

论著·临床研究

范可尼贫血患者临床转归与基因突变关系分析

常丽贤 任媛媛 杨文钰 张家源 万扬 刘天峰 张丽 陈晓娟 朱帅
阮敏 陈霞 刘晓明 戚本泉 张然然 邹尧 陈玉梅 竺晓凡

(中国医学科学院血液病医院血液学研究所/儿童血液病诊疗中心, 天津 300020)

[摘要] **目的** 初步探讨范可尼贫血(FA)基因突变与临床转归的关系。**方法** 回顾性分析临床严重程度及治疗均相同的6例FA患者的临床资料,均采用单细胞凝胶电泳及丝裂霉素C(MMC)诱导的染色体断裂试验进行诊断,并采用先天性骨髓衰竭性疾病的基因检测试剂盒或互补实验进行基因分型,最后综合分析FA患者治疗3、6、9、12个月的临床转归与基因突变的关系。**结果** 6例FA患者中,5例为FANCA型、1例为FANCM型,4例患者携带2种及以上FA基因突变。临床严重程度相同的FA患者中,携带FA突变基因较多的患者发病年龄较小,对药物反应较差,更易发展为重型。**结论** 同时携带两种以上FA突变基因的患者临床预后较差,应尽早进行造血干细胞移植。**[中国当代儿科杂志, 2016, 18(8): 742-745]**

[关键词] 范可尼贫血; 临床转归; 基因突变; 儿童

Association between clinical outcome and gene mutation in children with Fanconi anemia

CHANG Li-Xian, REN Ruan-Ruan, YANG Wen-Yu, ZHANG Jia-Yuan, WAN Yang, LIU Tian-Feng, ZHANG Li, CHEN Xiao-Juan, ZHU Shuai, RUAN Min, CHEN Xia, LIU Xiao-Ming, QI Ben-Quan, ZHANG Ran-Ran, ZOU Yao, CHEN Yu-Mei, ZHU Xiao-Fan. State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology and Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China (Zhu X-F, Email: xzfzhu@ihcams.ac.cn)

Abstract: Objective To investigate the association between clinical outcome and gene mutations in children with Fanconi anemia (FA). **Methods** A retrospective analysis was performed for the clinical data of six children with the same severity of FA and receiving the same treatment. At first, single cell gel electrophoresis and chromosome breakage induced by mitomycin C were performed for diagnosis. Then the gene detection kit for congenital bone marrow failure diseases or complementation test was used for genotyping of FA. Finally the association between the clinical outcome at 3, 6, 9, or 12 months after treatment and gene mutation was analyzed. **Results** Of all the six FA children, five had FANCA type disease, and one had FANCM type disease; four children carried two or more FA gene mutations. Among the children with the same severity of FA, those with more FA mutations had a younger age of onset and poorer response to medication, and tended to progress to a severe type. **Conclusions** Children carrying more than two FA mutations have a poor clinical outcome, and hematopoietic stem cell transplantation should be performed as soon as possible.

[Chin J Contemp Pediatr, 2016, 18(8): 742-745]

Key words: Fanconi anemia; Clinical outcome; Gene mutation; Child

范可尼贫血(Fanconi anemia, FA)是一种常染色体或X连锁隐性遗传性疾病,主要临床表现为先天性发育异常、进行性骨髓衰竭和早期发生

血液肿瘤或其他实体瘤^[1]。FA治疗的主要方法有口服药物(雄激素+/-糖皮质激素)、支持治疗(输注血液制品)、异基因造血干细胞移植及基因治

[收稿日期] 2016-04-25; **[接受日期]** 2016-06-16

[基金项目] 国家自然科学基金(81500156; 81170470)。

[作者简介] 常丽贤,女,博士,主治医师。

[通信作者] 竺晓凡,女,主任医师,教授。

疗等。我国 FA 的治疗仍以口服药物治疗为主,但临床分型相同的 FA 患者,即使治疗相同,其疗效亦存在差别,原因尚不完全清楚,为此我们初步分析了 6 例口服雄激素 + 糖皮质激素治疗的 FA 患者临床资料及基因分型相关内容,探讨 FA 临床进展与基因分型之间的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象及分组

回顾性分析 2013 年 9 月至 2015 年 3 月就诊于我院,经临床表现、血常规、骨髓象、单细胞凝胶电泳实验、丝裂霉素 C (mitomycin C, MMC) 诱导的染色体断裂实验、二代测序确诊为 FA,并且均为口服药物治疗的 6 例患者。6 例患者均予口服康力龙 (每次 2 mg, 每日 1 次) + 泼尼松 (每次 5 mg, 每日 1 次), 3 个月无效则停用。根据血常规,将 6 例患者分为轻、中、重度 3 组,均予门诊复诊及电话随访,中位随访时间 54 个月 (13~84 个月),并根据患者治疗后 3, 6, 9, 12 个月的血常规进行疗效评价。有效:初诊与随访时均为轻度或随访时由重度转为轻、中度以及中度转为轻度。无效:疾病分组由轻度转为中、重度,或由中度转为重度或者死亡。

FA 的诊断及分组依据 2008 年制定的 FA 诊断及分组标准^[2]进行。

1.2 单细胞凝胶电泳检测彗星细胞率

患者初诊时取静脉血 5 mL (肝素抗凝),利用密度梯度离心法进行单个核细胞分离。调整细胞最终浓度至 $10^5 \sim 10^6$ /mL,取 30 μ L 细胞悬液进行琼脂糖凝胶电泳,计算彗星细胞率。实验具体步骤及彗星细胞率的计算方法参见文献^[3-4]。彗星细胞率 >30% 可诊断 FA。

1.3 染色体断裂实验

采用 IAEA 的标准化方法^[5]进行染色体培养,24 h 后加入 MMC,继续培养 48 h,收获细胞,预固定、低渗制片,普通光镜观察,镜下计数 100 个分裂相,计数染色体畸变细胞,进行畸变率分析。如染色体畸变率 >30% 为阳性,可诊断为 FA。丝裂霉素 C 的浓度选取 0、40、80 ng/mL。每份标本分析 100 个分裂相。

1.4 FA 基因测序

利用基于第二代测序方法设计的包含 249 种

先天性骨髓衰竭性疾病的诊断试剂盒 (北京迈基诺基因科技有限责任公司),对患者外周血提取的 DNA 进行 FA 突变基因检测。对于基因检测没有纯合突变或复合杂合突变、不能进行基因分型的 FA 患者利用互补实验进行检测 (由印第安纳大学医学院赫尔曼儿科研究中心完成)。

2 结果

6 例患者的染色畸变率在 32%~39%,彗星细胞率在 39%~69% 之间,可诊断为 FA。6 例患者中男性 4 例、女性 2 例,均有畸形;中位随访时间 54 个月 (13~84 个月)。6 例 FA 患者中,5 例为 FANCA 型、1 例为 FANCM 型,4 例携带 2 种及以上 FA 基因突变。初诊时轻度、中度及重度各 2 例,初诊为轻度的患者中,治疗 12 个月随访时为轻度的患者 1 为 FANCA 基因的纯合突变,诊断为 FANCA 型;治疗 12 个月随访时为重度的患者 2,除存在 FANCA 的纯合突变、杂合突变外,还存在 FANCB 的纯合突变、FANCM 的复合杂合突变,对其父母进行验证,显示患者母亲携带有 FANCB 基因突变,对患者 2 进行互补实验,确诊为 FANCA 型。初诊为中度的两位患者中,治疗 12 个月随访为轻度的患者 3 为 FANCM 与 FANCD1 的复合杂合突变,对其父母进行验证,显示患者的 FANCM 两个突变一个来自母亲、一个来自父亲,提示患者为 FANCM 型;而治疗 12 个月随访时为重度的患者 4 却同时存在 FANCA, FANCD1, FANCD2 三种基因突变,经过验证其母亲携带 FANCA 基因的突变位点,虽然 Chr1688389826-32delGGCTGT 在 Rockefeller 大学 FA 突变数据库中未发现,但 Chr1688389829-30delCT 在此数据库中报道过 3 次,故此患者可诊断为 FANCA 型。在初诊为重度的 2 例患者中,治疗 12 个月随访为轻度的患者 5 为 FANCA 的复合杂合突变,诊断为 FANCA 型;而治疗 12 个月随访为重度的患者 6 除含有 FANCA 突变外,还存在 FANCI 的杂合突变,突变位点 FANCA Chr16883853-54delGG 在 Rockefeller 大学 FA 突变数据库中亦未发现,但 Chr16 88385351-54delGAGG 报道过 1 次,Chr16 88385351delG reported 报道过 3 次,根据相应结果分析,此患者为 FANCA 型。见表 1。

表1 6例FA患者的基因检测结果与临床特征

患者	初诊 分组	随访分组				畸形	性别	发病 年龄 (岁)	基因突变位点及类型		
		3 月	6 月	9 月	12 月						
1	L	L	L	L	L	小头畸形,左手拇指多指。	男	7	FANCA: Chr16:89879773	G>A 无义突变	hom
2	L	M	S	S	S	小头畸形,牛奶咖啡斑, 尿道下裂。	男	4	FANCA: Chr16 88385436	G>A missense A>V	hom
									Chr16 88343697	T>C missense S>G	het
									FANCB: ChrX 14781120	C>T missense V>I	hom
									FANCM: Chr14 44735218	C>G missense P>A	het
									Chr14 44714339	G>T nonsense N>N	het
									Chr14 44676037	C>T missense S>F	het
									Chr14 44720650	A>G missense I>V	het
3	M	L	L	L	L	右手拇指畸形,右手鱼际 肌发育不良。	男	7	FANCM: Chr14 44714456	A>G missense I->V	het
									Chr14 44727906	G>A missense R>Q	het
									FANCD1: Chr13 31804480	A>C missense N>H	het
									Chr13 31809463	A>C missense N>D	het
4	M	M	S	S	S	身材矮小,右手六指。	女	5	FANCA:Chr16 88389826-32	-GGGCTGT deletion frameshift	het
									FANCD1:Chr13 31809499	C>G missense H>D	het
									FANCD2: Chr3 10081532	C>T missense P>L	het
5	S	S	M	L	L	牛奶咖啡斑,小头畸形, 双手可见六指切除痕迹。	女	10	FANCA: Chr16 88343715	G>A missense R>W	het
									Chr16 88367267	G>C missense P>A	het
6	S	S	S	S	S	眼裂小,右手拇指缺如, 右手拇指挠侧外翻。	男	3	FANCA: Chr16 88389853-4	-GT deletion frameshift	het
									Chr16 88385373	-A deletion frameshift	het
									FANCI: Chr15 87636941	A>G missense I>V	het

注: [L] 轻度; [M] 中度; [S] 重度。[hom] 纯合突变; [het] 杂合突变。

3 讨论

范可尼贫血 (FA) 是一种少见的常染色体或 X 连锁隐性遗传性疾病, 是最常见的遗传性骨髓衰竭综合征, 其发病率为 1~5/100 万, 基因携带率为 1/300^[1]。FA 主要由相关基因突变所致, 最终影响 DNA 修复过程。根据突变基因种类的不同, 目前 FA 分为 FANCA, FANCB, FANCC, FANCD1, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCI, FANCI, FANCL, FANCM, FANCN, FANCO, FANCP, FANCQ 及 FANCS 等 17 种类型。不同类型的 FA 患者其临床预后存在异质性, 如 FANCO 与 FANCS 患者到目前为止未见发展为骨髓衰竭性疾病的报道^[6], 故准确的基因分型对于 FA 患者的预后判断尤为重要^[7-9]。另外, 不同的 FA 基因杂合突变可产生不同的病理生理学作用, 如 FANCD1 突变与乳腺癌的发生密切相关, FANCD2 突变与儿童 T- 急性淋巴细胞白血病和睾丸精原细胞瘤有一定关系, 单泛素化的 FANCD2 与 BCR-ABL1 激酶诱导的白血病发生相关等^[10-17]。

国外报道的 FA 基因突变多是同一个 FA 基因的纯合或复合杂合突变, 一个患者同时携带 2 种或以上 FA 突变基因的报道较少^[18]。本研究 6 例

FA 患者中, 5 例患者为 FANCA 型, 1 例患者为 FANCM 型, 4 例患者携带 2 种及以上 FA 基因突变。与国外研究不同, 可能与 FA 患者的遗传背景不同或 FA 基因突变的携带率与国外存在差异, 还需扩大样本量建立 FA 突变数据库以进一步研究。本研究显示, 治疗 12 个月时评估为重度的 3 例患者, 发病年龄较小, 均为 2 种及以上的基因突变, 提示不同的 FA 基因突变类型临床转归可能不同, 基因突变越复杂, 患者疗效可能越差, 越有可能进展为重型, 此类患者应尽早进行造血干细胞移植。

本文通过临床资料与基因测序相结合, 初步探讨了 FA 临床转归与基因分型间的关系。但范可尼贫血是一种异质性较强的先天性骨髓衰竭性疾病, 目前我国尚无 FA 的流行病学及大样本数据分析, 更没有 FA 相关突变的数据库进行参考, 还需进行多中心协作, 建立 FA 突变数据库, 为 FA 基因诊断应用于临床治疗的指导提供理论依据。

[参 考 文 献]

- [1] D'Andrea AD, Grompe M. The Fanconi anaemia/BRCA pathway[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(1): 23-34.
- [2] Blanche P. Diagnostic Evaluation of FA[M]//Mary EE, Dave

- F, Lynn F, et al. Fanconi anemia: Guidelines for diagnosis and management[M]. 3rd ed. Eugene: Fanconi Anemia Research Fund Inc, 2008: 34-53.
- [3] 张丽, 刘强, 邹尧, 等. 单细胞凝胶电泳试验在范可尼贫血诊断中的意义及其与丝裂霉素 C 试验相关性研究[J]. 中华儿科杂志, 2013, 51(2): 122-125.
- [4] 齐军元, 邵英起, 刘永泽, 等. 单个细胞凝胶电泳分析在范可尼贫血诊断中的应用[J]. 中华血液学杂志, 2006, 27(10): 690-693.
- [5] International Atomic Energy Agency. Dicentric analysis[M]/Cytogenetic analysis for radiation dose assessment: a manual. Vienna: International Atomic Energy Agency, 2001: 27-59.
- [6] Wang AT, Smogorzewska A. SnapShot: Fanconi anemia and associated proteins[J]. Cell, 2015, 160(1-2): 354-354.
- [7] Alan D, D'Andrea MD. The Fanconi anemia and breast cancer susceptibility pathway[J]. N Engl J Med, 2010, 362(20): 1901-1919.
- [8] Kutler DI, Singh B, Satagopan J, et al. A 20-year perspective on the international Fanconi anemia Registry(IFAR) [J]. Blood 2003, 101(4): 1249-1256.
- [9] Myers K, Davies SM, Harris RE, et al. The clinical phenotype of children with Fanconi anemia caused by biallelic FANCD1/BRCA2 mutations[J]. Pediatr Blood Cancer, 2012, 58(3): 462-465.
- [10] Seal S, Thompson D, Renwick A, et al. Breast Cancer Susceptibility Collaboration (UK): Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles[J]. Nat Genet, 2006, 38(11): 1239-1241.
- [11] Rahman N, Seal S, Thompson D, et al. Breast Cancer Susceptibility Collaboration (UK): PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene[J]. Nat Genet 2007, 39(2): 165-167.
- [12] Reid S, Schindler D, Hanenberg H, et al. Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer[J]. Nat Genet, 2007, 39(2): 162-164.
- [13] Wark L, Novak D, Sabbaghian N, et al. Heterozygous mutations in the PALB2 hereditary breast cancer predisposition gene impact on the three-dimensional nuclear organization of patient-derived cell lines[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2013, 52(5): 480-494.
- [14] Thompson ER, Doyle MA, Ryland GL, et al. Exome sequencing identifies rare deleterious mutations in DNA repair genes FANCC and BLM as potential breast cancer susceptibility alleles[J]. PLoS Genet, 2012, 8(9): e1002894.
- [15] Levy-Lahad E, Friedman E. Cancer risks among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers[J]. Br J Cancer, 2007, 96(1): 11-15.
- [16] Smetsers S, Muter J, Bristow C, et al. Heterozygote FANCD2 mutations associated with childhood T cell ALL and testicular seminoma[J]. Fam Cancer, 2012, 11(4): 661-665.
- [17] Koptyra M, Stoklosa T, Hoser G, et al. Monoubiquitinated Fanconi anemia D2(FANCD2-Ub) is required for BCR-ABL1 kinase-induced leukemogenesis[J]. Leukemia, 2011, 25(8): 1259-1267.
- [18] Chang L, Yuan W, Zeng H, et al. Whole exome sequencing reveals concomitant mutations of multiple FA genes in individual Fanconi anemia patients[J]. BMC Med Genomics, 2014, 7: 24.

(本文编辑: 俞燕)