造血功能的早期,约 3/4 的患者对雄激素有反应,建议将羟甲烯龙与泼尼松联合使用。使用粒细胞集落刺激因子、促红细胞生成素、白细胞介素-3 等造血细胞刺激因子可对部分患者有一定疗效,粒细胞集落刺激因子的使用有益于粒细胞缺乏合并感染的患者。

造血干细胞移植是 FA 患者长期缓解的唯一治疗方法。然而,造血干细胞移植虽能解决骨髓衰竭的问题,但不能预防肿瘤的发生。对于移植后的 FA 患者,仍有可能发展为头颈部、食管、胃肠、外阴和肛门癌,发病率约为正常患者的 50 倍^[14]。关于造血干细胞移植预处理方案的问题,近年来有了新的突破。早期的预处理方案主要为大剂量环磷酰胺和全身照射,但因其毒性强,移植相关死亡率高,限制了其使用。20 世纪初,以氟达拉滨为基础的预

处理方案开始应用于临床,并大大提高了造血干细胞移植的疗效。MacMillan 等^[15] 研究表明,氟达拉滨预处理方案具有移植相关死亡率低、生存率高等优势,这是近年来 FA 治疗方面的重要进展。此外,有研究表明 TCR $\alpha\beta^+$ /CD19⁺ 细胞去除的造血干细胞移植具有移植物抗宿主病发生率低、可早期停用免疫抑制剂、造血及免疫重建快、EB 病毒感染率低等优势,不过仍存在一些问题,如植入失败率较高、干细胞数量要求较高、费用较大等^[16-18]。

FA 属于造血干细胞疾病,随着对其发病机制研究的不断深入,FA 患者基因疗法成为可能,用逆转录病毒载体将正常的 FA 基因转导至 FA 病变细胞,可产生对 DEB 等 DNA 交联剂抵抗的矫正表型,基因治疗可避免造血干细胞移植的主要不良作用,如移植物抗宿主病、内分泌疾病和实体恶性肿瘤等等,成为治疗 FA 的一条有希望的途径^[19],目前仍处于临床研究阶段。虽然在了解 FA 及其临床症状方面已经取得了相当大的进展,但是 FA 相关的许多发育问题的遗传和分子机制还需要进一步阐明。

参考文献

- [1] Joenje H, Patel KJ. The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia[J]. *Nat Rev Genet*, 2001, 2:446-457.
- [2] Alter BP. Diagnosis, genetics, and management of inherited bone marrow failure syndromes[J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2007, 2007:29-39.
- [3] Nepal M, Che R, Zhang J, et al. Fanconi Anemia Signaling and Cancer[J]. *Trends Cancer*, 2017, 3:840-856.
- [4] Howlett NG, Taniguchi T, Olson S, et al. Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia[J]. *Science*, 2002, 297:606-609.
- [5] Auerbach AD. Fanconi anemia and its diagnosis[J]. *Mutat Res*, 2009, 668:4-10.
- [6] Du W, Amarachintha S, Wilson AF, et al. SCO2 mediates oxidative stress-induced glycolysis to oxidative phosphorylation switch in hematopoietic stem cells[J]. *Stem Cells*, 2016, 34:960-971.
- [7] Li X, Wu L, Zopp M, et al. p53-TIGAR axis-mediated glycolytic suppression attenuates DNA damage and genomic instability in Fanconi anemia hematopoietic stem cells[J]. *Stem Cells*, 2019, 37:937-947.
- [8] Kottmann MC, Smogorzewska A. Fanconi anaemia and the repair of Watson and Crick DNA crosslinks[J]. *Nature*, 2013, 493:356-363.
- [9] Myers KC, Sauter S, Zhang X, et al. Impaired immune function in children and adults with Fanconi anemia[J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2017, 64(11). doi:10.1002/pbc.26599. Epub 2017 May 30.
- [10] Rahman N, Seal S, Thompson D, et al. PALB2, which

- encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene[J]. *Nat Genet*, 2007, 39: 165-167.
- [11] Oostra AB, Nieuwint AW, Joenje H, et al. Diagnosis of fanconi anemia: chromosomal breakage analysis[J]. *Ann Hematol*, 2012, 91: 2387-2391.
- [12] 王冉, 姚东亚, 盛光耀. 范可尼贫血诊治研究进展[J]. *世界临床药物*, 2017, 38(6): 377-380.
- [13] Lim ET, Wurtz P, Havulinna AS, et al. Distribution and medical impact of loss-of-function variants in the Finnish founder population[J]. *PLoS Genet*, 2014, 10: e1004494.
- [14] Garcia MJ, Fernandez V, Osorio A, et al. Analysis of FANCB and FANCN/PALB2 Fanconi Anemia genes in BRCA1/2-negative Spanish breast cancer families [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2009, 113: 545-551.
- [15] MacMillan ML, DeFor TE, Young JA, et al. Alternative donor hematopoietic cell transplantation for Fanconi anemia[J]. *Blood*, 2015, 125: 3798-804.
- [16] 杜振兰, 司英健, 陈伟, 等. TCR $\alpha\beta$ +CD19+ 细胞去除的亲缘单倍型移植挽救性治疗范可尼贫血转急性髓系白血病 1 例伴文献复习[J]. *中国临床医生杂志*, 2018, 46(11): 1291-1295.
- [17] Balashov D, Laberko A, Shcherbina A, et al. A Conditioning regimen with plerixafor is safe and improves the outcome of TCR $\alpha\beta$ (+) and CD19(+) cell-depleted stem cell transplantation in patients with Wiskott-Aldrich syndrome [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2018, 24: 1432-1440.
- [18] Shah RM, Elfeky R, Nademi Z, et al. T-cell receptor $\alpha\beta$ (+) and CD19(+) cell-depleted haploidentical and mismatched hematopoietic stem cell transplantation in primary immune deficiency[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 141: 1417-1426. e1.
- [19] Tolar J, Becker PS, Clapp DW, et al. Gene therapy for Fanconi anemia: one step closer to the clinic[J]. *Hum Gene Ther*, 2012, 23: 141-144.

(收稿日期: 2019-04-15)

CAR-T 细胞技术在复发或难治急性淋巴细胞白血病中的临床应用进展*

花京剩^{1△} 张剑¹ 陈苏宁¹ 仇惠英¹

[关键词] CAR-T 细胞; B 系急性淋巴细胞白血病; 复发或难治; 老年; 不良反应

doi: 10.13201/j.issn.1004-2806.2020.01.018

[中图分类号] R733.71 [文献标志码] A

Advances in clinical application of CAR-T cell technique in relapsed or refractory acute lymphoblastic leukemia

Summary In recent years, CAR-T cell therapy for B-cell hematological malignancies is a new and effective method, and has achieved promising therapeutic effects. Especially for relapsed or refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL), the remission rate can reach as high as 90%. CAR-T cell are not widely used because of their complications. CAR-T cell immunotherapy has made rapid progress in the treatment of relapsed or refractory ALL. In this paper, some advances regarding modified design of CAR structure, the results of single-target or combined target antigen therapy for relapsed or refractory ALL, universal CAR-T, relapsed ALL induction and bridging to hematopoietic stem cell transplantation, the role of CAR-T cell in treating the elderly B-lymphoblastic leukemia along with adverse events and management are reviewed.

Key words CAR-T cell; B-line acute lymphoblastic leukemia; relapse or refractory; elderly; adverse events

儿童急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)在首次复发后 5 年生存率仅 30%~50%^[1], 初诊成人 ALL 5 年生存率约 40%, 复发后的 5 年生存率仅为 10%^[2]。近几年 I 期或

II 期临床试验用嵌合抗原受体-T(CAR-T)细胞技术来治疗复发或难治的 ALL, 取得了令人印象深刻的效果。CAR-T 细胞治疗是一种基于细胞水平的靶向治疗, 这种个体化的治疗利用了人体 T 淋巴细胞的天然功能。来自患者或供体的 T 淋巴细胞经工程化改造表达特异性的 CAR 可以识别特异的肿瘤表面抗原, T 细胞活化后可以靶向攻击相关的抗原(如 CD19、CD22 等)肿瘤细胞导致细胞死亡。

* 基金项目: 江苏省科技项目(No: BE2018652)

¹ 苏州大学附属第一医院血液病研究所(江苏苏州, 215006)[△] 现在工作单位为浙江台州市立医院血液科(浙江台州, 318000)

通信作者: 仇惠英, E-mail: qiuhuiying8303@suda.edu.cn