

新一代检测技术在白血病精准医疗中的应用及挑战

秦亚溱 黄晓军

北京大学人民医院、北京大学血液病研究所,造血干细胞移植治疗血液病北京市重点实验室 100044

通信作者:黄晓军,Email:huangxiaojun@bjmu.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金(81621001、81870125);京津冀协同创新推动项目(Z18111000960000)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.05.001

Application and challenges of the new generation detection technologies in precision medicine for leukemia

Qin Yazhen, Huang Xiaojun

Peking University People's Hospital, Peking University Institute of Hematology, Beijing Key Laboratory of Hematopoietic Stem Cell Transplantation, Beijing 100044, China

Corresponding author: Huang Xiaojun, Email: huangxiaojun@bjmu.edu.cn

近十年来,人类在医疗科技领域取得长足进步,当今白血病等血液肿瘤治疗正迈入精准医疗时代。白血病精准医疗的基础是实验室诊断,它包括形态学、免疫学、遗传学及分子学四方面内容(即MICM分型)。21世纪以来,分子学诊断发展迅速,其在实验室诊断中地位愈发重要。WHO分类中白血病已由形态学分型转变为分子分型并且定义更加细化^[1];国际及国内指南已将越来越多的基因突变列入预后指标^[2-4],并开始建议采用新一代测序(NGS)技术筛查多基因突变来进行综合性预后评估^[3];急性淋巴细胞白血病(ALL)中经典的分子及细胞遗传学异常之外多种新的融合基因、基因突变等重现性分子学异常被发现^[5]。在第60届美国血液学年会(ASH)上,基因、基因组学及基因组学等分子学名词更成为热点词汇,高频出现于教育项目及投稿摘要中。而分子诊断的迅猛发展得益于新一代检测技术的进步。

一、分子学检测技术的发展及临床应用

白血病相关的分子学异常主要包括融合基因、基因表达异常及基因突变,其检测基于PCR和测序两大技术。PCR技术发明于1985年,1992年发明了实时定量PCR(RQ-PCR)技术,1999年出现数字

PCR技术。20世纪70年代末Sanger测序技术被发明,21世纪初,NGS技术应运而生。PCR及Sanger测序技术在发明之后很快获得诺贝尔奖,足以说明它们在推动人类生命科学进步中的伟大意义。

基于NGS技术,大量分子学异常被发现,它们在临床白血病诊治体系中的诊断、靶向药物的选择、预后分层及微小残留病(MRD)监测中发挥重要作用,成为精准医疗的基本组成。NGS技术对于精准医疗的助力作用无需赘述,本文将重点讨论其在当前临床应用中的挑战。

二、NGS的应用及挑战

NGS的基本原理是大规模平行测序,与Sanger测序相比其优势在于:①高通量,由于检测时间及人工工作量的大幅降低使得检测样本数及基因数明显增加;②实现了准确定量;③敏感性明显提高。NGS发展初期主要的技术平台包括罗氏454公司的GSFLX和AB公司的SOLiD平台,由于存在准确性及读长等方面的劣势当前不再是主流。目前广泛应用的技术平台包括Illumina公司的Solexa和AB公司Ion Torrent等,前者在兼容性、操作性和成本方面具有较大优势,弱势在于读长;后者的优势在于成本较低、体积较小、操作简单快速,弱势在于

通量较低,因此主要适用于小型测序。

依据检测内容,NGS主要分为全基因组测序、全外显子组测序以及全转录组测序。这些测序均是对肿瘤基因组作全面、综合性分析,因而数据量很大并且信息分析十分复杂,目前主要用于科研探索。相比之下,靶向测序是从样品文库中的总DNA中富集指定数个目标DNA片段(即基因panel,基因突变组合),再进行NGS,由于其专注于目标区域,因而生成的数据量较少、更易管理,并且降低了测序成本和数据分析负担,用时更短,尤其是有可能实现高深度测序用于MRD检测,因此是当前临床常规分子诊断中多基因突变筛查的主要方式。

尽管NGS技术已开始广泛应用于临床,尚存在一些问题,其当前主要挑战包括:

1. 筛查多少个基因突变合适?

NGS的高通量优势使其增加基因检测个数并不困难,因而目前应用的白血病相关基因突变组合既有包括二三十个又有上百甚至数百个基因,筛查多少个基因突变是合适的?

在ASH上Kaburagi等^[6]报道,对入组日本JPLSG AML-05研究的77例正常或复杂核型儿童急性髓系白血病(AML)患者进行NGS突变筛查,共包括343个基因,均已有报道显示与血液或实体肿瘤的发生有关。结果显示,72例(93%)患者可检出突变,但仅有61个(17.8%)基因的突变被检测到。之前美国TCGA数据库通过对50例AML的全基因组及150例AML的全外显子组数据分析显示,AML患者普遍存在基因编码区突变(98.5%),但平均只有13(0~51)个突变,明显少于实体肿瘤,有260个基因在至少2例患者中检出,其中仅23个基因突变率明显高于预期率^[7]。当前比较明确的白血病相关突变基因在二三十种以内,其他基因突变由于发生率很低,临床意义尚不清楚。对于这些少见病例,有必要通过多中心临床队列研究,明确临床意义,以便在临床常规诊治中发挥真正作用。

2. 是突变还是单核苷酸多态性(SNP)?SNP都没有临床意义吗?

在维基百科中,SNV被定义为基因组中特定位置的单核苷酸变异,当其在人群中达到一定的发生率(一般为1%)时则称为SNP。因此SNV包括了SNP及发生于体细胞上的肿瘤相关突变。到目前为止,人类基因组已发现多至840万的SNP位点,一个典型的全基因组测序结果与参比人类基因组相

比往往存在 $(4\sim 5)\times 10^6$ 个位点的差异,其中>99%的差异是SNP或小的插入/缺失,与肿瘤发生无关。正因如此,全基因组/全外显子组测序之后的数据分析工作量巨大,靶向NGS是适用于临床常规分子诊断的技术。

当前SNP的滤除主要通过公共数据库中的信息,然而并不是人类所有的SNP均已被发现,SNP数据库还在不断完善。所以,即使是靶向特定基因的NGS,也会遇到难以判断是SNP还是突变的问题。以本届ASH上Tallis等^[8]的报道为例,他们分析了2634例AML或骨髓增生异常综合征(MDS)患者TET2基因测序结果,发现777例(29.5%)患者的228种变异不属于已知的突变类型,其中的174种变异无法确认来源,错义突变有105种(60%),其中19种(18%)为致病类型,另外86种(82%)意义不明。该研究表明,TET2少见变异类型在AML/MDS患者普遍存在、类型多样,大部分的临床意义尚不明确因而无法归为突变。NGS检出的变异是否是肿瘤相关突变的问题在其他基因中同样存在,有待更多临床队列研究数据的支持。在当前临床工作中应谨慎对待意义不明的基因变异结果,以防预后评估出错。

绝大多数的SNP都与疾病无关,不过个别SNP的临床意义在白血病患者中得到证实,例如,WT1基因rs16754是最早被关注的与AML相关的SNP^[9],其他还包括TP53、CTAL-4等基因^[10-11]。这些SNP往往由于各家报道结果不一致尚无明确结论,这种不一致提示SNP对白血病疗效的影响可能较弱,是否具有直接作用有待实验室研究。

3. NGS如何用于MRD监测?

RQ-PCR技术能够实现明确、有限的分子学异常的高敏感性定量检测,因而是融合基因mRNA、常见类型NPM1突变以及WT1表达等指标有效的MRD监测手段。相比之下,NGS能够检测突变基因及突变位点分布多样的分子学异常,尤其适用于多基因多突变同时监测以及易发生类型变化的突变监测。2015年,Klco等^[12]首次比较了NGS检测AML患者初诊和诱导缓解时的突变谱,随后多项研究分别评估了不同治疗方式下及不同治疗时间点NGS检出的突变种类和突变水平^[13-15],这些研究从多个角度证实了NGS突变检测用于MRD监测的临床意义。然而当前NGS技术仍然存在一定的劣势。NGS有固定的运行单位,对于设计好的基因突

变组合,其包含的基因及覆盖区域已固定,因而个性化地选择每例患者的检测基因和区域,或者随时检测1例或少数患者当前均难以实现。对于MRD监测而言,高敏感度是基本要求,而提高敏感度直接的方式是提高检测深度。不过,这样一方面导致检测成本的明显增加,另一方面,NGS运行中会产生大量的人工噪音背景即检测错误,一般为1%的错误率。因此,常规的靶向NGS可靠的检测下限约为1%,简单地提升用于突变筛查的靶向NGS检测深度并不能明显提高检测敏感度,应用于MRD检测的NGS需要进行技术和生物信息分析方面的改进。

FLT3-ITD是AML患者明确的预后不良因素,该突变具有种类多样并且易发生变化的特点。最近Levis等^[16]开发了新的NGS技术检测AML患者FLT3-ITD突变,短片段(30 bp)和长片段(126 bp)的插入分别达到 5×10^{-5} 及 1×10^{-4} 的敏感度,同时特异性及准确性均满意。Thol等^[17]采用错误-修正的靶向NGS技术检测116例AML患者接受异基因造血干细胞移植前的多基因突变,发现以此代表的MRD水平与移植后的复发和生存相关。因此,通过技术革新,NGS有可能实现多基因高通量高敏感检测,使得AML患者普遍进行MRD分子监测成为可能。

4. 初诊检出的突变对于监测MRD均有意义吗?

这个问题上最常涉及的是DTA突变。DNMT3A、TET2和ASXL1基因突变常与年龄相关的克隆性造血相关,三者往往合并简称为DTA突变。最近,Jongen-Lavrencic等^[15]采用靶向NGS技术比较了482例AML患者初诊及诱导后缓解时的突变表现,结果显示51.4%初诊检出突变的患者缓解时突变仍可检出,其中DTA突变最常被检出并且突变等位基因频率(VAF)往往很高,与白血病幼稚细胞的比例不一致($< 5\%$),但是缓解时DTA的检出与4年复发率无关,而DTA之外的突变检出是AML患者复发和生存的独立预后不良因素。因此,DTA突变不是AML患者合适的MRD监测指标。

在本届ASH上, Kim等^[18]以31例t(8;21)AML和22例inv(16)AML[统称为核结合因子AML(CBF-AML)]患者为研究对象,采用84个基因的靶向NGS检测并比较了初诊和诱导缓解时骨髓样本的突变,作者以0.3%作为缓解时突变的界值进行分组。结果显示,全部患者缓解时突变清除是否

0.3%或者完全清除均与总生存(OS)和累积复发率(CIR)无关;缓解时MRD(RQ-PCR检测的RUNX1-RUNX1T1融合基因mRNA)阳性的t(8;21)AML患者突变清除是否 $> 0.3\%$ 与OS及CIR均无关;缓解时KIT-D816突变是否清除亦与OS及CIR均无关。RQ-PCR检测融合基因mRNA水平是CBF-AML患者敏感而准确的MRD监测指标,无论是特定时间点的水平还是其动力学变化均已证实具有明确的临床预后意义^[19-22]。该研究提示NGS检测CBF-AML患者缓解时的突变表现并不能提供额外的临床预后相关信息。因此,判断AML患者初诊时筛查出的突变是否适用于MRD监测时可能需考虑疾病类型及突变的基因。

5. 提高突变检测敏感度是否总是有意义?

MRD监测对NGS检测突变有提高敏感度的需求,然而高敏感度并不一定总是有意义。Short等^[23]在本届ASH上报道采用双重靶向NGS技术检测64例Ph⁺ALL患者治疗前样本的ABL酪氨酸激酶区突变,其中47例患者检出,7例检出了F317L、E225K、T315I等已知的酪氨酸激酶抑制剂(TKI)耐药突变类型,然而这7例患者接受相应的不敏感或中度敏感的TKI治疗均未复发,复发与未复发患者治疗前的突变数量无明显差异。因此,Ph⁺ALL患者治疗前高敏感检测ABL突变可能不太影响治疗决策。满足MRD要求的高敏感NGS检测是否有必要应用于初诊筛查、检出的低水平突变是否具有临床意义目前尚不可知。

三、数字PCR的应用和挑战

数字PCR的基本原理是将微量样品做大倍数稀释和分液,至每个反应体系含有不超过1个待测分子,全部同时PCR扩增后,逐个计数发生了扩增反应的样品。因此,数字PCR就是多个分隔(一般为20 000个)并同时进行的PCR,独立扩增减少了抑制和相互影响,因而特异性更好。由于是通过直接计数定量,因此不需要标准曲线,这是数字PCR的优势。不过对于需要做标准曲线的RQ-PCR技术而言,大量数据已经证实其用于检测融合基因及过表达基因mRNA水平的可用性以及明确的临床意义^[19-22,24-25],因此从临床诊断结果的稳定性和连续性角度考虑,这些方面的RQ-PCR检测尚无被数字PCR取代的必要。

需要说明的问题是数字PCR的敏感度。由于数字PCR就是一种PCR技术,所以敏感度二者无

异。然而,由于是数字PCR通过计数来定量,每个分隔的反应体系不能多于1个模板分子,否则定量不准确,模板总量因而受限(<20 000),这一点限制了数字PCR的敏感度。其他需要注意的方面还包括:①数字PCR得出的是定量而非定性的结果;②类似于RQ-PCR,数字PCR同样需要进行结果的归一化以实现可比,归一化既可以按照RQ-PCR的选择标准采用ABL等内参基因,也可以用目的基因的野生型来实现;③仅适用于已知基因型的检测。

数字PCR的特点决定了它更加适用于:①突变型基因的定量检测,如IDH1基因R132H型突变、DNMT3A的R882H型突变等^[26];②模板量小的定量检测如循环肿瘤DNA(ctDNA)。在本届ASH上,Nakamura等^[27]报道了数字PCR检测ctDNA的结果,他们首先通过NGS确认53例接受异基因造血干细胞移植的AML或MDS患者初诊时的驱动突变,再分别设计数字PCR。结果显示,移植后1个月和3个月时的骨髓/外周血和血清ctDNA的驱动突变水平均能强烈预测复发。尤其是移植后1个月时血清ctDNA的DTA突变水平同样具有明显预测复发的作用。该结果提示,非侵入性的ctDNA突变检测也许将在移植后AML/MDS患者的临床决策和干预中发挥作用。

四、展望

NGS等新一代检测技术正在推动分子诊断的快速发展。Roberts^[28]在今年ASH的教育项目中提出,测序将越来越多地用于综合分子诊断中并替代当前应用的细胞遗传学和FISH等方法。这一目标也许未来终会实现,然而就当前而言,形态学、免疫学、遗传学及分子学对于白血病分型均十分重要,因此在对初诊患者进行临床常规诊断时缺一不可。

实验室诊断临床有效应用的基础是标准化,NGS等新一代检测技术亦是如此。2018年,国内已发布《二代测序技术在肿瘤精准医学诊断中的应用专家共识》和《二代测序技术在血液肿瘤中的应用中国专家共识》^[29-30]。未来随着不断完善和细化,必将发布更多的指南来指导新一代检测技术在白血病精准医疗中发挥最佳作用。

划时代分子检测技术的发明为临床应用提供了广泛的可能性,然而尚有很多问题有待解决。当今时代,精准医疗的实现有赖于工程技术、生物信息、实验室和临床多方合作共同完成,多中心临床队列研究是明确新的分子学异常指标临床意义的必经之路。

参考文献

- [1] Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia [J]. *Blood*, 2016, 127(20):2391-2405. DOI: 10.1182/blood-2016-03-643544.
- [2] Döhner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel [J]. *Blood*, 2017, 129(4):424-447. DOI: 10.1182/blood-2016-08-733196.
- [3] National Comprehensive Cancer Network clinical practice guidelines in oncology (NCCN Guidelines): Acute myeloid leukemia. Version 2.2018 [S].
- [4] 中华医学会血液学分会白血病淋巴瘤学组. 成人急性髓系白血病(非急性早幼粒细胞白血病)中国诊疗指南(2017年版) [J]. *中华血液学杂志*, 2017, 38(3):177-182. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.03.001.
- [5] Harrison CJ, Schwab C. Advances in acute lymphoblastic leukemia genomics [C]. Educational updates in hematology book. 23rd congress of the European Hematology Association, 2018, 2(S2): 5-7.
- [6] Kaburagi T, Yamato G, Shiba N, et al. Comprehensive analysis of 343 genes using targeted sequencing panel by next-generation sequencer in 77 pediatric AML patients with normal and complex Karyotypes: Jccg Study, JPLSG AML-05 [J]. *Blood*, 2018, 132(Suppl 1): 1530.
- [7] Ley TJ, Miller C, Ding L, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(22): 2059-2074. DOI: 10.1056/NEJMoa1301689.
- [8] Tallis E, Benton CB, Khan A, et al. Diverse landscape of TET2 variants in MDS and AML [J]. *Blood*, 2018, 132(Suppl 1): 1479. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2018-09-120305>.
- [9] Megias-Vericat JE, Herrero MJ, Rojas L, et al. A systematic review and meta-analysis of the impact of WT1 polymorphism rs16754 in the effectiveness of standard chemotherapy in patients with acute myeloid leukemia [J]. *Pharmacogenomics J*, 2016, 16(1):30-40. DOI: 10.1038/tpj.2015.80.
- [10] Schulz E, Sill H. The TP53 Pro72Arg SNP in de novo acute myeloid leukemia [J]. *Haematologica*, 2017, 102(5):e214-214e215. DOI: 10.3324/haematol.2017.165019.
- [11] Qin XY, Wang Y, Li GX, et al. CTLA-4 polymorphisms and haplotype correlate with survival in ALL after allogeneic stem cell transplantation from related HLA- haplotype- mismatched donor [J]. *J Transl Med*, 2016, 14:100. DOI: 10.1186/s12967-016-0864-2.
- [12] Klcó JM, Miller CA, Griffith M, et al. Association between mutation clearance after induction therapy and outcomes in acute myeloid leukemia [J]. *JAMA*, 2015, 314(8):811-822. DOI: 10.1001/jama.2015.9643.
- [13] Getta BM, Devlin SM, Levine RL, et al. Multicolor flow cytometry and multigene next-generation sequencing are

- complementary and highly predictive for relapse in acute myeloid leukemia after allogeneic transplantation [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2017, 23 (7):1064-1071. DOI: 10.1016/j.bbmt.2017.03.017.
- [14] Morita K, Kantarjian HM, Wang F, et al. Clearance of somatic mutations at remission and the risk of relapse in acute myeloid leukemia [J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36 (18):1788-1797. DOI: 10.1200/JCO.2017.77.6757.
- [15] Jongen-Lavrencic M, Grob T, Hanekamp D, et al. Molecular minimal residual disease in acute myeloid leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2018, 378 (13): 1189-1199. DOI: 10.1056/NEJMoa1716863.
- [16] Levis MJ, Perl AE, Altman JK, et al. A next-generation sequencing-based assay for minimal residual disease assessment in AML patients with FLT3-ITD mutations [J]. *Blood Adv*, 2018, 2 (8):825-831. DOI: 10.1182/bloodadvances.2018015925.
- [17] Thol F, Gabdoulline R, Liebich A, et al. Measurable residual disease monitoring by NGS before allogeneic hematopoietic cell transplantation in AML [J]. *Blood*, 2018, 132 (16):1703-1713. DOI: 10.1182/blood-2018-02-829911.
- [18] Kim T, Moon JH, Ahn JS, et al. Residual allelic burden measured by next-generation sequencing (NGS) at remission provides limited prognostic value to predict relapse and long-term outcome in core binding factor acute myeloid leukemia (CBF-AML) [J]. *Blood*, 2018, 132(Suppl 1):1391. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-112906>.
- [19] Jourdan E, Boissel N, Chevret S, et al. Prospective evaluation of gene mutations and minimal residual disease in patients with core binding factor acute myeloid leukemia [J]. *Blood*, 2013, 121(12):2213-2223. DOI: 10.1182/blood-2012-10-462879.
- [20] Zhu HH, Zhang XH, Qin YZ, et al. MRD-directed risk stratification treatment may improve outcomes of t(8;21) AML in the first complete remission: results from the AML05 multicenter trial [J]. *Blood*, 2013, 121(20):4056-4062. DOI: 10.1182/blood-2012-11-468348.
- [21] Qin YZ, Xu LP, Chen H, et al. Allogeneic stem cell transplant may improve the outcome of adult patients with inv(16) acute myeloid leukemia in first complete remission with poor molecular responses to chemotherapy [J]. *Leuk Lymphoma*, 2015, 56 (11):3116-3123. DOI: 10.3109/10428194.2015.1032964.
- [22] Qin YZ, Wang Y, Xu LP, et al. The dynamics of RUNX1-RUNX1T1 transcript levels after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation predict relapse in patients with t(8;21) acute myeloid leukemia [J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10(1):44. DOI: 10.1186/s13045-017-0414-2.
- [23] Short NJ, Kantarjian HM, Sasaki K, et al. Ultrasensitive duplex sequencing of pretreatment ABL1 kinase domain mutations in patients with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia [J]. *Blood*, 2018, 132 (Suppl 1):1548.
- [24] Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results [J]. *Blood*, 2006, 108(1):28-37. DOI: 10.1182/blood-2006-01-0092.
- [25] Cilloni D, Renneville A, Hermitte F, et al. Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet study [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27 (31): 5195-5201. DOI: 10.1200/JCO.2009.22.4865.
- [26] Brambati C, Galbiati S, Xue E, et al. Droplet digital polymerase chain reaction for DNMT3A and IDH1/2 mutations to improve early detection of acute myeloid leukemia relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Haematologica*, 2016, 101(4):e157-161. DOI: 10.3324/haematol.2015.135467.
- [27] Nakamura S, Yokoyama K, Shimizu E, et al. Prognostic impact of circulating tumor DNA status post-allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome [J]. *Blood*, 2018, 132(Suppl 1):247.
- [28] Roberts KG. Genetics and prognosis of ALL in children vs adults [J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2018, 2018 (1):137-145. DOI: 10.1182/asheducation-2018.1.137.
- [29] 中国临床肿瘤学会肿瘤标志物专家委员会, 中国肿瘤驱动基因分析联盟. 二代测序技术在肿瘤精准医学诊断中的应用专家共识 [J]. *中华医学杂志*, 2018, 98 (26):2057-2065. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2018.26.001.
- [30] 中国抗癌协会血液肿瘤专业委员会, 中华医学会血液学分会, 中华医学会病理学分会. 二代测序技术在血液肿瘤中的应用中国专家共识(2018年版) [J]. *中华血液学杂志*, 2018, 39(11): 881-886. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2018.11.001.

(收稿日期:2019-01-24)

(本文编辑:王叶青)