

意义不明的克隆性造血的研究进展

丁亦含 李玉峰

Progress of clonal hematopoiesis of indeterminate potential

Ding Yihan, Li Yufeng

Corresponding author: Li Yufeng, Department of Hematology, Huai'an First People's Hospital of Nanjing Medical University, Jiangsu Huai'an 223300, China. Email: liyufeng99@netease.com

一般认为,以血液系统相关肿瘤基因突变为标志的克隆性造血是血液系统恶性肿瘤的重要特征之一,但早在1997年,Champion等^[1]采用人雄激素受体(human androgen receptor, HUMARA)检测X染色体灭活的方法证实健康女性体内存在克隆性造血。近年来,采用更敏感的分子生物学检测技术发现克隆性造血在健康人群中颇为常见,但其临床意义以及预后尚不明确^[2-3],Steensma等^[4]将其命名为意义不明的克隆性造血(clonal hematopoiesis of indeterminate potential, CHIP)。本文我们就CHIP的内涵、与骨髓增生异常综合征(MDS)的鉴别以及预后意义进行综述。

一、CHIP的由来

(一)克隆性造血

造血过程始终伴随血细胞的体细胞性基因突变,平均每个造血干细胞每十年发生 1.3 ± 0.2 个外显子突变,尽管其中大多数突变为无功能的过客基因突变,不增加造血细胞克隆的扩张潜能^[5],但部分突变基因为驱动基因或血液系统肿瘤相关基因,其突变可导致造血干细胞获得增殖和自我更新优势,使突变基因携带者发生血液系统肿瘤的危险性增加,因此,发生于健康人群中的基因突变愈来愈受到重视^[2-3]。Jaiswal等^[2]采用全基因组测序技术检测了17 182名血液学正常人群外周血细胞160种常见的血液肿瘤相关基因的改变,结果在746名正常人群中检测到73个基因(805个变异体)发生了突变,其中693人为单一基因突变,平均累及18%的外周血白细胞,即发生了克隆性造血。研究发现,基因突变发生率与年龄密切相关,40岁以下者发生率极低,而65~69岁者达到5.6%,90~108岁更是高达18.4%。Genovese等^[3]的研究也证实造血细胞体细胞性突变在血液学指标正常人群中的高发生率。CHIP个体的突变基因的特点反映了年龄相关性特征,如基因的碱基替代的主要类型为常见于老年人的胸腺嘧啶替换胞嘧啶(C>T)^[2]。多种机制与克隆造血易发生于老年人有关,包括维持代谢稳定性的能力下降、造血

细胞端粒缩短、年龄相关性基因突变的累及和造血干细胞功能下降和耗竭等。造血细胞在竞争压力较小的状态下,伴有ASXL1、DNMT3A或TET2等基因突变的造血细胞很容易扩张而形成克隆性造血^[6]。该假说得到了Holstege等^[7]研究的证实。Holstege等^[7]报告一例115岁外周血液学指标正常的女性,其造血细胞存在的体细胞突变基因高达450个,450个突变基因无一个是白血病相关基因。进一步分析发现,该女性的血细胞仅由2个造血克隆所维持。

最常见的突变基因是急性髓系白血病(AML)和MDS相关基因,如DNMT3A、TET2、ASXL1、TP53、JAK2和SF3B1。某些在AML和MDS中常见的基因并未在该组群中出现,提示上述基因不是血液肿瘤发生的起始基因而更可能是作为协调基因发挥致病作用。Jaiswal等^[2]对13例CHIP个体(累计17个基因异常)在确诊4~8年后再次进行基因检测,发现早期存在的突变基因依然存在,其中10个基因突变负荷减少或无变化,7个基因负荷增加,2例出现新的基因突变,提示造血克隆来自分化早期的造血细胞,有可能发生在造血干细胞水平。Jaiswal等^[2]在3 107名正常人群中同时检测血常规,其中139名存在基因突变。分析表明,有或无基因突变的两组人群绝大多数血液学参数差异无统计学意义,仅存在基因突变组的红细胞体积分布系数大于无突变组,提示克隆造血不影响外周血细胞计数,但进一步分析发现,多系血细胞减少但未达到MDS最低诊断标准组的基因突变率高于血细胞正常组,不明原因贫血者突变率也高于无贫血组。根据上述分析结果,早期仅累及少数造血干细胞的克隆性造血对造血系统的影响尚待进一步明确。

(二)CHIP的定义及诊断

鉴于血液学指标正常人群中血液肿瘤相关基因突变的高发生率且突变基因对携带者预后的影响尚不明确,借鉴意义不明的单克隆B细胞增多症(MBL)和意义未明单克隆免疫球蛋白血症(MGUS)的诊断思路,Steensma等^[4]采用CHIP这个新的诊断名称来描述骨髓或外周血细胞具有恶性血液病相关基因突变但患者血细胞计数正常或仅合并不符合MDS的最低血细胞诊断标准的轻度减少(或称为无意义的血细胞减少)的个体。由于基因突变率的高低与采用的检测方法敏感度有关,如采用深度测序法,则几乎每个健康人均可检测到一个以上基因突变,故规定CHIP的基因突变负荷必须要达到一定的标准。Steensma等^[4]规定要求等位基因突变分数(variant allele fraction, VAF)≥2%。除基因突变外,出现相关基因拷贝数变异(CNV)也可诊断为CHIP。Jacobs等^[8]的全基因组关联研究(GWAS)结果表明,造血系统肿瘤基因相关染色体位点(如20q、5q、11q和17p)CNV在血液学

指标正常的 70 岁以上老人中发生率高达 2%，这些人群今后发生血液肿瘤的危险加大，提示 CNV 也可成为血液肿瘤发生的起始事件。需要指出的是，CHIP 不包括阵发性睡眠性血红蛋白尿症 (PNH)。

可作为 CHIP 诊断依据的突变基因谱尚无明确界定。与血液肿瘤发生密切相关的驱动基因以及其他已经在各种血液肿瘤中发生的重现性基因突变可作为诊断依据。Steensma 等^[4]推荐如下基因作为诊断 CHIP 的依据：DNMT3A、TET2、JAK2、SF3B1、ASXL1、TP53、CBL、GNB1、BCOR、U2AF1、CREBBP、CUX1、SRSF2、MLL2、SETD2、SETDB1、GNAS、PPM1D 和 BCORL1。Xie 等^[9]分析了 2 728 例血液学正常的非血液系统实体肿瘤患者外周血细胞中 77 个血液肿瘤相关基因，包括单核苷酸变异和缺失。为除外细胞毒药物诱发的基因突变，入组患者均为初诊者，未经过化疗或放疗。检测发现，83% 的突变来自与白血病、淋巴瘤相关的 19 个基因，大部分 VAF 较低 (2%~10%)，提示造血细胞克隆处于扩张的早期阶段。通过与多种血液肿瘤基因突变谱比较，认为 9 个常见基因 DNMT3A、TET2、JAK2、ASXL1、TP53、GNAS、PPM1D、BCORL1 和 SF3B1 与血液肿瘤发生的起始有关，而在上述人群中未发现与 MDS 密切相关的基因突变，如 IDH1、RUNX1、NRAS、NPM1 和 FLT3 等，提示这些基因可能为 MDS 等血液肿瘤发生与否的看门基因，与其他基因相互作用而在血液肿瘤的发生和发展中发挥作用。

二、CHIP 的鉴别诊断

临床上，部分患者有持久性 (>6 个月) 和符合 MDS 最低诊断标准的血细胞减少，即 HGB < 100 g/L 和 (或) 中性粒细胞绝对计数 (ANC) < $1.0 \times 10^9/L$ 和 (或) PLT < $100 \times 10^9/L$ ，但无诊断 MDS 的其他依据，并且通过充分的检查排除了继发性血液或非血液学疾病后，患者血细胞减少的病因仍不能明确，这部分患者可称为意义未明特发性血细胞减少症 (ICUS)。研究发现，部分 ICUS 患者存在以基因突变为标志的克隆性造血，正确认识血液肿瘤相关基因突变的临床意义与 ICUS 患者的进一步诊断和临床管理密切相关。大多数血液肿瘤患者均存在多种基因的异常，如几乎所有 MDS 患者都存在一个以上基因突变，其中 80% 以上为血液肿瘤相关基因，但无一个基因是特异性或优势性表达于 MDS，这些基因发生频率也很低，发生率最高的 SF3B1 和 TET2 也仅为 20%~25%。另外，由于血液学指标正常人群中血液肿瘤相关基因突变高频率的存在，因此，发现基因突变不能作为 MDS 的诊断依据，但不存在以基因突变为标志的克隆性造血可以作为排除 MDS 的重要依据^[4,10]。在 2007 年 WHO 关于 MDS 诊断的工作方案中，将伴有基因突变的 ICUS 患者诊断为高度怀疑的 MDS (HS-MDS)^[11]，而 Kwok 等^[10]则称这些患者为意义未明的克隆性血细胞减少症 (clonal cytopenias of undetermined significance, CCUS)。CHIP 与 ICUS 以及 CCUS 最大的不同是 CHIP 个体绝大多数无血细胞减少，仅少部分伴有无意义的血细胞减少。需要指出的是，伴有无意

义的血细胞减少的 CHIP 与 CCUS 或 HS-MDS 的区别仅仅是血细胞减少的程度不一。由于血细胞正常值的确定受种族以及性别的影响，而且 MDS 血细胞减少最低标准的确定具有一定主观性^[4,12]，因此，伴有无意义的血细胞减少的 CHIP 与 CCUS 或 HS-MDS 是同一种疾病还是在发生机制上截然不同的两个实体值得进一步研究。

CHIP 需要与意义不明的特发性病态造血 (idiopathic dysplasia of undetermined significance, IDUS) 鉴别。IDUS 多见于 50 岁以上人群，患者存在骨髓细胞病态造血但外周血细胞计数正常且无其他能引起病态造血的原因^[4,12]。

三、CHIP 的意义

(一) 临床意义

绝大多数 CHIP 携带者不会发生血液系统肿瘤，其机制与机体免疫监视功能的限制、克隆发生在无自我更新的细胞、突变负荷低以及能与其产生协同作用的附加基因未发生突变有关^[4]。但总体上，CHIP 个体发生血液肿瘤的概率高于非 CHIP 个体。Jaiswal 等^[2]对 17 182 名正常人群中的 134 名 CHIP 个体进行了为期 95 个月的随访，发现其中 16 例最终发生了血液系统肿瘤，其中 5 例 (31%) 发生在早期存在基因突变的基础上。采用统计学方法计算出 CHIP 个体发生血液系统肿瘤的相对危险度为 11.1 (95% CI 3.9~32.6)，其中 VAF ≥ 0.1 者可高达 50 (95% CI 21~120)。发生血液肿瘤者的早期 VAF 显著高于未发生肿瘤者。从群体来看，CHIP 个体发生血液肿瘤的概率为 4%，年发生率为 0.4%，VAF ≥ 0.1 者约为 1%。比较后发现，CHIP 个体发生血液肿瘤的概率与 MBL 发展为慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 和 MGUS 发展为多发性骨髓瘤 (MM) 的发生率相似，但与 MBL 和 MGUS 的单一系列进展不同，由于 CHIP 为造血干细胞水平受累，故其可向多个髓系方向进展^[2]。

CHIP 个体的总生存期也低于非 CHIP 个体。Genovese 等^[3]对血液学正常的 5 132 例个体进行了为期 96 个月的随访，经过年龄、性别以及是否存在糖尿病等心脑血管疾病危险因素校正后证实，有无血液肿瘤基因突变与随访个体的全因死亡率相关 (相对危险度为 1.4)。死亡原因除血液系统肿瘤外，CHIP 个体冠心病死亡和脑卒中的相对危险度也分别高达 2.0 (95% CI 1.2~3.5) 和 2.6 (95% CI 1.3~4.8)，而且 CHIP 是独立于吸烟、高胆固醇和高密度脂蛋白增高等危险因素的独立预后因素。

(二) 预后

Steensma 等^[4]通过多元分析发现，不明原因的血细胞减少是影响 CHIP 最主要的因素。Kwok 等^[10]将原因不明的血细胞减少者分为三组：MDS 组、伴有 MDS 的部分证据但达不到 MDS 诊断标准组以及无 MDS 证据组。检测常见的 21 个血液肿瘤相关基因，三组的基因突变率分别为：80%、50% 和 22%。其他影响 CHIP 的因素还有：男性 (略高于女性)、淋巴细胞增多、白细胞增多、持续性嗜酸细胞或单核细胞增多但达不到其他疾病的诊断标准。突变基因的类型、突变的数量、VAF 等也影响 CHIP 个体的预后^[4]。另一个需要

回答的问题是:CHIP是血液肿瘤吗?研究发现,CHIP与MDS区别之一是突变负荷的不同。Cargo等^[13]对4 835例ICUS患者进行随访,最终有82例发展为AML和MDS,82例AML患者中有69例保存了ICUS阶段的外周血细胞。作者对该69例患者ICUS阶段外周血细胞进行深度基因检测和细胞遗传学检测,结果发现63例存在基因突变或染色体结构异常,突变基因谱与MDS相似。发展为血液肿瘤的ICUS患者的VAF明显高于CHIP(40%对9%~10%),伴有附加突变者的比例也高于CHIP(64%对8%)。该结果表明,CHIP在疾病本质上不仅不同于MDS,而且与CCUS也存在显著差异,提示不能将CHIP视为肿瘤性疾病,如同MBL不同于CLL和MGUS不同于MM一样。

由于CHIP的临床意义和预后尚不明确,故目前主张以存在的突变基因为主要靶标定期进行监测^[4],但最近国际骨髓瘤工作组将具有某些临床特征(包括轻度贫血)的冒烟性骨髓瘤划为活动性MM^[14]的思路提示不能仅仅根据克隆负荷的大小,还要结合其他一些伴随特征,尤其是血细胞计数等来判断CHIP的预后。因此,对伴有轻度血细胞减少的CHIP尤其要要加强监测。

有关CHIP,还有很多问题尚不明确。如可作为CHIP诊断依据的突变基因谱如何明确界定? VAF \geq 2%是否合理? VAF低于2%的临床意义如何? CHIP如何精确管理?上述问题的解决有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Champion KM, Gilbert JG, Asimakopoulos FA, et al. Clonal haemopoiesis in normal elderly women: implications for the myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes [J]. *Br J Haematol*, 1997, 97(4): 920-926.
- [2] Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes [J]. *N Engl J Med*, 2014, 371 (26): 2488- 2498. doi: 10.1056/NEJMoa1408617.
- [3] Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence [J]. *N Engl J Med*, 2014, 371 (26): 2477-2487. doi: 10.1056/NEJMoa1409405.
- [4] Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes [J]. *Blood*, 2015, 126(1): 9-16. doi: 10.1182/blood-2015-03-631747.
- [5] Welch JS, Ley TJ, Link DC, et al. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia [J]. *Cell*, 2012, 150(2): 264-278. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.023.
- [6] Yoshizoto T, Dumitriu B, Hosokawa K, et al. Somatic mutations and clonal hematopoiesis in aplastic anemia [J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(1): 35-47. doi: 10.1056/NEJMoa1414799.
- [7] Holstege H, Pfeiffer W, Sie D, et al. Somatic mutations found in the healthy blood compartment of a 115- yr- old woman demonstrate oligoclonal hematopoiesis [J]. *Genome Res*, 2014, 24(5): 733-742. doi: 10.1101/gr.162131.113.
- [8] Jacobs KB, Yeager M, Zhou W, et al. Detectable clonal mosaicism and its relationship to aging and cancer [J]. *Nat Genet*, 2012, 44(6): 651-658. doi: 10.1038/ng.2270.
- [9] Xie M, Lu C, Wang J, et al. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies [J]. *Nat Med*, 2014, 20(12): 1472-1478. doi: 10.1038/nm.3733.
- [10] Kwok B, Hall JM, Witte JS, et al. MDS-associated somatic mutations and clonal hematopoiesis are common in idiopathic cytopenias of undetermined significance [J]. *Blood*, 2015, 126(21): 2355-2361. doi: 10.1182/blood-2015-08-667063.
- [11] Valent P, Horny HP, Bennett JM, et al. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference [J]. *Leuk Res*, 2007, 31(6): 727-736. doi: 10.1016/j.leukres.2006.11.009.
- [12] Valent P. Low blood counts: immune mediated, idiopathic, or myelodysplasia [J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2012, 2012: 485- 491. doi: 10.1182/asheducation-2012.1.485.
- [13] Cargo CA, Rowbotham N, Evans PA, et al. Targeted sequencing identifies patients with preclinical MDS at high risk of disease progression [J]. *Blood*, 2015, 126(21): 2362-2365. doi: 10.1182/blood-2015-08-663237.
- [14] Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma [J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(12): e538-548. doi: 10.1016/S1470-2045(14) 70442-5.

(收稿日期:2016-02-19)

(本文编辑:刘志红)