

# 多核苷酸多态性分析在异基因造血干细胞移植后嵌合状态检测中的应用

吕晓东<sup>1</sup> 邹喆<sup>1</sup> 彭海<sup>2</sup> 范瑞华<sup>1</sup> 宋永平<sup>3</sup>

<sup>1</sup>郑州大学附属肿瘤医院、河南省肿瘤医院中心实验室 450008; <sup>2</sup>江汉大学系统生物学研究院, 武汉 430056; <sup>3</sup>郑州大学附属肿瘤医院、河南省肿瘤医院血液科 450008

通信作者: 宋永平, Email: songyongping001@126.com

**【摘要】** 目的 建立一种利用多核苷酸多态性高通量测序(MNPseq)分析异基因造血干细胞移植后嵌合状态的新方法,并探讨其可行性及优越性。**方法** 筛选100个MNP片段,采用高通量测序技术,通过模拟嵌合样本和临床移植后样本,与STR法、融合基因定量检测和流式细胞术微小残留病检测进行对比,验证方法的准确性和敏感性。**结果** MNPseq的准确性和敏感性均优于STR法,其中敏感性为0.01%,较STR法敏感约100倍;MNPseq可以进一步区分STR完全嵌合的42份样本,且经Cutoff值校正后,与融合基因定量检测结果相关;MNPseq可以纠正因为影子峰所造成的STR法的假阳性,并且可以用于检测缺乏供者和(或)患者移植前信息的嵌合体标本。**结论** 基于高通量测序的MNPseq分析是一种更加准确和敏感的嵌合体检测方法,而且解决了缺乏移植前信息无法检测嵌合体的问题,具有极高的临床应用价值。

**【关键词】** 多核苷酸多态性; 高通量测序; 嵌合体; 异基因造血干细胞移植

**基金项目:** 河南省自然科学基金(182300410371); 河南省科技攻关项目(192102310051)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.08.007

## Application of multiple nucleotide polymorphism analysis in chimerism detection after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

Lyu Xiaodong<sup>1</sup>, Zou Zhe<sup>1</sup>, Peng Hai<sup>2</sup>, Fan Ruihua<sup>1</sup>, Song Yongping<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Central Lab, the Affiliated Cancer Hospital of Zhengzhou University, Henan Cancer Hospital, Zhengzhou 450008, China; <sup>2</sup>Institute of Systematic Biology, Jiangnan University, Wuhan 430056, China; <sup>3</sup>Department of Hematology, the Affiliated Cancer Hospital of Zhengzhou University, Henan Cancer Hospital, Zhengzhou 450008, China

Corresponding author: Song Yongping, Email: songyongping001@126.com

**【Abstract】 Objective** To establish a new method for chimerism analysis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation by using multiple nucleotide polymorphism sequencing (MNPseq), and to explore its feasibility and superiority. **Methods** One hundred MNP fragments were screened and chimeric analysis was performed by high-throughput sequencing technology. The accuracy and sensitivity of the method were verified by simulating chimeric samples and post-transplant samples and comparing them with short tandem repeat (STR) analysis, fusion gene quantitative detection and flow cytometry for minimal residual disease. **Results** The accuracy and sensitivity of MNPseq were better than those of STR, in which the sensitivity could reach 0.01%, about 100 times more sensitive than STR. MNPseq could further distinguish 42 STR fully chimeric samples, and after corrected by cutoff value, it was correlated with the quantitative detection of fusion gene. MNPseq could correct false positive of STR caused by the shadow peak, and could be used to detect chimeric samples lacking pre-transplant information from donors and recipients. **Conclusion** MNPseq analysis based on high-throughput sequencing is a more accurate and sensitive chimerism detection method, and it solves the problem that chimerism cannot be detected due to the lack of pre-transplant information, which has extremely high clinical application value.

**【Key words】** Multiple nucleotide polymorphism; high-throughput sequencing; Chimerism; Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

**Fund program:** Natural Science Foundation of Henan Province (182300410371); Henan Science and Technology Project (19102310051)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.08.007

异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)后嵌合状态的检测对于监测移植过程,评估免疫抑制剂的使用及供者淋巴细胞回输等具有重要的临床价值<sup>[1]</sup>。现阶段针对allo-HSCT后嵌合状态的检测主要采用多重PCR扩增短串联重复序列(STR)结合毛细管电泳的方法,其敏感度只能达到3%~5%<sup>[2]</sup>。

单核苷酸多态性(SNP)可用于嵌合体检测,但由于其是二等位基因遗传标志,作用有限<sup>[3-5]</sup>。本课题组根据一段DNA区域(<200 bp)内可存在多个SNP标志的组合,而不同的SNP标志的等位基因型组合可区分不同个体DNA的原理,定义多核苷酸多态性(MNP)。本研究利用MNP高通量测序技术(MNPseq)进行allo-HSCT后嵌合状态分析的应用研究,并与STR等方法进行对比分析。

### 对象与方法

1. 标本选择:收集2018年1月至2018年10月期间于河南省肿瘤医院血液科24例进行allo-HSCT患者的移植前供、患者以及移植后患者外周血或骨髓标本共106份。移植后同期进行融合基因定量检测(包括BCR-ABL 210、BCR-ABL 190、AML1-ETO融合基因)和流式细胞术微小残留病检测。

根据患者移植后STR法检测结果进行分组,其中完全嵌合组(供者嵌合率100%)42份,混合嵌合组(供者嵌合率95%~<100%)35份,部分嵌合组(供者嵌合率<95%)29份。

另外,选取2名健康志愿者,分别留取其外周血样本进行单个核细胞分离、计数,并根据细胞数按1:2进行稀释,制备不同比例的混合样本(50%、25%、12.5%、6.25%、3.12%、1.00%、0.50%、0.10%、0.01%)。

2. 核酸提取:基因组DNA采用天根血液基因组DNA提取试剂盒提取,总RNA采用TRIzol—酚—氯仿法提取<sup>[6]</sup>。提取的核酸经微量分光光度计NanoDrop 2000定量,用于后续检测。

3. 融合基因及流式细胞术检测微小残留病:融合基因定量检测采用苏州云泰相关试剂(BCR-ABL 210、BCR-ABL 190和AML1-ETO融合基因定量检测试剂盒)<sup>[7]</sup>,根据疾病类型及移植前相关表型进行流式细胞术微小残留病检测。

4. STR法:采用ABI公司的Amp FLSTR Identifier Kit。共检测15个STR位点和1个性别位点:D8S1179、D21S11、D7S820、CSF1PO、D3S1358、

TH01、D13S317、D16S539、D2S1338、D19S433、vWA、TPOX、D18S51、性别位点、D5S818、FGA。根据供者/患者的基因型差异,选择差异位点的嵌合率平均值作为总嵌合率<sup>[8]</sup>。

5. MNPseq法:根据dbSNP数据库,利用Ion AmpliSeq技术,基于Ion Torrent PGM高通量测序平台检测100个MNP片段(长度约200 bp),其中包含646个SNP位点、4~8个SNP位点/扩增子,96.8%的SNP位点扩增深度超过2 000×。根据供者和移植前MNP多态性信息,进行移植后标本数据来源的筛选,根据筛选后检出频率的中位数计算嵌合率。

6. 统计学处理:数据用均数±标准差描述,相关性比较采用直线回归分析,两样本定量资料的比较采用*t*检验,多样本定量资料的比较采用方差分析,不同组间分类资料的比较采用 $\chi^2$ 检验,Cutoff值采用ROC曲线分析, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义,采用SPSS 20.0软件进行统数据分析。

### 结 果

1. MNPseq法的准确性和敏感性:分别采用MNPseq法和STR法检测倍比稀释后不同混合比例样本的嵌合状态(表1),对比分析两种方法的准确性和敏感性。结果显示,MNPseq与STR法的检测值均与理论值呈直线相关,但MNPseq法、STR法与理论值的相关性分别为0.999、0.997( $z=1.097$ ,  $P=0.273$ )。敏感性方面,MNPseq可检测理论值为0.01%的混合样本,而STR法仅可检测理论值为1%的样本,MNPseq敏感性较STR法高约100倍。

2. MNPseq、STR法、融合基因和流式细胞术检测微小残留病的结果:利用MNPseq检测完全嵌合组的42份标本,仍有40份可检测出患者的DNA,与STR法结果差异有统计学意义( $P<0.001$ )。而在40份MNPseq阳性的样本中,仅有19份标本融合基因检测阳性,二者之间差异有统计学意义( $P<0.001$ )。利用流式细胞术检测这部分样本的微小残留病,结果显示仅有3份样本阳性,与STR法结果无显著差异(表2)。在混合嵌合组和部分嵌合组的64份样本中,MNPseq检测结果也均为阳性,二者无差异。但其中分别有4份和1份样本相关融合基因检测为阴性,混合嵌合组中各检测方法间差异有统计学意义( $\chi^2=6.083$ ,  $P=0.048$ )(表2)。因为MNPseq检测的是个体遗传标志,没有疾病特异性,所以为校正MNPseq结果,以融合基因结果作为微小残留

表1 模拟嵌合样本中MNPseq和STR法的检测结果(%,  $\bar{x} \pm s$ )

理论值(%)	检测值			
	MNPseq	MNPseq-受	MNPseq-无	STR
50.00	50.56±0.87	47.19±0.76	43.57±0.65	44.3±1.12
25.00	25.56±0.64	25.65±0.71	24.92±0.59	23.8±0.83
12.50	11.38±0.35	11.46±0.32	12.08±0.42	11.91±0.19
6.25	5.64±0.49	5.64±0.49	7.02±0.51	7.4±0.21
1.00	0.98±0.12	0.98±0.12	1.69±0.25	0.5±0.15
0.50	0.51±0.08	0.51±0.08	—	—
0.10	0.12±0.07	0.12±0.07	—	—
0.01	0.04±0.01	0.04±0.01	—	—

注:MNPseq:根据完整的供者和患者移植前MNP多态性信息计算出的嵌合率;MNPseq-受:仅根据患者移植前MNP多态性信息计算的嵌合率;MNPseq-无:仅根据移植后样本MNP多态性信息计算的嵌合率;STR:根据STR法计算的嵌合率;—:未检出

表2 不同分组中MNPseq、融合基因和流式细胞术检测微小残留病的结果(例)

组别	MNPseq	MNPseq-受	MNPseq-无	RT-PCR	FCM
STR = 100% (42例)					
阳性	40	40	5	19	3
阴性	2	2	37	23	39
校正后阳性	10	10	5	19	3
校正后阴性	32	32	37	23	39
STR95% ~ < 100% (35例)					
阳性	35	35	31	31	32
阴性	0	0	4	4	3
校正后阳性	31	31	31	31	32
校正后阴性	4	4	4	4	3
STR < 95% (29例)					
阳性	29	29	28	28	27
阴性	0	0	1	1	2
校正后阳性	28	28	28	28	27
校正后阴性	1	1	1	1	2

注:阳性:检出患者遗传或疾病标志;阴性:未检出患者遗传或疾病标志;MNPseq:根据完整的供者和患者移植前MNP多态性信息计算出的嵌合率;MNPseq-受:仅根据患者移植前MNP多态性信息计算的嵌合率;MNPseq-无:仅根据移植后样本MNP多态性信息计算的嵌合率;RT-PCR:采用RT-PCR法检测患者融合基因的定量结果;FCM:采用流式细胞术检测患者微小残留病的结果;校正:用98.54%的Cutoff值校正后的MNPseq结果

病的判定标准,采用ROC曲线分析MNPseq的敏感性和特异性,以约登指数的最大值所对应的检测值98.54%为Cutoff值(图1)。经Cutoff值校正后,在完全嵌合组中,有10份样本MNPseq结果阳性,与STR法比较差异有统计学意义( $\chi^2 = 11.351, P = 0.001$ ),而与融合基因检测结果比较差异无统计学意义。在混合嵌合组和部分嵌合组中,分别有4份和1份样本MNPseq结果阴性,与STR法比较差异无统计学意义(表2)。

3. MNPseq在缺乏供患者移植前信息时检测嵌合体的可行性:在不同比例的混合样本中,根据是否缺乏供者和(或)患者移植前MNP信息所得到的

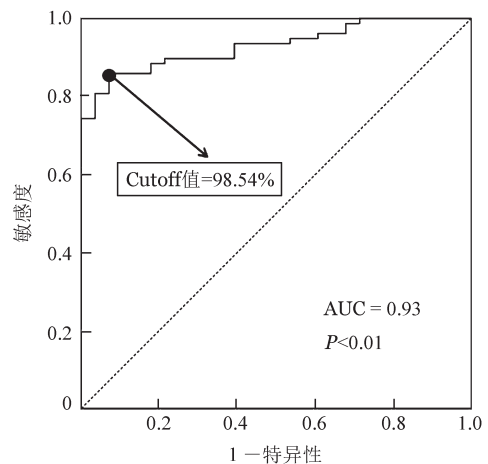


图1 MNPseq结果的ROC曲线分析



检测结果提示,当具有完整供者和患者移植前信息时,MNPseq的检测结果优于仅有患者移植前信息和无移植前信息的检测结果( $R^2_{\text{MNPseq}} = 0.999$ ,  $R^2_{\text{MNPseq-受}} = 0.998$ ,  $R^2_{\text{MNPseq-无}} = 0.995$ ),但差异无统计学意义( $z = 1.526$ ,  $P = 0.127$ )。在敏感性方面,具有完整移植前信息和仅有患者信息的MNPseq检测结果均可以达到0.01%,但无患者移植前信息的MNPseq,仅能检测到理论值为1%的样本,与STR法相近(表1)。

在完全嵌合组的临床样本中,具有完整移植前信息的和仅有患者移植前信息的MNPseq检测结果,校正前后均相同,而校正后结果与缺乏移植前信息的MNPseq检测结果无显著差异。而校正后缺乏移植前信息的MNPseq结果与STR法结果具有显著差异( $\chi^2 = 5.316$ ,  $P = 0.021$ )。在混合嵌合组和部分嵌合组中,是否缺乏移植前信息不影响校正后MNPseq的检测结果(表2)。

## 讨 论

allo-HSCT后嵌合状态的检测对于移植过程的临床评估和治疗干预具有重要的指导价值。而嵌合体的检测手段也不断进步,从早期的采用免疫生化分析方法检测红细胞血型系统、白细胞抗原系统,到细胞遗传学方法检测性染色体,以及现在临床上广泛采用的STR法,实验室一直在寻找一种更加准确和敏感的检测方法<sup>[9]</sup>。

移植后嵌合体检测需要一种准确、敏感的检测方法。STR法是目前嵌合体检测的主要手段,由于STR是重复序列,在PCR扩增过程中会由于复制滑脱伴随出现影子峰,造成假阳性,其敏感性也只能达到3%~5%<sup>[10]</sup>。而SNP不存在影子峰现象,但由于是二等位基因遗传标志,在其低比例混合状态下,检测结果无法区分是因低比例样本造成的还是因实验误差引起的<sup>[3]</sup>。MNP是多个SNP的多态性组合,是多等位基因遗传标志,包含更加丰富的遗传信息,兼具STR和SNP的优势,不存在影子峰干扰,比STR灵敏度更高,可辨别单个SNP异常的真伪,更适于嵌合体的检测。

本研究采用混合样本和临床样本对比分析MNPseq检测嵌合体的可行性。在混合样本分析中,结果提示MNPseq的准确性和敏感性均高于STR法,能有效弥补STR法敏感性不足的缺点。在完全嵌合组的临床样本中,MNPseq可检测到有40份标本中的患者DNA,提示其高敏感性。但其中融

合基因提示仅有19份标本阳性,二者差异的原因可能是由于MNPseq检测的是个体遗传标志,而融合基因是疾病特征性分子标志。另外,检测方法的高敏感性可能是另外一个原因,Bach等<sup>[11]</sup>研究发现,利用RT-PCR法可检测到很多低比例的嵌合体,这些可能是由于高敏感的方法检测到标本取样时混入的体细胞所引起的。因此,为了加强与疾病本身的联系,本研究通过Cutoff值校正MNPseq的检测结果,校正后结果提示MNPseq仍可进一步区分经STR法检测的完全嵌合状态。而其与融合基因比较无显著差异,提示校正后的结果更能反应移植后的疾病进展。但我们也发现,融合基因阳性中的9份样本,MNPseq经校正后显示阴性,其原因可能是由于在计算Cutoff值时的取样量较少。因此,我们需要进一步扩大样本量,计算与疾病关联的Cutoff值。在混合嵌合组和部分嵌合组中,各检测方法无显著差异,提示MNPseq的优势在于可以更早、更准地检测低比例嵌合状态。本研究也发现,在两组样本中分别有4份和1份样本,STR法的结果与其余检测结果不同,提示可能是STR法分析过程中影子峰所造成的假阳性,而相同的标本中MNPseq检测没有此类干扰。以上结果提示,MNPseq较STR法更加准确和敏感,是一种可靠的嵌合体检测手段。

STR法检测嵌合体必须有完整的移植前信息<sup>[12]</sup>。MNPseq基于高通量测序技术,不仅可检测大量的SNP位点,分析其多态性,还能检出位点的频率,这为从混合样本中直接区分不同来源的DNA提供了可行性,也为缺乏移植前信息的嵌合体检测带来了可能。我们进行MNP分析时,选择性的忽略移植前信息,结果提示,具有完整移植前信息的和仅有患者移植前信息的MNPseq结果,准确性和敏感性均非常相近。而无移植前信息MNPseq结果优于STR法,其原因可能主要是由于没有影子峰的干扰。以上结果提示,MNPseq检测可以作为缺乏移植前信息嵌合体检测的方法。

通常认为移植后嵌合体检测没有微小残留病检测对于预测疾病复发的临床价值大<sup>[10]</sup>,主要因为现有嵌合体检测的灵敏度不高,及嵌合体所检测的个体遗传信息缺少疾病的特异性。但是嵌合体检测对于移植患者的应用范围更广,因为患者可能没有微小残留病标记或者移植后再复发时微小残留病标志消失<sup>[13-14]</sup>。因此,基于高通量测序的MNPseq技术以其更加准确和敏感的优势,不仅可以作为一种新的嵌合体检测方法,也可以通过Cutoff值校正

加强与疾病特异性的关联,并且解决了因缺乏移植前信息无法检测嵌合体的问题,具有极高的临床应用价值。

### 参考文献

- [1] 李站锋,孙新. 嵌合体监测与供者淋巴细胞输注在地中海贫血患者移植后排斥风险中的作用[J]. 中国实验血液学杂志, 2013, 21(5): 1356-1360. DOI: 10.7534/j.issn.1009-2137.2013.05.054.
- [2] Khan F, Agarwal A, Agrawal S. Significance of chimerism in hematopoietic stem cell transplantation: new variations on an old theme [J]. Bone Marrow Transplant, 2004, 34(1): 1-12. DOI: 10.1038/sj.bmt.1704525.
- [3] 邵宇,王健民,龚胜兰,等. 一种基于单核苷酸多态性位点的定量检测异基因造血干细胞移植后嵌合率的新方法[J]. 中华血液学杂志, 2010, 31(2): 92-96. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2010.02.005.
- [4] 秦效英,李国选,江滨,等. 应用变性高效液相色谱检测CD31563位点单核苷酸多态性[J]. 中华检验学杂志, 2006, 29(7): 627-630. DOI: 10.3760/j.issn:1009-9158.2006.07.020.
- [5] Kim J, Hwang IS, Shin S, et al. SNP-based next-generation sequencing reveals low-level mixed chimerism after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. Ann Hematol, 2018, 97(9): 1731-1734. DOI: 10.1007/s00277-018-3325-6.
- [6] Lyu X, Xin Y, Mi R, et al. Overexpression of Wilms tumor 1 gene as a negative prognostic indicator in acute myeloid leukemia [J]. PLoS One, 2014, 9(3): e92470. DOI: 10.1371/journal.pone.0092470.
- [7] Lyu X, Wang X, Zhang L, et al. Detection of 22 common leukemic fusion genes using a single-step multiplex qRT-PCR-based assay [J]. Diagn Pathol, 2017, 12(1): 55. DOI: 10.1186/s13000-017-0634-3.
- [8] Nollet F, Billiet J, Selleslag D, et al. Standardisation of multiplex fluorescent short tandem repeat analysis for chimerism testing [J]. Bone Marrow Transplant, 2001, 28(5):511-518. DOI: 10.1038/sj.bmt.1703162.
- [9] 苏秀华,姜尔烈,韩明哲. 异基因造血干细胞移植后嵌合状态的研究进展[J]. 国际输血及血液学杂志, 2015, 38(5): 406-410. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-419X.2015.05.009.
- [10] Clark JR, Scott SD, Jack AL, et al. Monitoring of chimerism following allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT): technical recommendations for the use of short tandem repeat (STR) based techniques, on behalf of the United Kingdom National External Quality Assessment Service for Leucocyte Immunophenotyping Chimerism Working Group [J]. Br J Haematol, 2015, 168(1): 26-37. DOI: 10.1111/bjh.13073.
- [11] Bach C, Steffen M, Roesler W, et al. Systematic comparison of donor chimerism in peripheral blood and bone marrow after hematopoietic stem cell transplantation [J]. Blood Cancer J, 2017, 7(6):e566. DOI: 10.1038/bcj.2017.42.
- [12] 孙琪云,贾蜀琼,姚波,等. 短串联重复序列多态性检测非清髓造血干细胞移植造血嵌合体的研究[J]. 中华内科杂志, 2003, 42(10): 714-715. DOI: 10.3760/j.issn:0578-1426.2003.10.016.
- [13] Roloff GW, Lai C, Hourigan CS, et al. Technical advances in the measurement of residual disease in acute myeloid leukemia [J]. J Clin Med, 2017, 6(9). pii: E87. DOI: 10.3390/jcm6090087.
- [14] Liesveld JL, Rothberg PG. Mixed chimerism in SCT: conflict or peaceful coexistence? [J]. Bone Marrow Transplant, 2008, 42(5):297-310. DOI: 10.1038/bmt.2008.212.

(收稿日期:2018-11-28)

(本文编辑:徐茂强)

## 沉痛悼念陈虎教授

中国共产党的优秀党员,解放军总医院第五医学中心全军造血干细胞研究所所长、教授、博士生导师,军事医学研究院原附属医院造血干细胞移植科主任医师陈虎教授,于2019年7月24日20时50分在北京因病逝世,享年57岁。

陈虎教授原籍河南洛阳,1962年2月17日出生在重庆市,1979年9月入伍,2000年6月加入中国共产党,专业技术三级,文职一级。历任原第三军医大学学员,军事医学研究院原附属医院医师、主治医师、副主任医师、主任医师,北京市造血干细胞治疗与转化研究重点实验室主任。他牵头的“成体干细胞救治放射损伤新技术的建立与应用”获得国家科技进步一等奖,“间充质干细胞在急性放射病干细胞移植中诱导免疫耐受的研究”获得军队科技进步一等奖,2016年获得“何梁何利基金科学与技术进步奖”。曾荣立一等功1次、二等功1次、三等功1次。陈虎教授曾任《中华血液学杂志》第八、第九届编委,为杂志的发展作出了贡献!

陈虎教授的逝世,是我国血液学界的重大损失,我们永远怀念他的不朽功绩和高尚品德。陈虎教授永垂不朽!

本刊编辑部