

基因编辑技术在 CAR-T 治疗中的研究进展

Advances in gene editing in the treatment of CAR-T

李成功 综述;梅恒,胡豫 审阅(华中科技大学同济医学院附属协和医院血液科,湖北省肿瘤疾病细胞治疗临床医学中心,湖北 武汉 430020)

[摘要] 嵌合抗原受体 T(chimeric antigen receptor T, CAR-T)细胞是通过基因工程技术将 T 细胞改造成针对肿瘤特异性抗原的新型杀伤细胞,具有特异性强、效率高、非 MHC 限制等优点,在复发/难治性血液系统肿瘤和部分实体瘤中取得良好的治疗效果。但目前 CAR-T 细胞治疗仍面临着缺乏“现货供应”的通用型 CAR-T 细胞、抑制性免疫微环境和 T 细胞耗竭等问题。近年来,锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFNs)、转录激活子样效应因子核酸酶(transcription activator like effector nucleases,TALENs)、规律性重复短回文序列簇[clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated(Cas9), CRISPR/Cas9]等新型基因编辑技术被广泛应用于细胞免疫治疗,为解决上述问题带来了希望。本文综述了目前 CAR-T 细胞治疗的研究进展及存在问题,并探讨了 3 种主要的基因编辑技术改良 CAR-T 细胞治疗的策略,为 CAR-T 细胞的基础研究和临床治疗提供参考。

[关键词] CAR-T 细胞;基因编辑技术;CRISPR/Cas9;通用型 CAR-T 细胞;T 细胞耗竭

[中图分类号] R392.11;R392.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)03-0338-08

肿瘤的诊断、治疗和监测方法至今有限,对人类健康构成了持续威胁,导致了对其他可选择性的高效疗法的迫切需求。近年来,肿瘤的免疫疗法,包括抗 PD-1 治疗和 T 细胞过继免疫治疗,均表现出巨大的研究潜力和临床价值,成为继外科手术、放疗、化疗后第 4 种具有显著优势及临床疗效的抗肿瘤治疗方法^[1-4]。在一系列体内和体外的研究中,T 细胞的抗肿瘤作用被逐渐揭示。异基因造血干细胞移植和供体白细胞输注是临床上应用最早、目前使用最广泛的 T 细胞过继免疫治疗,但是这两种方法容易引起移植植物抗宿主病(graft-versus-host disease, GVHD),是导致患者死亡的主要原因之一^[5-6]。因此,需要一种能特异性靶向肿瘤细胞的 T 细胞来平衡细胞免疫治疗的靶向活性和脱靶毒性。基因工程技术的广泛应用允许将外来基因转入到 T 细胞,构建一种特异性靶向肿瘤相关抗原的 T 细胞。目前,最受研究者关注的基因工程 T 细胞疗法是转基因 T 细胞受体(transgenic T cell receptor, tTCR)治疗和嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)治疗^[7]。特异性靶向 B 细胞表面抗原 CD19 的 CAR-T 细胞在治疗难治性 B 细胞急性淋巴白血病(B-ALL)上取得显著疗效(CR>90%)^[8]。2017 年 8 月 30 日,第一个 CAR-T 产品 tisa-genelecleucel 获 FDA 批准上市,用于治疗儿童和青年人难治/复发性 B-ALL,这成为细胞免疫治疗的里程碑,显示出 CAR-T 细胞治疗的巨大前景^[9]。但目前 CAR-T 细胞大多来源于自体外周血细胞分离纯化的 T 细胞,存在制备风险、时间延误、T 细胞质量不佳等

限制,另外抑制性免疫微环境导致 T 细胞耗竭也影响 CAR-T 细胞体内疗效。

最近,锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFNs)、转录激活子样效应因子核酸酶(transcription activator like effector nucleases,TALENs)、规律性重复短回文序列簇[clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR-associated(Cas9), CRISPR / Cas9]等新型基因编辑技术被广泛应用于细胞免疫治疗,并取得快速进展,为解决上述问题带来了希望。因此,本文主要介绍 CAR-T 细胞治疗原理、研究进展及存在的问题,并探讨了 3 种主要的基因编辑技术及其对 CAR-T 细胞治疗的改进策略。

1 CAR-T 细胞治疗

1.1 治疗机制

CAR 是基于 T 细胞激活的信号转导通路设计的。TCR 结合 MHC-抗原复合物后被磷酸化,进而促使 T 细胞表面的共刺激因子(CD28、CD27、CD134、

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No.81570116),湖北省科技重大专项资助项目(No.2018ACA141)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No.81570116), and the Major Technological Innovation Special Project of Hubei Province (No. 2018ACA141)

[作者简介] 李成功(1995-),女,硕士,主要从事 CAR-T 细胞治疗的相关研究,E-mail: chengongli@hust.edu.cn

[通信作者] 梅恒(MEI Heng, corresponding author),博士,副主任医师、副教授、硕士生导师,主要从事 CAR-T 细胞治疗和出凝血疾病的相关研究,E-mail: hmei@hust.edu.cn

CD137 或 ICOS) 与抗原提呈细胞表面的相应受体 (CD80、CD86、CD137 或 ICOSL) 结合, 导致 T 细胞活化, 分泌穿孔素、颗粒酶和细胞因子, 导致靶细胞溶解或凋亡^[10]。CAR 一般包含 3 个部分: 胞外单链可变区 (single chain variable fragment, scFv)、穿膜区及胞内信号转导区。scFv 能够以非 MHC 限制性途径直接识别肿瘤相关抗原, 并通过胞内信号域传导信号活化效应 T 细胞。胞内信号域通常包括来自 T 细胞受体信号 CD3 ζ 链和免疫共刺激因子, 如 CD28 和 4-1BB(CD137)^[11]。CAR-T 细胞是指通过基因工程技术将 CAR 基因通过电穿孔、逆转录病毒或慢病毒载体、转座子或转座酶系统转染到 T 细胞, 使 T 细胞成为具有识别特异性肿瘤相关抗原 (tumor associated antigen, TAA) 的杀伤细胞。CAR-T 细胞通过非 MHC 限制方式与 TAA 特异性结合发生反应, 避免了肿瘤因 MHC 分子提呈缺陷而导致的免疫逃逸^[12]。同时, CAR-T 细胞基于 scFv 可以识别多种肿瘤相关抗原和半抗原, 包括大部分蛋白类、糖类如 Lewis-Y^[13]、糖脂如 GD2^[14] 等。

根据胞内信号转导区的不同, 目前 CAR-T 细胞可以分为 4 代。第一代 CAR-T 胞内区只包含 CD3 ζ 链, 体内扩增能力有限、存留时间短以及抗肿瘤活性不强。第二代 CAR-T 胞内区增加了一个免疫共刺激因子, 增强了 T 细胞体内杀伤活性、扩增能力和存留时间, 是目前临床上主要应用的类型。第三代 CAR-T 胞内区包含 2~3 个不同的共刺激因子, 进一步增强 T 细胞的活性及功能, 但其安全性和有效性是否优于第二代 CAR-T 细胞尚无定论。第四代 CAR-T 是在第二代胞内区增加了 IL-2 结构域, 又称为 TRUCK (T-cell redirected for universal cytokine killing), 可以在强化 T 细胞激活信号的同时, 招募和活化更多的原始免疫细胞清除抗原阴性的肿瘤细胞, 可用来治疗病毒感染、代谢性疾病和自身免疫病^[15]。随着对 CAR 结构的认识和研究手段的进步, CAR 结构将进入快速更新的时代。

1.2 临床应用

CAR-T 细胞治疗首次应用始于 1993 年, ESH-HAR 等^[16]率先设计含特定抗体的 scFv 和 ζ 链的嵌合基因并将其导入 T 细胞, 成功地应用于黑色素瘤, 是第一代 CAR-T 细胞的原型。虽然 CAR-T 细胞最早应用于实体瘤, 但缺乏特异性靶向实体瘤的 TAA。研究^[17]发现, CD19 在所有 B 细胞中表达、在造血干细胞及其他细胞中不表达, 且患者可长期耐受 B 细胞发育不全, CD19 成为 CAR-T 细胞治疗 B 细胞系肿瘤的一个理想靶点, 目前抗 CD19 CAR-T 主要用于 B 细胞白血病和淋巴瘤的治疗。随着靶向 CD19 CAR-T 细

胞在临床的成功应用, 针对其他血液恶性肿瘤 TAA 的 CAR-T 疗法也在相继进入临床试验, 包括抗 CD20、抗 CD22 CAR-T 用于治疗靶向 CD19 CAR-T 抵抗的 B 细胞肿瘤^[18-19], 抗 CD123 CAR-T 用于治疗急性髓性白血病^[20], 抗 CD30 CAR-T 用于治疗 CD30⁺ 淋巴瘤^[21], 抗 CD38、抗 BCMA CAR-T 用于治疗多发性骨髓瘤^[22-23] 等。

然而, 尽管 CAR-T 细胞治疗在血液系统肿瘤中取得显著疗效, 但在实体瘤方面的应用仍存在许多挑战。首先, 很难找到类似 CD19 的针对实体瘤的理想靶点^[24]; 其次, 由于细胞外基质的阻挡和缺乏化学趋化因子的介导, CAR-T 细胞靶向实体瘤细胞的效率不高^[25]; 另外, 抑制性肿瘤微环境使 CAR-T 细胞难以激活^[26]。目前, 只有有限的关于实体肿瘤的 CAR-T 临床试验^[27-29] 被报道, 包括抗 HER2 CAR-T 用于治疗进展期胆道癌和胰腺癌, 抗 GD2 CAR-T 用于治疗成神经细胞瘤, 抗 CEA CAR-T 用于治疗转移性结肠癌等。最近, 一项关于抗 IL13R α 2 CAR-T 在高度侵袭性的胶质母细胞瘤的治疗中表现出显著疗效和低度毒性, 表明 CAR-T 细胞疗法通过不断优化也能有效地应用于实体瘤^[30]。

1.3 存在问题

目前大部分 CAR-T 细胞临床试验利用来自患者自体的 T 细胞。一方面, 由于患者本身肿瘤负荷过重、淋巴细胞质量不佳或数量过少导致 T 细胞采样不理想, 无法获得一定数量的 CAR-T 细胞^[31]。另一方面, T 细胞体外扩增和质检需要数周到数月, 可能会错过某些高度恶性患者的最佳治疗时间窗^[32]。同时, 患者外周血分离的 T 细胞可能包含癌细胞, 存在制备风险。最近来自宾夕法尼亚大学的研究团队^[33]报道了一例表达靶向 CD19 CAR 的超级癌细胞, 这种癌细胞表面的 CAR 封闭了自身表面的 CD19, 导致了 CAR-T 耐药和疾病复发。因此, 能实现“现货供应”的通用型 CAR-T 细胞 (universal CAR-T cell, UCAR-T) 成为研究热点, 即利用同种异体健康个体来源的 T 细胞进行体外大规模扩增, 制备成 CAR-T 细胞回输给患者用于治疗。UCAR-T 技术最大的挑战是必须克服 GVHD 和供体对异基因 T 细胞的排斥反应, 利用新型基因编辑技术有望突破免疫屏障。

其次, CAR-T 细胞在体内的活化和增殖能力直接影响其临床疗效^[34]。在抗肿瘤免疫中, 体内会出现一些“终止信号”来合理控制 T 细胞的反应, 包括上调抑制性信号分子, 如 PD-1、CTLA-4、LAG-3、CD160、2B4、TIM-3, 抑制 T 细胞增殖; 下调刺激性信号分子, 如 IL-2、IFN- γ 、TNF- α , 抑制 T 细胞活化及进一步效应功能。抗原持续慢性刺激导致 T 细胞这种进行性表

型和功能改变,称为T细胞耗竭^[35-36]。T细胞耗竭使其不能有效地杀伤肿瘤细胞,导致治疗的失败。因此,利用基因编辑技术阻断T细胞耗竭相关信号通路将显著提高CAR-T细胞疗效。

CAR-T细胞治疗在实验研究和临床研究中均取快速进展。然而,除了缺乏UCAR-T和T细胞耗竭外,CAR-T细胞仍面临许多挑战,包括如何在保证靶向活性时避免脱靶毒性,如何促使足量的T细胞浸润和转移到实体肿瘤细胞,如何精确控制CAR-T细胞激活、增殖和寿命,如何管理和处理副作用如细胞因子释放综合征、神经毒性、巨噬细胞活化综合征等,如何预防因病毒载体转染或基因编辑的插入突变或恶性转化引起的基因毒性,如何制定标准化生产和质控流程,如何确定最佳给药剂量和方式等^[37]。基因编辑技术将为新一代CAR-T细胞的制备和优化提供方便高效的研究工具。

2 基因编辑技术简介

随着基因编辑技术在细胞生物学的广泛应用,基因编辑技术在优化CAR-T细胞治疗方面也取得了最新进展^[38]。近几年发展起来ZFNs、TALENs、CRISPR/Cas9等基因编辑技术对生命科学领域具有革命性贡献。

2.1 ZFNs

每个ZFN单体是由位于C末端的非特异性切割结构域FokI核酸内切酶、位于N端的特异性识别DNA的锌指蛋白(zinc finger protein, ZFP)、以及连接DNA结合结构域和内切酶的一段小肽组成^[39-40]。ZFP通常由3~6个锌指组成,每个锌指识别基因组中连续的3~4个碱基,多个锌指结构由连接序列串联就能形成1个高度特异性的DNA识别区域^[41-42]。ZFN技术需要2个分子ZFN以相对方向分别特异性识别并结合DNA的正反义链,当这两个识别位点相距5~6 bp时,2个FokI二聚化产生内切酶活性切割DNA,导致DNA双链断裂(double strand break, DSB),继而通过非同源末端连接(nonhomologous end joining, NHEJ)或同源重组(homologous recombination, HR)完成修复^[43-44]。虽然FokI自身二聚化也能产生对DNA的切割作用,但切割效率极低,容易产生非特异切割,所以在设计ZFN时,还需要对FokI进行突变,2个结合不同靶序列的突变FokI相距5~6 bp就可形成异源二聚体而具有酶切功能,同时增加了ZFN识别的特异性^[45]。

ZFNs具有高效的靶向效率和高度的特异性,在一系列模式生物中获得成功,编辑效率约为30%^[46]。但是,ZFNs技术还存在一些不足,如由于“上下文依赖(组成

人工核酸酶的各个锌指结构单元之间存在相互影响)”造成对目标DNA无法识别和切割的脱靶效应,设计操作较复杂等,仍需要进一步完善和优化^[47]。

2.2 TALENs

转录激活因子效应物(transcription activator like effector, TALE)是植物病原体黄色单胞杆菌分泌的天然蛋白,它可以特异性识别DNA碱基对^[48]。TALE由N-端转座结构域、DNA结合相关的中央区域、以及C-端转录激活结构域组成。中央DNA结合结构域包含15.5~19.5个单元模块,每个模块单元有34个氨基酸残基,其中第12和13位氨基酸可变,被称作重复可变的双氨基酸残基(repeat variable di-residues, RVDs)位点,RVD可与DNA的4种碱基之一结合使TALE可以特异识别DNA^[49]。研究者^[50-51]利用这一特性,将TALE模块与FokI核酸内切酶相连,构建可以靶向任意DNA位点的TALENs。

相比于ZFNs,TALENs特异性更高、脱靶概率降低、编辑效率也有提高,然而,由于目标序列的每个碱基都需要一个TALEN识别模块,组装过程繁琐^[52]。由于ZFN和TALEN识别的目标基因序列长度一般只有十几个碱基,在整个基因组中不可避免存在相似序列,所以,脱靶最大的危害在于对相似序列进行编辑后产生的不可预测的后果,在医学治疗领域需要尽可能避免。TALENs相比于ZFNs脱靶效率更低,更适合医学领域的应用,目前应用于CAR-T细胞治疗领域的主要是TALENs和脱靶率更低的CRISPR/Cas9。

2.3 CRISPR/Cas9

CRISPR/Cas9是目前一种广受欢迎的新型基因编辑技术,最初在化脓性链球菌中被发现,作为细菌天然免疫系统抵御入侵的外源性DNA^[53]。CRISPR基因座包括前导序列、间隔序列和重复序列。前导序列执行启动子的功能,间隔序列捕获外源DNA分子的一小段并将其整合在两个重复序列之间,以便与外源DNA配对;Cas9蛋白含有RuvC和HNH两个活性位点,分别负责crRNA非互补链和互补链的特定位点切割^[54]。转录后,每个CRISPR RNA(crRNA)与其重复序列互补的tracrRNA结合,并和Cas9核酸酶形成一个复合物,Cas9核酸酶在crRNA的指引下,识别保守的间隔相邻基序(PAM)并靶向结合到与crRNA互补的DNA序列,进而切割DNA。随后,研究^[53,55]人员将tracrRNA和crRNA融合构建成大约20 bp的短向导RNA(short-guide RNA, sgRNA),并将其与核酸内切酶Cas9结合,即可实现高效特异地基因编辑。

不同于ZFNs和TALENs复杂的蛋白质识别结构

域, CRISPR/Cas9 的识别组件是 RNA 序列, 与 DNA 结合更加直接, 对目的 DNA 的编辑效率更高, 在水稻胚细胞中的编辑有效率达 50% 以上^[56]。同时, CRISPR/Cas9 系统实验操作简单易行、费用低廉, 使其被广泛应用于各个领域的基因敲除研究。虽然, 研究

人员^[57]发现在前导序列和目标 DNA 互补过程中, 远离 PAM 一端可以容忍一些碱基的错配导致脱靶效应的产生, 但脱靶发生概率极低。3 种基因编辑技术的比较详见表 1。

表 1 3 种基因编辑技术比较

项 目	ZFN	TALEN	CRISPR/Cas9
DNA 结合部位	ZFN 蛋白	TALEN 蛋白	sgRNA
核酸内切酶	FokI	FokI	Cas9
编辑有效率	30%	30%~50%	>50%
脱靶效应	较高	稍高	较低
系统设计	较复杂	复杂	简单
费用	高	中	低
复杂编辑能力	低	低	高
缺点	需要成对 ZFN 蛋白; 不能靶向任意位点; ZFN 蛋白结构复杂,	需要成对 TALEN 蛋白; 不能靶向任意位点; TALEN 蛋白较大、传送到细胞困难、耗时	gRNA 的设计要求较高
限制	只能识别 3~6 核苷酸序列	结合效率取决于 5' 端 RVD	PAM 限制序列多样性

3 基因编辑技术改良 CAR-T 细胞的策略

利用基因编辑技术研发新一代 CAR-T 细胞, 科研工作者们付出了巨大的努力并取得了一定的成就。基因编辑技术使“现货供应”通用型 CAR-T 成为可能, 实现了更加精细的免疫调控和更加强大的抗肿瘤功能。

3.1 研发“现货供应”的 UCAR-T 细胞

UCAR-T 细胞是指从同种异体无关的健康供体身上提前采集 T 细胞, 并在体外制备成 CAR-T 细胞低温保存, 可用于全世界一个或多个患者的治疗^[32]。UCAR-T 无需交叉配型, 无需时间等待, 可大大提高 CAR-T 细胞治疗时效性和广泛性。然而, 发展 UCAR-T 必须克服 GVHD 和受体对异基因 T 细胞的排斥反应。TCR 包括 α (TRAC)、 β 1(TRBC1)、 β 2(TRBC2) 链, 异基因 T 细胞的 TCR 可以识别受体的同种抗原, 导致 GVHD; HLA 主要是 HLA-I 类分子(包括 3 条 α 链和 1 个 β 2 微球蛋白), 在同种异体 T 细胞表面的表达可能导致宿主免疫系统对同种异体 T 细胞的快速排斥。因此, 利用基因编辑技术靶向敲除 TCR、HLA 及相关分子, 可有效解决排斥问题。

2012 年, 来自 Anderson 癌症中心的研究团队^[58]利用 ZFN 技术特异性敲除 TCR 的 α 和 β 链, 构建了 TCR-抗 CD19 UCAR-T 的最初模型, 在 B 细胞肿瘤治疗中表现出安全性和有效性。随后, 该团队^[59]再次利用 ZFN 技术靶向敲除了异基因 T 细胞的 HLA-I, 成功构建了 HLA-的抗 CD19 CAR-T 细胞, 未观察到免疫排斥反应。一项

研究利用 CRISPR/Cas9 技术将抗 CD19 CAR 基因与编码 TCR- α 的 DNA 序列融合来制备 UCAR-T 细胞, 不仅避免 GVHD, 同时也避免了对内源功能基因的干扰, 实现了对 CAR 功能的生理性 TCR 样调控, 相比传统 CAR-T 治疗取得了更好的抗肿瘤活性^[13]。2017 年来自宾夕法尼亚大学的研究者^[38]利用多 sgDNA 单次 CRISPR/Cas9 技术同时敲除了 TCR 和 HLA-I, 未观察到 GVHD, 该试验同时还成功构建了 TCR-HLA-I-Fas- 的三敲除和 TCR-HLA-I-PD-1-CTLA-4- 的四敲除 UCAR-T 模型。同年, 另一项来自宾夕法尼亚大学的研究团队^[60]利用 CRISPR/Cas9 技术同时敲除 TCR、 β 2 微球蛋白、PD-1 构建 UCAR-T, 在避免免疫排斥的同时也解除了 PD-1 的免疫抑制。随后, 来自中国的研究团队^[61]利用 CRISPR/Cas9 技术构建了 β 2 微球蛋白、TCR- α 双敲除和 β 2 微球蛋白、TCR- α 、PD-1 三敲除的 UCAR-T 细胞, 2 组细胞在小鼠实验中均发挥了抗肿瘤活性, 未发生 GVHD。

临床上报道^[62]的第一例 UCAR-T 细胞的应用是在 2015 年, 1 例 1 岁 ALL 患儿由于接受化疗后无法获得足够自体 T 细胞来完成 CAR-T 治疗, 接受了伦敦大学利用 TALEN 技术敲除 TCR α 的抗 CD19 UCAR-T 细胞治疗, 获得了分子学 CR, 未出现 GVHD 反应, 这标志着 CAR-T 细胞疗法从实验研究层面到临床应用级别的过渡。2017 年, 该团队^[63]再次利用 TALEN 技术破坏 TCR α 和 CD25 构建抗 CD19 UCAR-T 细胞, 单次输注给 2 例患有难治复发性 CD19⁺ B-ALL 的婴儿, 这 2 例婴儿在 4 周内均取得分子学 CR, 随后成功接受了异基因造血干细胞移植, 未出现 GVHD, 治疗后 12

个月内患者仍处于分子学缓解。UCAR-T细胞治疗能为异基因造血干细胞移植提供桥接作用,显示出

基因编辑技术的巨大应用潜力,目前已有6项临床试验正在进行评估UCAR-T的疗效和安全性。见表2。

表2 目前开展的UCAR-T细胞治疗的临床试验

NCT编号	干预	疾病	研究单位
02808442	UCART19	r/r B-ALL	洛杉矶儿童医院(美国加利福尼亚) 伊丽莎白儿童医院(比利时根特) 罗伯特·德布雷医院(法国巴黎) 大奥蒙德医院(英国伦敦)
03166878	UCART19	B细胞肿瘤	中国人民解放军总医院(中国北京)
02735083	UCART19	进展髓系肿瘤	洛杉矶儿童医院(美国加利福尼亚) 马萨诸塞综合医院(美国马萨诸塞州) 宾夕法尼亚大学医院(美国宾夕法尼亚) MD安德森癌症中心(美国休斯敦) 伊丽莎白儿童医院(比利时根特) Saint Antoine医院(法国巴黎) 罗伯特·德布雷医院(法国巴黎) 圣路易斯医院(法国巴黎) 大奥蒙德医院(英国伦敦) 国王学院医院NHS基金会(英国伦敦) 克里斯蒂国民保健基金会(英国曼彻斯特)
02746952	UCART19	B-ALL	马萨诸塞综合医院(美国波士顿) 宾夕法尼亚大学附属医院(美国宾夕法尼亚) MD安德森癌症中心(美国休斯敦) Saint Antoine医院(法国巴黎) 圣路易斯医院(法国巴黎) 国王学院医院NHS基金会(英国伦敦) 克里斯蒂国民保健基金会(英国曼彻斯特)
03203369	UCART123	BPDCN	MD安德森癌症中心(美国休斯敦)
03190278	UCART123	AML	威尔康奈尔医学院(美国纽约) MD安德森癌症中心(美国休斯敦)

r/r: 难治/复发性; BPDCN: 囊状浆细胞样树突状细胞肿瘤; AML: 急性髓系白血病

3.2 通过抵制T细胞耗竭增强疗效

研究^[64]显示,增强T细胞的增殖能力和存活时间、抵制T细胞耗竭将显著改善CAR-T细胞治疗的效果。多项研究^[65-66]表明T细胞表面PD-1、CTLA-4、TIM-3、LAG-3等信号分子的表达,可抑制T细胞增殖和细胞因子产生,导致肿瘤细胞的免疫逃逸,利用基因编辑技术阻断这些抑制性信号分子将解除T细胞本身介导的免疫抑制,增强CAR-T细胞疗效。PD-1和PD-1配体(PD-L1和PD-L2)是T细胞介导的免疫抑制反应中的重要信号分子,体内和体外试验均表明抑制PD-1/PD-L1可以标准化CD4:CD8比值,重建CD8⁺T细胞毒性和免疫突触^[3]。SU等^[67]利用CRISPR/Cas9技术靶向敲除患者自体T细胞的PD-1基因,体外培养发现T细胞释放IFN- γ 增多,杀伤能力增强。REN等^[38]利用CRISPR/Cas9技术将分别靶向TCR、HLA、PD-1的sgRNA慢病毒载体

通过单次电穿孔转染到抗CD19 UCAR-T细胞,在B-ALL动物移植模型中,TCR-HLA-IPD-1抗CD19 UCAR-T细胞相比于传统UCAR-T细胞表现出更显著的抗白血病作用。

2016年,来自宾夕法尼亚大学的CYRANOSKI教授等^[68]首次获得FDA批准进行关于利用CRISPR/Cas9技术编辑T细胞的临床试验。该实验利用CRISPR/Cas9技术敲除自体T细胞的PD-1和TCR基因,再利用慢病毒载体将靶向NY-ESO-1的TCR基因导入TCR⁺PD-1⁻T细胞用来治疗肺癌,这项研究在保证保证了高效的靶向活性的同时,避免了免疫排斥,提高了T细胞杀伤活性。阻断PD-1可以再激活耗竭的T细胞,CHONG等^[69]利用敲除PD-1的抗CD19 UCAR-T细胞治疗改善了一位患有难治性DLBCL患者的病情。类似的利用CRISPR/Cas9技术敲除T细

胞PD-1基因用于治疗恶性肿瘤的临床试验,如食管癌(NCT03081715)、前列腺癌(NCT02867345)、膀胱癌(NCT02863913)、肾细胞癌(NCT02867332)、转移性非小细胞肺癌(NCT0279385)等相继开展,试验结果尚未公布但令人期待。利用基因编辑技术靶向敲除自体或通用型CAR-T细胞免疫检查点相关基因,抵制T细胞耗竭,在细胞、动物和临床实验中都表现出增强的抗肿瘤活性和疗效。

3.3 其他应用

除了利用基因编辑技术直接敲除T细胞TCR、HLA等避免免疫排斥,敲除PD-1、CTLA-4等抵抗T细胞耗竭外,还可以利用基因编辑技术敲除治疗细胞上CAR的靶抗原,补充靶抗原表达阴性的正常细胞,清除靶抗原表达阳性的异常细胞,纠正细胞分化紊乱和机体免疫缺陷。正常B细胞缺乏可以由静脉输注免疫球蛋白替代治疗,但由于正常髓系细胞缺乏导致的免疫缺陷不能由药物补充来纠正,髓系定向免疫疗法由于缺乏靶向恶性髓系克隆的特异性靶点而发展受限^[8]。KIM等^[70]利用CRISPR/Cas9技术靶向敲除造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)表面的CD33,保留了HSC正常的髓系发育和成熟髓系细胞的正常功能。将CD33⁻HSC输注到患者体内一段时间后,将抗CD33 CAR-T细胞输注给患者,抗CD33 CAR-T细胞对CD33⁺髓系细胞产生杀伤作用,对CD33⁻髓系细胞无影响,这项研究为髓系定向免疫疗法提供了新思路。来自贝勒实验室的研究者^[71]利用CRISPR/Cas9技术敲除正常T细胞的CD7,然后用CD7⁻T细胞构建靶向CD7的CAR-T细胞,在体外实验中表现出良好疗效。化学趋化因子受体CCR5,作为HIV入侵T细胞的共受体表达于CD4⁺T细胞表面,一项临床试验(NCT03164135)^[72]利用CRISPR/Cas9技术敲除CD34⁺HSC表面的CCR5,将CCR5⁻CD34⁺HSC输注给患有恶性血液肿瘤的HIV患者,重建了患者HIV抵抗的T细胞系。

4 结 语

继tisagenlecleucel(CTL019)之后,axicabtagene ciloleucel(KTE-C19)成为第2个获得FDA批准上市的CAR-T产品,用于治疗成人的难治性或复发性DLBCL^[73]。随着研究的进展,越来越多的CAR-T产品将进入临床,因此,发展新一代更加方便易得、疗效更强、特异性更好的CAR-T细胞吸引了越来越多科研工作者的研究兴趣。新型基因编辑技术如ZFNs、TALENs、CRISPR/Cas9因其能实现简单高效地基因敲除,被广泛用于制备UCAR-T、抵制T细胞耗竭、降低CAR-T细胞脱靶毒性等,打开了新一代

CAR-T细胞研究的新纪元。利用基因编辑技术改进CAR-T细胞,临床前研究数据和结果让人充满期待,许多相关的临床试验正在进行中,结果将在未来几年陆续公布。基因编辑技术的应用将使更多患者获得CAR-T细胞治疗的机会,使人类向实现安全、高效、特异、低成本治愈肿瘤的最终目标更进一步。

[参考文献]

- [1] SONPAVDE G. PD-1 and PD-L1 inhibitors as salvage therapy for urothelial carcinoma[J]. *New Engl J Med*, 2017, 376(11): 1073-1074. DOI:10.1056/Nejme1701182.
- [2] NGHIEM P, BHATIA S, LIPSON E, et al. PD-1 blockade with pembrolizumab in advanced merkel-cell carcinoma[J]. *New Engl J Med*, 2016,374(26): 2542-2552. DOI:10.1056/NEJMoa1603702.
- [3] MCCLANAHAN F, HANNA B, MILLER S, et al. PD-L1 checkpoint blockade prevents immune dysfunction and leukemia development in a mouse model of chronic lymphocytic leukemia[J]. *Blood*, 2015, 126(2): 203-211. DOI:10.1182/blood-2015-01-622936.
- [4] TRAN E, LONGO D, URBA W. A milestone for CAR T cells[J]. *New Engl J Med*, 2017, 377(26): 2593-2596. DOI:10.1056/Nejme1714680.
- [5] HIGANO C, BRIXEY M, BRYANT E, et al. Durable complete remission of acute nonlymphocytic leukemia associated with discontinuation of immunosuppression following relapse after allogeneic bone marrow transplantation. A case report of a probable graft-versus-leukemia effect[J]. *Transplantation*, 1990, 50(1): 175-177. DOI: 10.1097/00007890-199007000-00037.
- [6] PORTER D, CONNORS J, VAN D, et al. Graft-versus-tumor induction with donor leukocyte infusions as primary therapy for patients with malignancies[J]. *J Clin Oncol*, 1999, 17(4): 1234-1347. DOI: 10.1200/JCO.1999.17.4.1234.
- [7] RUELLA M, KALOS M. Adoptive immunotherapy for cancer[J]. *Immunol Rev*, 2014, 257(1): 14-38. DOI:10.1111/imr.12136.
- [8] MAUDE S, FREY N, SHAW P, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia[J]. *New Engl J Med*, 2014, 371(16): 1507-1517. DOI:10.1056/NEJMoa1407222.
- [9] PRASAD V. Immunotherapy: Tisagenlecleucel the first approved CAR-T-cell therapy: implications for payers and policy makers[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15(1): 11-12. DOI: 10.1038/nrclinonc.2017.156.
- [10] MALISSEN B, GREGOIRE C, MALISSEN M, et al. Integrative biology of T cell activation[J]. *Nat Immunol*, 2014, 15(9): 790-797. DOI:10.1038/ni.2959.
- [11] DOTI G, GOTTSCHALK S, SAVOLDO B, et al. Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells[J]. *Immunol Rev*, 2014, 257(1): 107-126. DOI:10.1111/imr.12131.
- [12] BARRETT D, SINGH N, PORTER D, et al. Chimeric antigen receptor therapy for cancer[J]. *Annu Rev Med*, 2014, 65(3): 33-47. DOI:10.1146/annurev-med-060512-150254.
- [13] HUTCHINS L, MAKHOUL I, EMANUEL P, et al. Targeting tumor-associated carbohydrate antigens: a phase I study of a carbohydrate mimetic-peptide vaccine in stage IV breast cancer subjects[J]. *Oncotarget*, 2017,8(58): 99161-99178. DOI:10.18632/oncotarget.21959.
- [14] CHRISTOPHER W M,ROBBIE G M. Anti-GD2 CAR-T cells are potent in H3-K27M(+) diffuse midline gliomas[J]. *Can Discov*,

- 2018, 8(6): 672-680. DOI:10.1158/2159-8290.CD-RW2018-070.
- [15] CHMIELEWSKI M, ABKEN H. TRUCKS: the fourth generation of CARs[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2015, 15(8): 1145-1154. DOI: 10.1517/14712598.2015.1046430.
- [16] ESHHAR Z, WAKS T, GROSS G, et al. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma-subunit or zeta-subunit of the immunoglobulin and T-cell receptors[J]. *P Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(2): 720-724. DOI: 10.1073/pnas.90.2.720.
- [17] DAI H, WANG Y, LU X, et al. Chimeric antigen receptors modified t-cells for cancer therapy[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2016, 108(7): 439-445. DOI:ARTN djv43910.1093/jnci/djv439.
- [18] MARTYNISZYN A, KRAHL A, ANDRE M, et al. CD20-CD19 bispecific CAR-T cells for the treatment of B-Cell malignancies[J]. *Hum Gene Ther*, 2017, 28(12): 1147-1157. DOI:10.1089/hum.2017.126.
- [19] FRY T, SHAH N, ORENTAS R, et al. CD22-targeted CAR T cells induce remission in B-ALL that is naive or resistant to CD19-targeted CAR immunotherapy[J]. *Nat Med*, 2018, 24(1): 20-28. DOI: 10.1038/nm.4441.
- [20] BUDDE L, SONG J, KIM Y, et al. Remissions of acute myeloid leukemia and blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm following treatment with CD123-specific CAR-T cells: a first in human clinical trial[J]. *Blood*, 2014, 124(21):2346-2349. DOI:10.1182/blood-2014-01-622346.
- [21] PARK S, SERODY J, SHEA T, et al. A phase 1b/2 study of CD30-specific chimeric antigen receptor T-cell (CAR-T) therapy in combination with bendamustine in patients with CD30+Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma[J/OL]. *BMJ*, 2017, 7(12):e019321[2019-01-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29288188>. DOI: 10.1136/bmjopen-2017-019321.
- [22] CORNELL R, LOCKE F, BISHOP M, et al. A phase 1 multicenter study evaluating KITE-585, an autologous anti-BCMA CAR T-cell therapy, in patients with relapsed/refractory multiple myeloma[J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36(15):?. DOI:DOI 10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.TPS3103.
- [23] AN N, HOU Y, ZHANG Q, et al. Anti-multiple myeloma activity of nanobody-based anti-CD38 chimeric antigen receptor T cells[J]. *Mol Pharm*, 2018, 15(10): 4577-4588. DOI:10.1021/acs.molpharmaceut.8b00584.
- [24] RESTIFO N, DUDLEY M, ROSENBERG S. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response[J]. *Nat Rev Immunol*, 2012, 12(4): 269-281. DOI:10.1038/nri3191.
- [25] GILHAM D, DEBETS R, PULE M, et al. CAR-T cells and solid tumors: tuning T cells to challenge an inveterate foe[J]. *Trends Mol Med*, 2012, 18(7): 377-384. DOI:10.1016/j.molmed.2012.04.009.
- [26] NEWICK K, O'BRIEN S, MOON E, et al. CAR-T Cell therapy for solid tumors[J]. *Annu Rev Med*, 2017, 68(2): 139-152. DOI: 10.1146/annurev-med-062315-120245.
- [27] FENG K, LIU Y, GUO Y, et al. Phase I study of chimeric antigen receptor modified T cells in treating HER2-positive advanced biliary tract cancers and pancreatic cancers[J]. *Protein & Cell*, 2018, 9(10): 838-847. DOI:10.1007/s13238-017-0440-4.
- [28] HECZEY A, LOUIS C, SAVOLDO B, et al. CAR-T cells administered in combination with lymphodepletion and PD-1 inhibition to patients with neuroblastoma[J]. *Mol Ther*, 2017, 25(9): 2214-2224. DOI:10.1016/j.ymthe.2017.05.012.
- [29] ZHANG C, WANG Z, YANG Z, et al. Phase I escalating-dose trial of CAR-T therapy targeting CEA(+) metastatic colorectal cancers [J]. *Mol Ther*, 2017, 25(5): 1248-1258. DOI: 10.1016 / j.ymthe.2017.03.010.
- [30] BROWN C, ALIZADEH D, STARR R, et al. Regression of glioblastoma after chimeric antigen receptor T-cell therapy[J]. *New Engl J Med*, 2016, 375(26): 2561-2569. DOI:10.1056/NEJMoa1610497.
- [31] SINGH N, PERAZZELLI J, GRUPP S A, et al. Early memory phenotypes drive T cell proliferation in patients with pediatric malignancies[J]. *Sci Transl Med*, 2016, 8(320): 320ra3. DOI:10.1126/scitranslmed.aad5222.
- [32] TORIKAI H, COOPER L. Translational implications for off-the-shelf immune cells expressing chimeric antigen receptors[J]. *Mol ther*, 2016, 24(7): 1178-1186. DOI:10.1038/mt.2016.106.
- [33] RUELLA M, XU J, BARRETT D, et al. Induction of resistance to chimeric antigen receptor T cell therapy by transduction of a single leukemic B cell[J]. *Nat Med*, 2018, 24(10): 1499-1503. DOI: 10.1038/s41591-018-0201-9.
- [34] LIM W, JUNE C. The principles of engineering immune cells to treat cancer[J]. *Cell*, 2017, 168(4): 724-740. DOI: 10.1016 / j.cell.2017.01.016.
- [35] DAVOODZADEH G, KARDAR G, SAEEDI Y, et al. Exhaustion of T lymphocytes in the tumor microenvironment: significance and effective mechanisms[J]. *Cell Immunol*, 2017, 32(1)1-14. DOI: 10.1016/j.cellimm.2017.10.002.
- [36] CATAKOVIC K, KLIESER E, NEUREITER D, et al. T cell exhaustion: from pathophysiological basics to tumor immunotherapy[J]. *Cell Commun Signal*, 2017, 15(1): 1-9. DOI:10.1186/s12964-016-0160-z.
- [37] LI H, ZHAO Y. Increasing the safety and efficacy of chimeric antigen receptor T cell therapy[J]. *Protein & Cell*, 2017, 8(8): 573-589. DOI:10.1007/s13238-017-0411-9.
- [38] REN J, ZHANG X, LIU X, et al. A versatile system for rapid multiplex genome-edited CAR-T cell generation[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(10): 17002-17011. DOI:10.18632/oncotarget.15218.
- [39] BIBIKOVA M, CARROLL D, SEGAL D, et al. Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases[J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(1): 289-297. DOI: 10.1128 / MCB.21.1.289-297.2001.
- [40] SMITH J, BIBIKOVA M, WHITBY F, et al. Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains[J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(17): 3361-3369.
- [41] URNOV F, MILLER J, LEE Y, et al. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases[J]. *Nature*, 2005, 435(7042): 646-651. DOI:10.1038/nature03556.
- [42] CARROLL D. Progress and prospects: zinc-finger nucleases as gene therapy agents[J]. *Gene Ther*, 2008, 15(22): 1463-1468. DOI: 10.1038/gt.2008.145.
- [43] PETERSEN B, NIEMANN H. Advances in genetic modification of farm animals using zinc-finger nucleases (ZFN) [J]. *Chromosome Res*, 2015, 23(1): 7-15. DOI:10.1007/s10577-014-9451-7.
- [44] BIBIKOVA M, GOLIC M, GOLIC K, et al. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in drosophila using zinc-finger nucleases[J]. *Genetics*, 2002, 161(3): 1169-1175. DOI:10.0000/PMID12136019.

- [45] MILLER J, HOLMES M, WANG J, et al. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing[J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(7): 778-85. DOI:10.1038/nbt1319.
- [46] CARROLL D. Genome engineering with zinc-finger nucleases[J]. *Genetics*, 2011, 188(4): 773-782. DOI:10.1534/genetics.111.131433.
- [47] IMANISHI M, NAKAMURA A, MORISAKI T, et al. Positive and negative cooperativity of modularly assembled zinc fingers[J]. *Biochem Biophys Res*, 2009, 387(3): 440-443. DOI: 10.1016 / j. bbr. 2009.07.059.
- [48] MOSCOU M, BOGDANOVA A. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors[J]. *Science*, 2009, 326(5959): 1501-1508. DOI:10.1126/science.1178817.
- [49] MUSSOLINO C, CATHOMEN T. TALE nucleases: tailored genome engineering made easy[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2012, 23(5): 644-650. DOI:10.1016/j.copbio.2012.01.013.
- [50] BOCH J, SCHOLZE H, SCHORNACK S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors[J]. *Science*, 2009, 326(5959): 1509-1512. DOI:10.1126/science.1178811.
- [51] HOCKEMEYER D, WANG H, KIANI S, et al. Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases[J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(8): 731-734. DOI:10.1038/nbt.1927.
- [52] CHEN S, OIKONOMOU G, CHIU C, et al. A large-scale in vivo analysis reveals that TALENs are significantly more mutagenic than ZFNs generated using context-dependent assembly[J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(4): 2769-2778. DOI:10.1093/nar/gks1356.
- [53] WIEDENHEFT B, STERNBERG S, DOUDNA J. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea[J]. *Nature*, 2012, 482(7385): 331-338. DOI:10.1038/nature10886.
- [54] SINKUNAS T, GASUNAS G, FREMAUX C, et al. Cas3 is a single-stranded DNA nuclease and ATP-dependent helicase in the CRISPR/Cas immune system[J]. *EMBO J*, 2011, 30(7): 1335-1342. DOI:10.1038/emboj.2011.41.
- [55] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823. DOI:10.1126/science.1231143.
- [56] ZHANG H, ZHANG J, WEI P, et al. The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation[J]. *Plant Biotechnol J*, 2014, 12(6): 797-807. DOI:10.1111/pbi.12200.
- [57] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821. DOI:10.1126/science.1225829.
- [58] TORIKAI H, REIK A, LIU P, et al. A foundation for universal T-cell based immunotherapy: T cells engineered to express a CD19-specific chimeric-antigen-receptor and eliminate expression of endogenous TCR[J]. *Blood*, 2012, 119(24): 5697-5705. DOI:10.1182/blood-2012-01-405365.
- [59] TORIKAI H, REIK A, SOLDNER F, et al. Toward eliminating HLA class I expression to generate universal cells from allogeneic donors[J]. *Blood*, 2013, 122(8): 1341-1349. DOI: 10.1182 / blood-2013-03-478255.
- [60] REN J, LIU X, FANG C, et al. Multiplex genome editing to generate universal CAR T cells resistant to PD1 inhibition[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(9): 2255-2266. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-16-1300.
- [61] LIU X, ZHANG Y, CHENG C, et al. CRISPR-Cas9-mediated multiplex gene editing in CAR-T cells[J]. *Cell Res*, 2017, 27(1): 154-157. DOI:10.1038/cr.2016.142.
- [62] QASIM W, AMROLIA P, SAMARASINGHE S, et al. First clinical application of talen engineered universal CAR19-T Cells in B-ALL [J]. *Blood*, 2015, 126(23): 2046-2046. DOI:10.1182/blood-2012-01-405365
- [63] QASIM W, ZHAN H, SAMARASINGHE S, et al. Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR-T cells[J]. *Sci Transl Med*, 2017, 9(374): 2013-2019. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaj2013.
- [64] RITCHIE D, NEESON P, KHOT A, et al. Persistence and efficacy of second generation CAR T cell against the LeY antigen in acute myeloid leukemia[J]. *Mol Ther*, 2013, 21(11): 2122-2129. DOI: 10.1038/mt.2013.154.
- [65] WHERRY E, KURACHI M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion[J]. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15(8): 486-499. DOI: 10.1038/nri3862.
- [66] HOOS A. Development of immuno-oncology drugs-from CTLA4 to PD1 to the next generations[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 15(4): 235-247. DOI:10.1038/nrd.2015.35.
- [67] SU S, HU B, SHAO J, et al. CRISPR-Cas9 mediated efficient PD-1 disruption on human primary T cells from cancer patients[J/OL]. *Sci Rep*, 2016, 6:20070[2019-01-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26818188>. DOI:10.1038/srep20070.
- [68] CYRANOSKI D. CRISPR gene-editing tested in a person for the first time[J]. *Nature*, 2016, 539(7630): 479-488. DOI: 10.1038/nature.2016.20988.
- [69] CHONG E, MELENHORST J, LACEY S, et al. PD-1 blockade modulates chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells: refueling the CAR[J]. *Blood*, 2017, 129(8): 1039-1041. DOI:10.1182/blood-2016-09-738245.
- [70] MY K. Genome editing using CRISPR-Cas9 to increase the therapeutic index of antigen-specific immunotherapy in acute myeloid leukemia.[J]. *Mol Ther*, 2016, 24(S1): 108-116. DOI:10.1016/j.celrep.2016.09.079.
- [71] GOMES-SILVA D, SRINIVASAN M, SHARMA S, et al. CD7-edited T cells expressing a CD7-specific CAR for the therapy of T-cell malignancies[J]. *Blood*, 2017, 130(3): 285-296. DOI:10.1182/blood-2017-01-761320.
- [72] PEREZ E, WANG J, MILLER J, et al. Establishment of HIV-1 resistance in CD4⁺ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases [J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(7): 808-816. DOI:10.1038/nbt1410.
- [73] American Association for Cancer Research. FDA approves second car t-cell therapy[J]. *Can Discov*, 2018, 8(1): 5-6. DOI: 10.1158 / 2159-8290.CD-NB2017-155.

[收稿日期] 2018-12-22

[修回日期] 2019-02-15

[本文编辑] 王映红