

《二代测序技术在血液肿瘤中的应用 中国专家共识 (2018 年版)》解读*

Interpretation of "Expert consensus on the application of next-generation sequencing in hematological neoplasms (2018)"

汝昆¹

[关键词] 二代测序技术;血液肿瘤

Key words next-generation sequencing;hematological neoplasms

doi:10.13201/j.issn.1004-2806.2019.05.004

[中图分类号] R733 [文献标志码] C



专家简介:汝昆,主任医师,研究员,博士生导师,中国医学科学院血液病医院病理中心主任。擅长血液病理的疑难病例诊断,目前致力于人工智能在血液病的精准诊断方面的研究。承担国家级和省市级课题及人才项目 11 项;国内外期刊发表学术论文 90 余篇,包括 SCI 40 余篇;参编 7 部血液学专著;主导和参与制定 11 项血液病诊疗中国专家共识/指南;中国认可委医学专委会委员、国家药监局医疗器械分类技术委员会委员、中国老年医学会病理学分会副会长、中国抗癌协会血液肿瘤专委会常委兼血液病理工作组组长、天津市医学会病理学分会主任委员、天津医师协会检验医师分会副会长等;担任美国临床病理杂志、北美医学杂志、中华病理学杂志、中华血液学杂志、临床与实验病理学杂志、白血病·淋巴瘤等杂志编委。

二代测序(next-generation sequencing, NGS)技术的广泛应用,使得越来越多具有重要临床意义的突变基因被发现,基因突变分析已经成为血液肿瘤诊疗的必要手段。然而目前国内尚缺乏一个 NGS 技术在血液肿瘤应用的统一认可的标准,导致各实验室测序质量良莠不齐、数据解读差异大,影响后续诊疗。为了规范 NGS 在血液肿瘤诊疗中的应用,提高血液肿瘤的诊疗水平,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,组织我国 61 家医院、85 位相关专家进行了讨论,制定了《二代测序技术在血液肿瘤中的应用中国专家共识(2018 年版)》^[1]。本文对该共识进行简要解读,以便于读者更好地理解,从而指导临床应用。

1 NGS 在血液肿瘤诊疗中的应用价值

随着血液肿瘤发病机制的深入研究,基因突变在疾病发生、发展过程中的作用逐步被证实,目前已有部分具有明确诊断、预后及治疗意义的突变基因被列入造血与淋巴组织肿瘤 WHO 分类或 NC-CN 指南(表 1 和 2)^[2-3]。

NGS 由于具有通量高、灵敏度高、可定量和成本低的优势,在基因突变的检测及血液肿瘤的诊疗中发挥着不可替代的作用。近几年,NGS 除了在临床上广泛应用于血液肿瘤的诊断分型、预后判定和个性化治疗外,在微小残留病(MRD)监测和克隆演变方面的研究逐渐增多,其应用价值也逐步显现,成为临床应用的新方向。

MRD 的监测目前主要利用流式细胞学(FCM)和实时定量 PCR 两种技术手段,前者的应用范围较广,但是灵敏度低(10^{-4});后者灵敏度可达 10^{-5} ,但每次反应仅能检测一个基因片段。MRD 监测的分子指标包括融合基因、异常表达基因、基因突变。融合基因是特异的 MRD 监测分子指标,但不是所有的血液肿瘤患者都会存在融合基因;对于异常表达基因如 WT1、EVI1 等,由于正常

* 基金项目:国家科技重大专项(No:2017ZX09304024);中国医学科学院医学与健康创新工程(No:2017-I2M-1-015);天津市人才发展特殊支持计划高层次创新创业团队项目(No:TJZJH-GCCCXYTD-2-18);天津市科技服务业科技重大专项(No:17ZXF000110)

¹ 中国医学科学院血液病医院(血液学研究所)(天津,300020)

通信作者:汝昆, E-mail: kunru@yahoo.com

表 1 列入 WHO 血液肿瘤诊断标准中的基因

血液肿瘤	诊断基因
急性髓系白血病伴重现性遗传学异常	NPM1、CEBPA、RUNX1
遗传易感性髓系肿瘤	CEBPA、DDX41、RUNX1、ANKRD26、ETV6、GATA2
骨髓增殖性肿瘤	JAK2、CALR、MPL、CSF3R
骨髓增生异常/骨髓增殖性肿瘤	SF3B1、JAK2、CALR、MPL、PTPN11、KRAS、NRAS、NF1、CBL
骨髓增生异常综合征伴环形铁粒幼红细胞	SF3B1
毛细胞白血病	BRAF
淋巴浆细胞淋巴瘤/华氏巨球蛋白血症	MYD88

表 2 NCCN 指南中血液肿瘤预后和治疗密切相关的基因

血液肿瘤	预后及治疗基因
急性髓系白血病	NPM1、FLT3、CEBPA、RUNX1、ASXL1、TP53、KIT、IDH1、IDH2
骨髓增生异常综合征	ASXL1、EZH2、SF3B1、SRSF2、U2AF1、ZRSR2、RUNX1、TP53、STAG2、NRAS、ETV6、GATA2、SETBP1、BCOR、FLT3、WT1、NPM1、TET2
骨髓增殖性肿瘤	ABL1、JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、IDH1、IDH2、SRSF2、TP53、U2AF1、SF3B1、SH2B3
骨髓增生异常/骨髓增殖性肿瘤	ASXL1、EZH2、SRSF2、U2AF1、ZRSR2、TP53、NRAS、ETV6、SETBP1、BCOR
急性淋巴细胞白血病	ABL1、FLT3、IL7R、SH2B3、JAK1、JAK3、JAK2、IKZF1
慢性淋巴细胞白血病/小淋巴细胞淋巴瘤	TP53、BTK、PLCG2
淋巴浆细胞淋巴瘤/华氏巨球蛋白血症	CXCR4
T/NK 大颗粒淋巴细胞白血病	STAT3、STAT5B
血管免疫母细胞性 T 细胞性淋巴瘤	TET2、IDH1、IDH2、RHOA、DNMT3A
套细胞淋巴瘤	TP53

细胞也会表达,导致检测时会有一定的背景值,因此这类基因用于 MRD 监测的敏感性和特异性并不十分理想;几乎所有的血液肿瘤患者都会发生基因突变,且往往会有多种基因同时突变,不同患者突变位点和类型多样,但是单纯采用实时定量 PCR 无法实现多基因多位点的准确检测。NGS 通量高的优势恰恰可以弥补实时定量 PCR 的缺陷,而且通过提高检测深度可进一步提高 NGS 的灵敏度。因此在 MRD 的监测方面,NGS 具有不可替代的优势。

血液肿瘤是一类异质性极强的疾病,这种异质性不仅表现在不同个体之间的差异,更重要的是同一个体不同肿瘤细胞之间的差异。1976 年 Nowell^[4] 首先提出肿瘤异质性起源于克隆演变。基因突变是肿瘤细胞克隆演变的基础和前提,血液肿瘤在发生、发展的过程中,在各种外界因素的作用下,肿瘤细胞发生一系列动态的基因突变及克隆演变。已有的研究显示,血液肿瘤主要有以下 3 种克隆演变模式:①稳定模式,基因组较为稳定,初诊和复发时的克隆无差异;②线性模式,患者优势克隆始终保持不变,在此基础上又获得新的基因突变;③分支模式,患者病程初期有多种亚克隆存在,复发是由非优势亚克隆发展来^[5-8]。由此可见,血液肿瘤在克隆演变的过程中,会发生基因突变负荷的改

变,新的突变基因的出现或者原有突变基因的丢失,这种复杂的基因改变是传统的 PCR 或 Sanger 测序无法检测的,而 NGS 可一次检测到所有的基因变异,有效识别亚克隆,且灵敏度更高。通过 NGS 分析克隆演变,有助于了解血液肿瘤的分子发病机制、耐药机制,预测疾病的发展,并为治疗提供新的靶点^[9-12]。

2 基本流程

2.1 检测基因的设计

检测基因列表设计时首先需要考虑的是临床适用性,实验室检测应该从临床诊疗的需求出发,而不是单纯地考虑技术的优势,因此需要有临床专家参与制定。对于检测基因及基因检测区域的选择,则主要考虑其临床意义的重要性,同时综合样本数量、检测成本、检测平台等进一步优化。

对于引物/探针覆盖不到的重要区域,或者大片插入/缺失、碱基不平衡(连续碱基、高 GC 片段)等 NGS 效果差的基因片段,例如 FLT3-ITD、CEBPA、NPM1 等基因,需要通过 PCR、Sanger 测序等方法补充检测,避免出现假阴性。

2.2 分析前的样本采集

合格的样本是 NGS 结果可靠的前提,无论是骨髓、外周血还是组织样本,首先要确保样本中含有足够数量的肿瘤细胞。假定分析灵敏度为 5%~

10%,考虑到肿瘤细胞间异质性及杂合突变的情况,组织样本中肿瘤细胞比例应至少为10%~20%^[13]。一般情况下,建议NGS检测的组织样本中肿瘤细胞含量达到20%以上^[14]。对于肿瘤细胞含量低的样本时,应富集肿瘤细胞或增加NGS测序深度,才能降低假阴性结果。

2.3 分析中的NGS检测

NGS流程复杂,影响因素众多:①DNA质量,包括浓度、纯度和完整性。DNA的浓度和纯度可通过荧光定量仪和分光光度计测定;完整性可通过琼脂糖电泳或毛细管电泳评价。通常 $A_{260/280}$ 应介于1.6~2.2, $A_{260/230}$ 应介于1.6~3.0;DNA浓度建议不少于20 ng/ μ l;②文库浓度,常使用荧光定量仪及实时定量PCR仪进行定量,各实验室应依据测序平台及测序策略建立最低的合格文库量;③文库片段大小,可通过琼脂糖凝胶电泳或毛细管电泳检测,文库片段偏小或引物二聚体浓度比例偏高,均会导致有效测序数据量减少。文库片段偏大,会导致测序质量下降及测序后片段拼接时错误率增加;④实验用水应选择超纯水(18.2 M Ω ·cm),单纯的去离子水并不适用;⑤温度,除测序仪器运行需要适宜的温度外,室温过低会造成油包水PCR中的矿物油变粘稠,影响测序结果。此外,使用超声波进行DNA片段化过程中,水温需要保持2~8℃,以防止温度升高导致的碱基偏好性断裂。

2.4 分析后的生物信息学分析

NGS产生大量的原始数据,需要经过一系列生物信息学的分析。虽然不同的测序平台产生的数据类型及生物信息学分析过程用到的软件有所不同,但分析步骤大致相同,主要包括原始数据质控分析、数据比对、变异位点识别及注释、变异位点筛选。在分析过程中会使用到较多的软件以及数据库,实验室需要提前选择合适的软件,并设定好软件的相应分析参数及相应的质控指标,以保证数据分析的准确性。

在变异位点筛选环节,实验室需要建立严格的筛选标准,尽可能去掉假阳性位点,同时避免出现假阴性位点。筛选时主要考虑变异位点的测序深度、reads数、变异等位基因频率、碱基比对质量值等指标,同时参考变异位置、变异类型、功能预测数据库、人群数据库及疾病数据库等。

理想状态下,肿瘤体细胞突变通过分析配对的肿瘤和正常样本来识别。如果条件允许,应同时送检配对的正常组织(口腔黏膜或毛囊等)作为胚系突变对照。只是由于检测成本相对偏高,大部分情况下仅有肿瘤样本,此时,实验室则需要建立标准来尽可能区分体细胞突变和胚系突变,主要可参考变异等位基因频率、dbSNP、人群数据库、实验室自建数据库等。

2.5 结果报告及解读

检测结果的解释及报告的标准化,是NGS临床应用面临的困境之一。实验室需要将检测结果以全面、客观、简明、易懂的方式呈现给临床医生及患者。这个环节需要注意以下几点:①NGS结果由具备临床医学(尤其是血液学)及分子遗传学专业背景的人员共同解读,以满足临床应用的特殊要求;②为了方便临床医生从报告中迅速获取关键信息,建议对突变位点详细解读之前,根据患者情况进行总结性的说明及建议。对于多次送检的患者,尤其需要注意结合以往检测结果和临床信息进行综合分析;③推荐实验室根据突变位点临床意义的明确性进行分级报告,分为具有明确临床意义的突变、具有潜在临床意义的突变、临床意义未明的突变。新发现的良性或可能良性变异不建议列在报告中。突变位点应按照人类基因组变异协会(HGVS)规则规范书写,突变位点的描述信息应尽可能全面,如物理坐标、变异频率、测序深度等;④对于突变位点的解读,应描述其在临床诊断、预后评估和治疗中的意义,并提供数据库或参考文献等支持依据,同时应特别注意数据库及参考文献的适用性,避免检测结果的过度解读;⑤阴性结果不完全代表不存在突变,应注意排除由于灵敏度或检测区域局限性等技术原因所导致的假阴性;⑥随着研究的进展,某些基因的临床意义等信息可能会更新,如有特殊需求时可考虑补充报告内容。

3 NGS质量控制

NGS方法的复杂性,决定了其质量控制的严格性。总体来讲,NGS的质量控制和其他分子生物学检测相似,需要对分析前、分析中、分析后的各个环节设立严格的质控标准,并对有可能影响到检测结果准确性的各个因素进行评估和规定,包括人员、仪器、试剂、环境、检测方法等。

该共识的制定期望对NGS在血液肿瘤中的临床应用起到规范化的作用,从而提高我国血液肿瘤的诊疗水平。未来随着NGS在血液肿瘤临床应用的不断深入,NGS在检测内容、数据分析、结果解读和质量控制等方面也将会不断完善。

参考文献

- [1] 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.
- [2] Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. World Health Organization classification of Haematopoietic and Lymphoid Tissues[M]. 4th Edition. France: International Agency for research on Cancer, 2016.
- [3] National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guide-

(下转第347页)

- leukemia[J]. *Oncogene*, 2016, 35: 279—289.
- [11] Gao XN, Lin J, Ning QY, et al. A histone acetyltransferase p300 inhibitor C646 induces cell cycle arrest and apoptosis selectively in AML1-ETO-positive AML cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8: e55481.
- [12] Schneider R, Bannister AJ, Weise C, et al. Direct binding of INHAT to H3 tails disrupted by modifications[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 23859—23862.
- [13] Kutney SN, Hong R, Macfarlan T, et al. A signaling role of histone-binding proteins and INHAT subunits pp32 and Set/TAF-Ibeta in integrating chromatin hypoacetylation and transcriptional repression[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 30850—30855.
- [14] Brody JR, Kadkol SS, Hauer MC, et al. pp32 reduction induces differentiation of TSU-Pr1 cells[J]. *Am J Pathol*, 2004, 164: 273—283.
- [15] Kadota S, Nagata K. pp32, an INHAT component, is a transcription machinery recruiter for maximal induction of IFN-stimulated genes[J]. *J Cell Sci*, 2011, 124: 892—899.
- [16] Kadkol SS, Brody JR, Epstein JI, et al. Novel nuclear phosphoprotein pp32 is highly expressed in intermediate- and high-grade prostate cancer[J]. *Prostate*, 1998, 34: 231—237.
- [17] Shi H, Hood KA, Hayes MT, et al. Proteomic analysis of advanced colorectal cancer by laser capture microdissection and two-dimensional difference gel electrophoresis[J]. *J Proteomics*, 2011, 75: 339—351.
- [18] Ouellet V, Le Page C, Guyot MC, et al. SET complex in serous epithelial ovarian cancer[J]. *Int J Cancer*, 2006, 119: 2119—2126.
- [19] Li C, Ruan HQ, Liu YS, et al. Quantitative proteomics reveal up-regulated protein expression of the SET complex associated with hepatocellular carcinoma[J]. *J Proteome Res*, 2012, 11: 871—885.
- [20] Zhu BD, Li XL, Liu Y, et al. Involvement of Hepatopoietin Cn in the development of human hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2010, 27: 571—580.
- [21] Somerville TC, Cleary ML. Identification and characterization of leukemia stem cells in murine MLL-AF9 acute myeloid leukemia[J]. *Cancer Cell*, 2006, 10: 257—268.
- [22] Seo SB, Macfarlan T, McNamara P, et al. Regulation of histone acetylation and transcription by nuclear protein pp32, a subunit of the INHAT complex[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 14005—14010.
- [23] Beloribi-Djefafli S, Vasseur S, Guillaumond F. Lipid metabolic reprogramming in cancer cells[J]. *Oncogenesis*, 2016, 5: e189.
- [24] Takano S, Yoshitomi H, Togawa A, et al. Apolipoprotein C-1 maintains cell survival by preventing from apoptosis in pancreatic cancer cells[J]. *Oncogene*, 2008, 27: 2810—2822.

(收稿日期: 2019-02-14)

(上接第 343 页)

- lines) [EB/OL]. 2019. https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf.
- [4] Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations[J]. *Science*, 1976, 194: 23—28.
- [5] Ding L, Ley TJ, Larson DE, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing[J]. *Nature*, 2012, 481: 506—510.
- [6] Juskevicius D, Lorber T, Gsponer J, et al. Distinct genetic evolution patterns of relapsing diffuse large B-cell lymphoma revealed by genome-wide copy number aberration and targeted sequencing analysis[J]. *Leukemia*, 2016, 30: 2385—2395.
- [7] Landau DA, Carter SL, Stojanov P, et al. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia[J]. *Cell*, 2013, 152: 714—726.
- [8] Bolli N, Avet-Loiseau H, Wedge DC, et al. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma[J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 2997.
- [9] Montes-Moreno S, Routbort MJ, Lohman EJ, et al. Clinical molecular testing for ASXL1 c. 1934dupG p. Gly646fs mutation in hematologic neoplasms in the NGS era[J]. *PLoS One*, 2018, 13: e0204218.
- [10] Berger G, Kroeze LI, Koorenhof-Scheele TN, et al. Early detection and evolution of preleukemic clones in therapy-related myeloid neoplasms following autologous SCT[J]. *Blood*, 2018, 131: 1846—1857.
- [11] Weston-Bell N, Gibson J, John M, et al. Exome sequencing in tracking clonal evolution in multiple myeloma following therapy[J]. *Leukemia*, 2013, 27: 1188—1191.
- [12] Than H, Qiao Y, Huang X, et al. Ongoing clonal evolution in chronic myelomonocytic leukemia on hypomethylating agents: a computational perspective[J]. *Leukemia*, 2018, 32: 2049—2054.
- [13] 李金明. 高通量测序技术[M]. 北京: 科学出版社, 2018: 242—242.
- [14] 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.

(收稿日期: 2019-03-18)