

## 第二代测序技术在血液系统疾病临床应用中的研究进展

张丽 吴修进 关蒲骏 邱录贵

### The second generation sequencing technology and its application in the field of hematologic malignancies

Zhang Li, Wu Xiujin, Guan Pujun, Qiu Lugui

Corresponding author: Qiu Lugui, Institute of Hematology and Blood Diseases Hospital, CAMS & PUMC, Tianjin 300020, China. Email: drqiu99@medmail.com.cn

二代测序(Next Generation Sequencing, NGS)又称为高通量测序或深度测序(Deep-sequencing),1次可对几十万到几百万条DNA片段进行序列测定和分析。2014年度Nature Methods杂志将NGS技术评选为近十年对生物学研究影响最深的十大技术之首<sup>[1]</sup>。2003年美国454 Life Sciences公司首先建立了基于焦磷酸测序法的NGS技术,两年后哈佛大学遗传学家George Church提出“个人基因组计划”,从此掀起了NGS革命的热潮<sup>[2]</sup>。2008年,华盛顿大学圣路易斯医学院报道的全球首例急性髓系白血病(AML)-M<sub>1</sub>患者全基因组测序(Whole genome sequencing, WGS)结果<sup>[3]</sup>,是NGS技术首次应用于临床医学。随后,NGS技术开始在乳腺癌、肺癌、黑色素瘤等实体肿瘤中广泛应用。NGS技术为血液系统疾病的临床研究带来了革命性的进步,尤其是毛细胞白血病(HCL)中BRAF V600E基因突变<sup>[4]</sup>、华氏巨球蛋白血症(WM)中MYD88 L265P基因突变<sup>[5]</sup>及JAK2和MPL突变阴性骨髓增殖性肿瘤(MPN)中CALR基因突变<sup>[6]</sup>的发现为血液系统疾病的诊治带来了突破性进展。本文我们就NGS技术的在血液系统疾病中应用的必要性、主要特点、基本原理及其在血液系统疾病中的具体应用、现有成果、前景展望进行综述。

#### 一、NGS在血液系统疾病中应用的必要性

早在1902年,细胞中心体的发现者——德国细胞学家Theodor Boveri即提出“肿瘤是由于染色体紊乱导致细胞分裂失控所致”,用现在的术语描述即肿瘤发生是基于基因组的异常<sup>[7]</sup>。然而,经过科技工作者与临床医师长达一个世纪的努力,测定某一肿瘤的全套基因组序列仍然是不可能完成的任务,阻碍了人类对肿瘤发病学的认识。2012年de Martel等<sup>[8]</sup>的研究结果显示,2008年全球新诊断癌症患者

约1200万人,全年因癌症死亡的人数约700万人,其中血液肿瘤发病率逐年递增,美国非霍奇金淋巴瘤(NHL)发病率每年增长3%~4%。因此,深入解读肿瘤的发病机制已经迫在眉睫。

由于血液系统疾病在诊治过程中的独特性,NGS的作用显得更加重要。目前,细胞形态学(Morphology)、免疫学(Immunology)、细胞遗传学(Cytogenetics)和分子遗传学(Molecular genetics)检查的联合使用,仍然是诊断血液系统疾病,尤其是白血病的“金标准”。但值得注意的是,细胞形态学、免疫学检测结果的判读不可避免地受检验员主观影响,且其结论仅可为临床医师提供参考;同时,现有遗传学技术,如聚合酶链反应(PCR)、荧光原位杂交(FISH)、染色体核型分析,仅能针对极少数现已明确致病基因的血液肿瘤。因此,NGS技术是未来认识血液系统疾病发病根源的必然途径,对于提示疾病发生、进展以及实现靶向治疗具有十分重要的临床意义。

#### 二、基于高通量、高时效、低成本的NGS技术迅速发展

1977年,英国生物化学家Sanger教授采用“加减法”测出了φX174噬菌体基因组序列,这也是人类历史上第一次得到的完整生物体基因组的序列。同年他又发表了改良的“Sanger法”<sup>[9]</sup>,是一代测序中应用最广泛的方法。一代测序过程类似单个PCR过程,需要专门设计引物,先合成DNA再进行测序,且一次测序最多检测800bp长度。2001年发布的第一个人类基因组草图就是利用经典的Sanger测序仪完成的,耗时长达11年、费用共30亿美元<sup>[10]</sup>。较之一代测序技术,NGS的发展体现在高通量、高时效、低成本三大特点,为NGS进入临床应用奠定了基础。现在应用最广的NGS仪器Illumina HiSeq2500,运行周期为6d,每天能自动化读出1670亿个碱基,足以覆盖30亿个碱基的人类基因组;另一方面,2014年4月美国国家人类基因组研究所(NHGRI)公布全基因组测序费用从2001年的一亿美元下降到2008年的一百万美元,到2014年仅需一千美元。自此,NGS正式迈向临床医学。NGS与Sanger测序的最大区别为NGS是边合成、边测序,而Sanger是先合成、再测序,这也是NGS速度快、成本低的主要原因。但需要强调的是,一代测序仍然是目前基因检测领域的“金标准”,也是NGS现今唯一的验证标准。

2013年,美国Illumina公司的MiSeqDx测序仪及配套试剂盒通过美国食品药品监督管理局(FDA)审批,成为全球首个获得FDA临床认证的NGS平台,主要针对囊性纤维化的检测<sup>[11]</sup>。2015年1月,我国卫生和计划生育委员会妇幼保健服务司发布了第1批可开展高通量基因测序(NIPT)产前筛查与诊断的108个试点单位名单,批准NIPT检测胎儿染

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.08.022

基金项目:国家自然科学基金青年基金(81302048)

作者单位:610041 成都,四川大学华西医院血液科(张丽、吴修进、关蒲骏);中国医学科学院、北京协和医学院血液学研究所、血液病医院(邱录贵)

通信作者:邱录贵,Email:drqiu99@medmail.com.cn

染色体非整倍体异常,即 21 三体综合征、18 三体综合征及 13 三体综合征<sup>[12]</sup>。

### 三、NGS 的基本原理

NGS 现有的技术平台主要包括美国 Roche applied science 公司的 454 基因组测序仪、美国 Illumina 公司和英国 Solexa technology 公司合作开发的 Illumina 测序仪、美国 Applied biosystems 公司的 SOLiD 测序仪。基本原理基于四步:①准备 DNA 组学片段,即收集基因组 DNA 或将目的 RNA 逆转录为 cDNA,将 DNA 随机片段化成几百个碱基或更短的小片段;②接头及固定,即在 DNA 片段两端加上接头,从而使其固定在同一介质中,比如芯片上(如 Illumina 测序仪)或者乳液球中(如 454 基因组测序仪);③通过 PCR 技术进行扩增,即将 4 种不同的 dNTP 标记上不同的荧光,合成互补链时,每添加一种 dNTP 就释放出不同的荧光;④数据分析,即将捕获的荧光信号转化为测序峰值,再经过特定的计算机软件处理,获得待测片段的序列信息。而 Sanger 法核心原理是:由于 ddNTP 的 3' 端不含羟基,在 DNA 的合成过程中不能形成磷酸二酯键,使得 DNA 合成反应中断。在 4 个 DNA 合成反应体系中分别加入一定比例带有放射性同位素标记的 ddNTP,通过凝胶电泳和放射自显影后可以根据电泳带的位置确定待测分子的 DNA 序列。

### 四、NGS 在血液系统疾病的具体应用

2008 年, Ley 等<sup>[3]</sup>发表了世界上首例 AML-M<sub>1</sub> 患者白血病细胞及其正常皮肤组织的 WGS 对比结果,标志着血液系统肿瘤的研究正式迈向 NGS 时代。该研究发现了 10 个仅在肿瘤中存在的突变,其中 FLT3 和 NPM1 基因突变是已被证实的白血病重现性遗传学异常,另外首次公布 CDH24、PCIKC、GPR123、EBI2、PTPRT、KNDC1、SLC15A1、GRINL1B 共 8 个基因可能与 AML 发病密切相关。次年,该研究小组发表了第 2 例 AML-M<sub>1</sub> 的全基因组测序结果,首次报道抑癌基因 IDH1 出现 R132 突变<sup>[13]</sup>。自此,伴随 WGS 技术对疾病全基因组信息认识的深入,全外显子组测序(Whole Exome Sequencing, WES)技术和表观遗传学测序开始起步,NGS 技术开始全面推动以 AML 为代表的血液系统疾病的诊治进展(表 1)。

目前,NGS 技术的具体应用分为如下 4 个方向:

1. 基因组测序:包括 WGS、WES 及目标区域测序。基因组测序是对未知基因组序列的物种进行个体的基因组测序,可发现基于 DNA 水平的点突变、微小片段的插入/缺失、拷贝数的变异及基因组结构变异,进而探寻基因突变所致的功能改变。除外已经明确致病基因的慢性髓性白血病(CML)、急性早幼粒细胞白血病(APL)、真性红细胞增多症(PV)、原发性血小板增多症(ET)、原发性骨髓纤维化(PMF)等和发生在非 DNA 水平的原发免疫性血小板减少症(ITP)、再生障碍性贫血(AA)等,几乎大多数血液系统疾病,无论是肿瘤还是遗传性疾病,可能都将通过基因组测序来揭示其关键的致病基因以及具有临床意义的遗传学多态性。WGS 是目前最为广泛的应用形式,近年开始发展的 WES 技术利用

探针杂交富集并确定外显子区域 DNA 序列,从而发现与蛋白质功能变异相关的遗传突变。

2. RNA 测序:包括转录测序、长链非编码 RNA 测序及小 RNA(Small RNA)测序。RNA 测序可发现基于 RNA 水平的基因表达差异,从而有利于重新梳理并整合既往片面化报道的信号通路异常,还可以用于化疗药物治疗靶点的筛选。例如有报道在急性淋巴细胞白血病(ALL)的治疗中筛选出尼克酰胺磷酸核糖转移酶(NAMPT)可能为有效的治疗靶点<sup>[41]</sup>。

3. 表观遗传测序:包括甲基化测序及染色质免疫沉淀(ChIP)测序。主要检测 DNA 甲基化、组蛋白共价修饰等。2009 年, Tefferi 及 Vardiman<sup>[42]</sup>首次提出表观遗传调节因子可能参与了 MDS 的发生。有研究认为 TET2 基因突变阳性者可通过阿扎胞苷治疗获益,被认为是预后比较好的一种基因突变<sup>[32]</sup>;而 ASXL1 基因突变被认为是相对预后较差的独立危险因素,且增加患者转化为 AML 的风险<sup>[23]</sup>。

4. 其他测序方法:单细胞测序将是基于 NGS 进一步改良的主要方向。目前 NGS 样本都是所有细胞的混合 DNA,虽然能够得到全基因组序列信息,但是其结果只是一群细胞中信号的平均值,或者只代表其中占优势数量的细胞信息,单个细胞独有的特性被忽视。单细胞测序解决了细胞异质性难题,通过将分离的单个细胞的微量全基因组 DNA/mRNA 进行扩增,获得高覆盖率的完整的基因组后进行高通量测序,将有利于揭示细胞群体差异和细胞进化关系。

短短 4 年内,NGS 在血液学领域的应用持续稳步前进,从首例 AML WGS 发现新的突变基因<sup>[3]</sup>,到发现伴随 TP53 突变阳性者预后极差<sup>[25]</sup>,再到通过转录测序发现 CBF2T3-GLIS2、DHH-RHEBL1 融合基因突变<sup>[34-35]</sup>。目前正在探讨表观遗传组学改变在 AML 中的作用。2013 年癌症基因组图谱研究网(Cancer genome atlas research network)<sup>[29]</sup>报道了 200 例成人 AML 患者的基因组和表观遗传学全貌,确定了 260 个基因突变,并按照生物学功能将其分为 DNA 甲基化组、信号激活组、染色体修饰等 9 个组,这些发现可能会影响未来 AML 分层诊治系统。以上各种测序方式并非独立存在,它们相互交叉、相互补充,应该根据不同的测序目的、标本来源来灵活应用。

### 五、NGS 在血液系统疾病中现有的重要成果

1. HCL 特异性 BRAF V600E 基因突变:2011 年 Tiacci 等<sup>[4]</sup>通过大规模全外显子基因平行测序比对 HCL 患者肿瘤细胞与其外周血正常细胞,试图寻找 HCL 相关的基因突变,结果显示全部 HCL 患者存在 BRAF V600E 基因突变;接下来采集另外 47 例 HCL 患者和 195 例外周 B 细胞淋巴瘤/白血病患者的样本,使用 Sanger 测序进行验证突变率分别是 100%和 0,得出该突变对于 HCL 具有特异性诊断意义。该结论首次在第 54 届美国血液学年会(ASH)上以摘要形式报道,并开启了对 BRAF V600E 抑制剂维罗非尼的研究。目前 BRAF V600E 突变已作为 NCCN 诊断 HCL 的 2C 级证据,一项对维罗非尼的多中心、开放、单臂临床 II 期试验正在进行

中<sup>[43]</sup>。

2. WM/淋巴浆细胞淋巴瘤(LPL)特异性MYD88 L265P基因突变;2012年来自美国波士顿市达纳-法伯癌症研究所

(Dana Farber Cancer Institute)的Treon等<sup>[5]</sup>分离30例WM患者骨髓的恶性淋巴浆细胞进行WGS,包含配对样本10例、非配对样本20例,结果100%配对样本、85%非配对样本染色体

表1 第二代测序技术在血液系统疾病的临床应用现状

研究者	例数	发表年份	国家	检测对象	技术	疾病类型	主要发现
Ley等 <sup>[3]</sup>	1	2008	美国	DNA	WGS	AML	FLT3及NPM1基因突变者疾病进展快
Mardis等 <sup>[13]</sup>	1	2009	美国	DNA	WGS	AML	R132突变致抑癌基因IDH1失活
Rossi等 <sup>[14]</sup>	309	2009	意大利	DNA	WGS	CLL	TP53突变者疾病进展快,突变率为10%
Asnafi等 <sup>[15]</sup>	141	2009	法国	DNA	WGS	T-ALL	NOTCH1及FBXW7突变者预后好,突变率分别为62%和24%
Ley等 <sup>[16]</sup>	281	2010	美国	DNA	WES	AML	DNMT3A突变率为22.1%,突变阳性者预后差
Smith等 <sup>[17]</sup>	355	2010	英国	DNA	WGS	CMML、MDS	TET2突变无显著临床意义
Sugimoto等 <sup>[18]</sup>	6	2010	日本	DNA	WGS	伴7号染色体异常的髓系肿瘤	疾病发病相关基因NRCAM1Q1040K、LMTK2A1147T和EZH2(EZH2R690H)突变
Nikoloski等 <sup>[19]</sup>	102	2010	荷兰	DNA	WGS	MDS	EZH2突变率为26%,突变阳性者预后差
Fabbri等 <sup>[20]</sup>	120	2011	美国	DNA	WES	CLL	NOTCH1突变多见于CLL进展阶段
Jädersten等 <sup>[21]</sup>	55	2011	瑞典	DNA	WGS	MDS	TP53突变者易进展为白血病
Walter等 <sup>[22]</sup>	150	2011	美国	DNA	WES	MDS	DNMT3A突变率为8%,突变阳性者预后差
Tiacci等 <sup>[4]</sup>	48	2011	意大利	DNA	WES	HCL	BRAF V600E突变率为100%
Thol等 <sup>[23]</sup>	193	2011	德国	DNA	WGS	MDS	ASXL1突变率为20.7%,突变阳性者预后差
Quesada等 <sup>[24]</sup>	279	2011	西班牙	DNA	WES	CLL	SF3B1突变者预后差
Grossmann等 <sup>[25]</sup>	1 000	2012	德国	DNA	WGS	AML	TP53突变率为8%,突变阳性者预后差
Koskela等 <sup>[26]</sup>	76	2012	芬兰	DNA	WES	LGLL	STAT3突变率为40%
Treon等 <sup>[5]</sup>	30	2012	美国	DNA	WGS	WM	MYD88(L265P)突变率为90%
Wen等 <sup>[27]</sup>	45	2012	美国	RNA	转录测序	AML	CIITA-DEXI等134个融合基因,CIITA-DEXI突变率为48%
Lodé等 <sup>[28]</sup>	38	2013	法国	DNA	WGS、WES	MM	BRAF激酶突变率为4%
Cancer Genome Atlas Research Network <sup>[29]</sup>	200	2013	美国	RNA	WES	AML	发现260个与表观遗传学相关突变基因
Chan等 <sup>[30]</sup>	91	2013	加拿大	DNA	WGS	DLBCL	RCOR1缺失者无进展生存率低
Monti等 <sup>[31]</sup>	180	2013	美国	DNA	WGS	DLBCL	P53通路异常者5年生存率低
Itzykson等 <sup>[32]</sup>	8	2013	美国	ShRNA	WGS	ALL	NAMPT为STF-118804的靶点
Conte等 <sup>[33]</sup>	7	2013	英国	DNA	WES	AML	发现NPM1、CEBPA、DNMT3A、TET2IDH1及IDH2等突变基因
Masetti等 <sup>[34]</sup>	237	2013	意大利	RNA	转录测序	AML	CBFA2T3-GLIS2突变率为8.4%
Masetti等 <sup>[35]</sup>	55	2013	意大利	RNA	转录测序	AML	DHH-RHEBL1突变率为40%
Polprasert等 <sup>[36]</sup>	94	2013	美国	RNA	WES	MDS	低危组伴DDX41基因突变者推荐来那度胺治疗
Klampfl等 <sup>[6]</sup>	717	2014	意大利	DNA	WGS	JAK2和MPL突变阴性MPN	CALR突变率为24%
Nakamoto-Matsubara等 <sup>[37]</sup>	163	2014	日本	DNA	WES	AITL/PTCL	G17V RHOA突变率为60%~70%
Lohr等 <sup>[38]</sup>	203	2014	美国	DNA	WGS、WES	MM	个体基因异质性普遍存在
Li等 <sup>[39]</sup>	381	2015	中国	DNA	WES	ALL	PRPS1基因突变是ALL耐药和复发的重要原因
Diouf等 <sup>[40]</sup>	321	2015	美国	SNP	WGS-SNP	儿童ALL	CEP72启动子区域的Rs924607者与长春新碱起的神经病变的风险度相关

注:WGS:全基因组测序;WES:全外显子组测序;AML:急性髓系白血病;CLL:慢性淋巴细胞白血病;ALL:急性淋巴细胞白血病;CMML:慢性粒单核细胞白血病;MDS:骨髓增生异常综合征;HCL:毛细胞白血病;LGLL:大颗粒淋巴细胞白血病;WM:华氏巨球蛋白血症;MM:多发性骨髓瘤;DLBCL:弥漫大B细胞淋巴瘤;MPN:骨髓增殖性肿瘤;AITL/PTCL:血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤/外周T细胞淋巴瘤

3p22.2 的 38182641 位点存在 T>C 体细胞突变;随后他们又利用 Sanger 测序法证实 54 例 WM 患者中 49 例以及全部 3 例非分泌 IgM 的 LPL 患者中存在 MYD88 L265P 突变。由此得出 WM 及 LPL 可能为同一疾病起源,是一类既具有先天遗传倾向又有后天环境因素参与的复杂疾病。目前 NCCN 指南已经将 MYD88 L265P 作为 WM 的诊断标准之一。关于抑制 MYD88 信号通路的药物正在研究中。

3. JAK2/MPL 突变阴性 MPN 的 CALR 基因第 9 外显子突变:2013 年奥地利科学院分子医学中心 Klampfl 等<sup>[6]</sup>应用 WES 技术,在 6 例 JAK2 和 MPL 基因突变阴性的 PMF 患者中,发现编码钙网蛋白的 CALR 基因第 9 外显子伴有重线性插入和缺失;随后研究者筛查了 1 107 例 MPN 患者 CALR 基因第 9 外显子的插入和(或)缺失突变,发现 CALR 突变发生于 67%野生型 JAK2 和 MPL 的 ET 和 88% PMF 患者中, PV 患者未检测到突变;同时,在 254 例 AML、45 例 CML、73 例 MDS 和 64 例慢性粒单核细胞白血病患者中均未检测到该突变。从而明确 CALR 基因突变主要见于 JAK2 和 MPL 突变阴性的 MPN。CALR 突变的发现对进一步解释 JAK2/MPL 基因突变阴性 ET 和 PMF 患者的分子发病机制具有重要意义,为疾病的诊断提供了必要补充, CALR 基因突变也可能成为下一个靶向治疗的潜在靶点。

#### 六、NGS 在血液系统疾病中的应用前景和现存问题

通过对肿瘤标本进行全基因组、外显子基因组、转录基因组、表观遗传学等测序,核苷酸置换、微小插入/缺失、拷贝数改变、染色体重排、DNA 甲基化、组蛋白共价修饰、染色质重塑等已被准确测定,NGS 既可用于探索致病基因,也可用于指导疾病的诊断、监测病情以及筛选有利的化疗和靶向药物。目前由美国国家癌症研究所 Childrens' Oncology Group 承担的两项关于 NGS 技术的研究正在积极进行中,分别为以 WES 的 NCT01507441 和以转录测序的 NCT01141530<sup>[44]</sup>。

与此同时,NGS 的临床应用也面临着 4 个突出问题:① NGS 平台的建立仍然十分困难,同时测序仪器在使用过程中的维护费用高昂,这也是目前 NGS 临床应用仍需依赖基因检测公司的根本原因;②生物信息学人才匮乏,要求具有高水平综合能力的专业人才,具体包括高通量大数据的解读、相关数据库的持续更新与专业领域核心问题的把控等;③目前 NGS 检测结果尚需一代测序进行验证;④临床样本检测伦理审批的问题。

伴随生命科学、电子技术、计算机技术及信息科学等前沿学科日新月异的发展,尤其是生物医学工程专业的不断完善和创新,在不远的将来,NGS 技术将在临床诊治方面得到更为广泛的应用,直至彻底揭开血液系统疾病发生、进展的神秘面纱。

#### 参考文献

[1] [No authors listed]. Ten years of methods [J]. Nat Methods, 2014, 11(10): 1000-1001.

[2] Church GM. The personal genome project [J]. Mol Syst Biol, 2005, 1:2005.0030.

[3] Ley TJ, Mardis ER, Ding L, et al. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome [J]. Nature, 2008, 456(7218): 66-72.

[4] Tiacci E, Trifonov V, Schiavoni G, et al. BRAF mutations in hairy-cell leukemia [J]. N Engl J Med, 2011, 364 (24): 2305-2315.

[5] Treon SP, Xu L, Yang G, et al. MYD88 L265P somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia [J]. N Engl J Med, 2012, 367(9): 826-833.

[6] Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms [J]. N Engl J Med, 2013, 369(25): 2379-2390.

[7] Garraway LA, Lander ES. Lessons from the cancer genome [J]. Cell, 2013, 153(1): 17-37.

[8] de Martel C, Ferlay J, Franceschi S, et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis [J]. Lancet Oncol, 2012, 13(6): 607-615.

[9] Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase [J]. J Mol Biol, 1975, 94(3): 441-448.

[10] Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of the human genome [J]. Science, 2001, 291(5507): 1304-1351.

[11] Collins FS, Hamburg MA. First FDA authorization for next-generation sequencer [J]. N Engl J Med, 2013, 369 (25): 2369-2371.

[12] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会医政医管局. 关于开展高通量基因测序技术临床应用试点单位申报工作的通知 [Z]. 2014-03-13.

[13] Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome [J]. N Engl J Med, 2009, 361(11): 1058-1066.

[14] Rossi D, Cerri M, Deambrogi C, et al. The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del17p13: implications for overall survival and chemorefractoriness [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(3): 995-1004.

[15] Asnafi V, Buzyn A, Le Noir S, et al. NOTCH1/FBXW7 mutation identifies a large subgroup with favorable outcome in adult T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL): a Group for Research on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (GRAALL) study [J]. Blood, 2009, 113(17): 3918-3924.

[16] Ley TJ, Ding L, Walter MJ, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia [J]. N Engl J Med, 2010, 363 (25): 2424-2433.

[17] Smith AE, Mohamedali AM, Kulasekararaj A, et al. Next-generation sequencing of the TET2 gene in 355 MDS and CMML patients reveals low-abundance mutant clones with early origins, but indicates no definite prognostic value [J]. Blood, 2010, 116(19): 3923-3932.

[18] Sugimoto Y, Makishima H, Szpurka H, et al. Next generation exome sequencing for identification of the gene mutations

- associated with loss of heterozygosity on chromosome 7 in myeloid malignancies [J]. *Blood* (ASH annual meeting abstracts), 2010, 116(21):Abstract134-135.
- [19] Nikoloski G, Langemeijer SM, Kuiper RP, et al. Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes [J]. *Nat Genet*, 2010, 42(8): 665-667.
- [20] Fabbri G, Rasi S, Rossi D, et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation[J]. *J Exp Med*, 2011, 208(7): 1389-1401.
- [21] Jädersten M, Saft L, Smith A, et al. TP53 mutations in low-risk myelodysplastic syndromes with del (5q) predict disease progression[J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(15):1971-1979.
- [22] Walter MJ, Ding L, Shen D, et al. Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes [J]. *Leukemia*, 2011, 25(7): 1153-1158.
- [23] Thol F, Friesen I, Damm F, et al. Prognostic significance of ASXL1 mutations in patients with myelodysplastic syndromes [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(18): 2499-2506.
- [24] Quesada V, Conde L, Villamor N, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Nat Genet*, 2011, 44(1): 47-52.
- [25] Grossmann V, Schnittger S, Kohlmann A, et al. A novel hierarchical prognostic model of AML solely based on molecular mutations[J]. *Blood*, 2012, 120(15): 2963-2972.
- [26] Koskela HL, Eldfors S, Ellonen P, et al. Somatic STAT3 mutations in large granular lymphocytic leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(20): 1905-1913.
- [27] Wen H, Li Y, Malek SN, et al. New fusion transcripts identified in normal karyotype acute myeloid leukemia [J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e51203.
- [28] Lodé L, Moreau P, Ménard A, Godon C, et al. Lack of BRAF V600E mutation in human myeloma cell lines established from myeloma patients with extramedullary disease [J]. *Blood Cancer J*, 2013, 3:e163.
- [29] Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(22): 2059-2074.
- [30] Chan FC, Telenius A, Healy S, et al. An RCOR1 loss-associated gene expression signature identifies a prognostically significant DLBCL subgroup [J]. *Blood*, 2015, 125(6):959-966.
- [31] Monti S, Chapuy B, Takeyama K, et al. Integrative analysis reveals an outcome-associated and targetable pattern of p53 and cell cycle deregulation in diffuse large B cell lymphoma [J]. *Cancer Cell*, 2012, 22(3): 359-372.
- [32] Itzykson R, Kosmider O, Cluzeau T, et al. Impact of TET2 mutations on response rate to azacitidine in myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemias [J]. *Leukemia*, 2011, 25(7): 1147-1152.
- [33] Conte N, Varela I, Grove C, et al. Detailed molecular characterization of acute myeloid leukaemia with a normal karyotype using targeted DNA capture [J]. *Leukemia*, 2013, 27(9): 1820-1825.
- [34] Masetti R, Pigazzi M, Togni M, et al. CBFA2T3-GLIS2 fusion transcript is a novel common feature in pediatric, cytogenetically normal AML, not restricted to FAB M7 subtype [J]. *Blood*, 2013, 121(17): 3469-3472.
- [35] Masetti R, Togni M, Astolfi MA, et al. DHH-RHEBL1 fusion transcript: a novel recurrent feature in the new landscape of pediatric CBFA2T3-GLIS2-positive acute myeloid leukemia [J]. *Oncotarget*, 2013, 4(10): 1712-1720.
- [36] Polprasert C, Schulze I, Sekeres MA, et al. Inherited and Somatic Defects in DDX41 in Myeloid Neoplasms [J]. *Cancer Cell*, 2015, 27(5): 658-670.
- [37] Nakamoto-Matsubara R, Sakata-Yanagimoto M, Enami T, et al. Detection of the G17V RHOA mutation in angioimmunoblastic T-cell lymphoma and related lymphomas using quantitative allele-specific PCR [J]. *PLoS One*, 2014, 9(20):e109714.
- [38] Lohr JG, Stojanov P, Carter SL, et al. Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy [J]. *Cancer Cell*, 2014, 25(1): 91-101.
- [39] Li B, Li H, Bai Y, et al. Negative feedback-defective PRPS1 mutants drive thiopurine resistance in relapsed childhood ALL [J]. *Nature medicine*, 2015, 21(6):563-571.
- [40] Diouf B, Crews KR, Lew G, et al. Association of an inherited genetic variant with vincristine-related peripheral neuropathy in children with acute lymphoblastic leukemia [J]. *JAMA*, 2015, 313(8):815-823.
- [41] Matheny CJ, Wei MC, Bassik MC, et al. Next-generation NAMPT inhibitors identified by sequential high-throughput phenotypic chemical and functional genomic screens [J]. *Chem Biol*, 2013, 20(11): 1352-1363.
- [42] Tefferi A, Vardiman JW. Myelodysplastic syndromes [J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(19): 1872-1885.
- [43] Park JH, Chung SS, Chung YR, et al. Vemurafenib has potent antitumor activity in patients with relapsed/refractory BRAF mutant hairy cell leukemia//56th ASH Annual Meeting and Exposition. San Francisco, CA, 2014. <https://ash.confex.com/ash/2014/webprogram/Paper75260.html>.
- [44] Shyr D, Liu Q. Next generation sequencing in cancer research and clinical application [J]. *Biol Proced Online*, 2013, 15(1): 4.

(收稿日期:2015-02-17)

(本文编辑:刘爽)