



张曦,陆军军医大学新桥医院血液病医学中心主任,长江学者特聘教授,中华医学会血液学分会常务委员、重庆市医学会血液病专委会主任委员、中国医师协会血液科医师分会常务委员、中国抗癌协会血液肿瘤专委会常务委员;中国肿瘤青年科学家奖获得者、重庆市首席医学专家、首批重庆市医学领军人才、全军创新工程学科拔尖人才、重庆市科技创新领军人才、复合伤国家重点实验室固定PI;《JHO》、《Stem cells》、《Hematology》等杂志编委和审稿专家。主持国家、省部级课题30项;SCI论文52篇,最高IF24.008;主编/副主编著作3部;获中华医学科技一等奖1项,重庆市科技进步一等奖2项,省部级科技成果二等奖4项;获国家发明专利16项。

专家共识解读:二代测序如何辅助血液肿瘤的临床诊治

王平,苟阳,彭贤贵,张曦

中国人民解放军陆军军医大学新桥医院血液病医学中心,重庆 400037

【关键词】 专家共识;二代测序;血液肿瘤;形态学;病理学;诊断;靶向治疗

【中图分类号】 R733 【文献标识码】 A 【文章编号】 1003-6350(2019)21-2721-04

血液肿瘤已经从主要依靠形态学、病理学诊断和传统化疗发展到综合免疫学、遗传学和分子生物学等多技术手段的精准诊断和靶向治疗。二代测序(next-generation sequencing, NGS)成本自2008年开始降幅达99%,随着检测技术的成熟和革新,其在各个肿瘤中的应用研究成果开始逐步显现^[1-3],多个肿瘤及肿瘤亚型的基因突变图谱相继绘制成功,伴随的基因相关预后研究和靶向治疗的成果也日渐清晰。

NGS高通量可以一次检测多种基因改变。根据通量的不同或者一次检测基因数目的多少,NGS大致可以分为全基因组测序、全外显子组测序和选择其中的部分基因测序。近三年,NGS在肿瘤基因检测中的应用在我国也逐渐普及开。在现阶段的临床应用中,为了既达到辅助诊治的目的又节约成本,我国的检测机构对于单个患者样本常根据病种分类来选择和整合几十种基因进行NGS基因突变检测。由于有明确意义的和可能有意义的基因种类多,肿瘤亚型复杂,不同的检测机构对于不同肿瘤亚型的检测基因选择有较大差异;另外NGS是迅猛发展起来的实验技术,存在着诸如检测技术、数据管理、信息分析、报告解读与临床咨询等诸多方面的挑战。为推动血液肿瘤中NGS规范应用和诊疗水平的提高,近半年我国陆续出台了《二代测序技术在肿瘤精准医学诊断中的应用专家共识》^[4]和《二代测序技术在血液肿瘤中的应用中国专家共识(2018年版)》^[5]。本文结合专家共识对NGS

基因突变检测如何辅助血液肿瘤的临床诊治进行分析和探讨,重点在于阐明如何选择重要的基因进行检测及如何在临床中血液肿瘤患者的诊治上最大化地发挥NGS检测的价值。

1 NGS辅助血液肿瘤的诊断分型

血液肿瘤的分型最初依赖于主要基于原始细胞比例和形态学特点的英法美FAB分型标准,后期世界卫生组织提出的WHO分型标准综合了细胞形态学,免疫学,细胞遗传学及分子生物学特征,总称为MICM分型标准。目前我们对于血液肿瘤诊断分型的临床应用多是结合FAB细致的形态学分型和WHO的综合分型标准。在WHO分型标准中,充分体现了分子生物学和遗传学改变对于血液肿瘤分型的价值,即有特定的重现性的融合基因或者染色体改变的分子生物学异常的血液肿瘤均被单独列为一个亚类。最新的WHO2016对于血液肿瘤分型标准^[6]中,新定义了3个基因突变亚型:AML伴NPM1突变、AML伴CEBPA双等位基因突变及暂定类型AML伴RUNX1突变。部分基因阳性改写现有形态学诊断分型标准,如存在PML-RARα、CBFB-MYH11、和RUNX1/RUNX1T1(AML1-ETO)融合基因,髓系原始细胞比例不需要>20%而直接诊断急性髓系白血病(AML)伴重现性遗传学异常;骨髓增生异常综合征伴环形铁粒幼红细胞(MDS-RS)如存在SF3B1突变,形态学诊断标准中环状铁粒幼红细胞比例由≥15%降到≥5%,但MDS/

基金项目:重庆市社会事业与民生保障科技创新专项子课题(编号:cstc2016shms-ztx10003);重庆市社会事业与民生保障科技创新专项项目(编号:cstc2017shmsA130003)

通讯作者:张曦,主任医师、教授,博士(后)导师,E-mail:zhangxxi@sina.com

MPN-RS-T诊断中即使存在*SF3B1*突变仍然需要满足 $\geq 15\%$ 的环形铁粒幼红细胞。

此外,基因检测对于其他血液肿瘤突变基因也起到辅助诊断的作用。有很多以前诊断疑难的疾病由于基因的加入变得清晰^[4-6],如毛细胞白血病*BRAF-V600E*突变可与HCL-v和其他B细胞肿瘤鉴别;*JAK2*、*CALR*及*MPL*基因突变成为BCR-ABL阴性MPN诊断的主要标准之一;而三阴性MPN中的存在*ASXL1*、*EZH2*、*TET2*、*IDH1/2*、*SRSF2*、*SF3B1*基因突

变帮助确定克隆性质;*CSF3R*基因突变的出现为我们诊断慢性中性粒细胞白血病(CNL)提供了循证依据,缩短了临床观察时间,减少了误诊漏诊的发生。因此,在相应的肿瘤的NGS检测基因组合Panel的选择上必须具有代表性。首先,WHO分型名称中直接带有的基因对于诊断分型起决定性作用,如*NPM1*和*CEBPA*双突变;其次,分型中主要诊断标准和次要诊断标准中提到的基因也有非常重要的作用,具体基因见表1。

表1 WHO血液肿瘤中的诊断标准基因

血液肿瘤类型	诊断基因
急性髓系白血病伴重现性遗传学异常	融合基因 <i>PML-RARα</i> 、 <i>CBFB-MYH11</i> 和 <i>RUNX1/RUNX1T1</i> 突变基因 <i>NPM1</i> 、 <i>CEBPA</i> 、 <i>RUNX1</i>
遗传易感性髓系肿瘤	<i>CEBPA</i> 、 <i>DDX41</i> 、 <i>RUNX1</i> 、 <i>ANKRD26</i> 、 <i>ETV6</i> 、 <i>GATA2</i>
骨髓增殖性肿瘤(MPN)	<i>BCR-ABL</i> 、 <i>JAK2</i> 、 <i>CALR</i> 、 <i>MPL</i> 、 <i>CSF3R</i>
骨髓增生异常/增殖性肿瘤(MDS/MPN)	<i>CF3B1</i> 、 <i>JAK2</i> 、 <i>CALR</i> 、 <i>MPL</i> 、 <i>PTPN11</i> 、 <i>KRAS</i> 、 <i>NRAS</i> 、 <i>NF1</i> 、 <i>CBL</i>
骨髓增生异常综合征伴环形铁粒幼红细胞(MDS-RS)	<i>CF3B1</i> (形态学环铁比例下降到 $\geq 5\%$)
毛细胞白血病(HCL)	<i>BRAF</i>
淋巴浆细胞淋巴瘤/华氏巨球蛋白血症	<i>MYD88</i>

2 NGS辅助血液肿瘤的预后判断

临床对血液肿瘤的预后判断主要依据欧洲白血病网络(ELN)和美国国立综合癌症网络(NCCN)的标准,血液肿瘤的预后判断标准综合了患者的年龄、白细胞数、骨髓原始细胞比例等临床和形态学特征,也纳入了部分明确预后意义的突变基因(表2)^[7],例如,AML预后分层指标中的*FLT3-ITD*和*NPM1*突变,2017年ELN又新增*TP53*、*RUNX1*及*ASXL1*突变。此外,MDS建立与

临床之间有明显的相关性预后分层突变基因包括*ASXL1*、*DNMT3A*、*EZH2*、*IDH1*、*IDH2*、*KRAS*、*NPM1*、*NRAS*、*PTPN11*、*TET2*、*TP53*、*FLT3-ITD*。在急性淋巴细胞白血病(ALL)中Ph-like(如*ABL1*、*FLT3*、*JAK*、*IKZF1*等)相关突变、慢性淋巴细胞白血病/小淋巴细胞淋巴瘤(CLL/SLL)和套细胞淋巴瘤(MCL)中*TP53*、*LPL/WM*中*CXCR4*、大颗粒淋巴细胞白血病(LGLL)中*STAT3*,均被证实具有明确预后意义^[6-7]。

表2 NCCN/ELN中血液肿瘤预后分层相关基因

血液肿瘤类型	预后基因
急性白血病	<i>NPM1</i> 、 <i>FLT3</i> 、 <i>CEBPA</i> 、 <i>RUNX1</i> 、 <i>ASXL1</i> 、 <i>TP53</i> 、 <i>KIT</i> 、 <i>IDH1</i> 、 <i>IDH2</i>
骨髓增生异常综合征	<i>ASXL1</i> 、 <i>DNMT3A</i> 、 <i>EZH2</i> 、 <i>IDH1</i> 、 <i>IDH2</i> 、 <i>KRAS</i> 、 <i>NPM1</i> 、 <i>NRAS</i> 、 <i>PTPN11</i> 、 <i>TET2</i> 、 <i>TP53</i> 、 <i>FLT3</i> 、 <i>ITD</i>
骨髓增殖性肿瘤	<i>ABL1</i> 、 <i>JAK2</i> 、 <i>MPL</i> 、 <i>CALR</i> 、 <i>ASXL1</i> 、 <i>EZH2</i> 、 <i>IDH1</i> 、 <i>IDH2</i> 、 <i>SRSF2</i> 、 <i>TP53</i> 、 <i>U2AF1</i> 、 <i>SF3B1</i> 、 <i>SH2B3</i>
骨髓增生异常/增殖性肿瘤	<i>ASXL1</i> 、 <i>EZH2</i> 、 <i>SRSF2</i> 、 <i>U2AF1</i> 、 <i>ZRSR2</i> 、 <i>TP53</i> 、 <i>NRAS</i> 、 <i>NRAS</i> 、 <i>ETV6</i> 、 <i>SETBP1</i> 、 <i>BCOR</i>
急性淋巴细胞白血病	<i>ABL1</i> 、 <i>FLT3</i> 、 <i>IL7R</i> 、 <i>SH2B3</i> 、 <i>JAK1-3</i> 、 <i>IKZF1</i>
慢性淋巴细胞白血病/小淋巴细胞淋巴瘤	<i>TP53</i> 、 <i>IgHv</i> 突变、 <i>BTK</i>
淋巴浆细胞淋巴瘤/华氏巨球蛋白血症	<i>CXCR4</i>
T/NK大颗粒淋巴细胞白血病	<i>STAT3</i> 、 <i>STAT5B</i>
血管免疫母细胞T细胞淋巴瘤	<i>TET2</i> 、 <i>IDH1</i> 、 <i>IDH2</i> 、 <i>RHOA</i> 、 <i>DNMT3A</i>
套细胞淋巴瘤	<i>TP53</i>

肿瘤被普遍认为是一个来源于有基因突变的肿瘤干细胞的多步骤克隆演变过程^[8],同一肿瘤亚型中不同的肿瘤群体有不同的预后归因于肿瘤亚型的不均一性。肿瘤细胞在患者个体的生长增殖特性由肿瘤细胞本身决定,而不同肿瘤患者肿瘤细胞基因突变的差异是其本质来源,多个基因共同作用决定肿瘤的转归。在一项AML预后判断的研究中^[9],作者结合多个突变基因和白细胞数、年龄的积分来判断AML患者的预后;在另一项对1540例AML的研究中,作者

分析多个特征对患者预后的影响作用大小,临床特征和治疗对于预后的贡献作用仅占9%和5%,而融合基因、基因拷贝数变异、基因点突变和基因相互作用对预后的贡献作用合计达到62%^[10]。还有很多关于不同血液肿瘤的预后的临床研究,这些研究结果随患者群体、治疗和基因监测的差异显示不同差异。因此,在临床分层治疗采用这些结果时,需要经过筛选和备注。对于在未纳入指南的基因,尽量选择经权威文献发表和大规模临床研究的检测基因作为参考。

3 NGS指导血液肿瘤的靶向治疗

随着肿瘤驱动基因发现和明确,其相应的靶向治疗药物研发也是一直在进行中,靶向基因治疗比传统药物化疗更具有针对性,毒副作用小,效果显著,一直被寄予厚望。在血液肿瘤治疗方面,虽然目前主要的治疗方案依旧是依托于传统化疗方案,但是靶向治疗在部分肿瘤亚型中已经发挥了重要作用,某些疾病治疗策略发生改变,如CML在伊马替尼时代进入慢病

管理模式。目前FDA以及CFDA已批准了部分用于临床的靶向药物(表3),还有大量应用于临床试验阶段的靶向药物,如2017FDA批准治疗FLT3+AML的midostaurin、治疗IDH2+AML的Enasidenib以及BRAF、JAK-STAT信号通路相关突变基因靶向药物上市;另外治疗DOT1L突变阳性MLL易位相关肿瘤的EP2-5656、治疗EZH2突变的DS-3201等临床试验药物取得较好疗效。

表3 FDA和CFDA批准的药物及基因靶点

FDA批准的基因靶向药物	疾病类型	需检测的靶点	CFDA批准否
甲磺酸伊马替尼	BCR-ABL+CML	BCR-ABL	是
达沙替尼	BCR-ABL+ALL		
尼罗替尼			
西达苯胺	PTCL	否	是
芦可替尼	PMF、PPV-MF、PET-MF	否	是
伊布替尼	MCL、CLL/SLL、WM、MZL、non GCB-DLBCL	否	是
硼替佐米	MCL、MM	否	是
Ivosidenib	AML	IDH1	否
enasidenib	AML	IDH2	否
Midostaurin	AML	FLT3	否
gilteritinib			
glasdegib	AML	否	否
Venetoclax	CLL/SLL、AML	否	否
duvelisib	CLL/SLL、FL	否	否
idelalisib	CLL	否	否
copanlisib	FL	否	否
Selinexor	MM	否	否
panobinostat	MM	否	否
belinostat	PTCL	否	否

大多靶向药物的治疗需要相应的基因改变,部分不需要基因改变,但也有研究认为有相关基因改变时其作用反应率更好,如去甲基化药物的应用与表观遗传学相关基因改变的关系^[11]。在FDA上市的靶向药物很多在我国仍未上市,部分在我国仍处于临床试验阶段,如治疗IDH2+AML的Enasidenib等。另外FDA和CFDA对于靶向药物的治疗范围规定比较具体,有很大一部分靶向药物可应用于有不同基因改变的不同实体肿瘤,但是这些基因改变在血液肿瘤中也有一定的发生率,特别是在淋巴瘤中,未来这些药物的应用是否可以拓宽到有相应基因改变的肿瘤很值得期待。所以,对于血液肿瘤,检测一些虽然FDA和CFDA仍未纳入治疗范围内的基因,但是有相应靶向治疗药物的基因有一定的必要性,可能有助于辅助未来对该肿瘤患者的治疗。

另一方面,基因突变可导致肿瘤细胞对某些药物的耐受或敏感,突变检测有助于治疗方案的调整与优化。例如,常规化疗对TP53突变阳性CLL/SLL患者反应差;LPL/WM治疗中MYD88和CXCR4基因突变降低伊布替尼可治疗效果,慢性髓性白血病(CML)和

Ph+ALL中ABL1激酶区突变是酪氨酸激酶抑制剂(TKI)主要耐受机制。

4 NGS应用于血液肿瘤的MRD监测

肿瘤治疗后肿瘤细胞的微小残留病灶MRD的存在被认为是肿瘤复发的根源,监测肿瘤治疗后MRD的高低也就成为判断肿瘤治疗疗效,预后与复发可能的重要指标。多色流式细胞(MFC)和实时定量PCR是目前MRD监测的主要技术,MFC几乎适用于所有白血病患者,但灵敏度偏低(10^{-4});二代流式细胞(NGF)检测 10^7 细胞灵敏度可达到 10^{-5-6} ,但样本耗量及成本较高;PCR灵敏度可达 10^{-5} ,但临床适用性较窄,仅能检测一个基因片段。MRD的分子指标包括融合基因、过表达及突变基因。仅小部分血液肿瘤患者存特异的MRD分子指标融合基因;而过表达基因如WT1、EV11等存在低表达的正常细胞,由于检测时高背景值和不明确MRD阈值,导致临床实践中实时定量PCR用于此类MRD监测的其敏感性和特异性并不理想。然而,高通量NGS能同时完成多基因多位点的精准检测,伴随深度检测提高灵敏度,其在MRD监测将具有更大的优势。

肿瘤细胞克隆的异质性决定了其基因改变的复杂性,基因改变的种类和数量会随着肿瘤的发展和治理不断发生改变,例如有一些过去认为的驱动基因改变如DTA (*DNMT3A*、*TET2*、*ASXL1*)可能存在于正常老年人体内,在治疗后也可能持续存在;而有些基因改变在治疗过程中都相对比较稳定,如*NPM1*和*CEBPA*^[12],所以选择哪些基因来进行MRD的监测至关重要,目前仍处于研究状态中,但是对于肿瘤患者治疗过程中的基因改变进行监测还是可以比较直观地体现治疗的疗效。

5 NGS检测结果的准确性直接关系其在临床诊治中的应用

5.1 检测基因的选择至关重要 共识中明确提出了不同血液肿瘤亚型必要检测基因和建议检测基因,根据患者的经济情况和治疗意愿可以进行选择。在临床实际应用过程中,对于一个初诊血液肿瘤患者,最初送检时对肿瘤亚型常常未知甚至诊断方向偏差;NGS检测的送检需要一定周期,首先需要借助细胞形态学及流式免疫学快速明确诊断方向,再者血液病实验诊断人员与临床医生要和NGS技术人员充分沟通,最终选择最适合患者的NGS检测基因套餐,避免诊断方向偏移导致NGS选择错误。对于疑难病例的诊断,如MDS和AML、MDS和MPN或者AML和淋巴瘤的诊断在形态学都分辨不太清晰时需要进行更多相关基因的检测,应包含疾病可能性的基因检测项目。基因检测区域的选择也应覆盖常见的热点突变区域,当选择错误或者检测区域过窄时,均有可能导致假阴性的结果,达不到辅助诊治的目的。

5.2 临床需要实验结果的可靠性 临床需要提供合格的检测标本,标本中要包含足够量的肿瘤组织,对于白血病常可选择骨髓标本,对于淋巴瘤应尽量选择淋巴结等组织标本,可选择正常组织进行胚系突变的检测。NGS的测序深度不同时,检测的灵敏度也有差异,测序深度应达到要求。对于结果分析,因为信息量巨大,要尽量避免一些假突变的报道,如*FLT3*和*CEBPA*常出现较大片段缺失插入的基因突变的假阴性结果,必要时应用多种方法进行验证。

5.3 结果解释应该详细易懂 由于基因种类多,突变方式多,很多处于研究状态中,对于很多基因临床医生没有听过或者说不太了解,特别是对于指南和共识中没有提到的基因,其检测结果应给予详尽的解释。共识中提到的突变位点分级报告很有必要,应该区分开临床意义非常明确的基因、小规模报道的有临床意义的基因及临床意义尚有争议的基因。

6 总结

经过十多年的快速发展,二代测序基因突变检测对于肿瘤和血液肿瘤的诊治已经发挥着非常重要的作用。一些基因突变的应用已经被写入WHO、NCCN、ELN、FDA等临床指南和共识中,已经成功或者正在指导临床诊治;也有一些基因突变的应用经权威文献发表,被大规模报道但尚待临床大数据验证;还有一些基因突变的应用经小规模报道或者临床意义未明,尚有争议,但未来可能发挥巨大作用。在临床实践中,结合《专家共识》,不同的血液肿瘤选择合理的基因检测套餐,抽取合格的标本,进行NGS检测,得到准确的检测结果。临床解释运用需综合多方数据,有条件结合临床、形态学、免疫学诊断以及NGS等相关人员形成多学科团队模式,做到最合理临床服务,最大程度指导患者的诊断和治疗。

参考文献

- [1] MEYERSON M, GABRIEL SB, GETZ G, et al. Advances in understanding cancer genomes through second-generation sequencing [J]. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(10): 685-696.
- [2] KANDOTH C, MCLELLAN MD, VANDIN F, et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types [J]. *Nature*, 2013, 502(7471): 333-339.
- [3] LEY TJ, MILLER CA, DING L, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia [J]. *New Eng J Med*, 2013, 368(22): 2059-2074.
- [4] 中国临床肿瘤学会肿瘤标志物专业委员会, 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guide-Leukemia) [J]. *Oncogene*, 2016, 35: 279-289.
- [8] NOWELL PC. The clonal evolution of tumor cell populations [J]. *Science*, 1976, 194(4260): 23-28.
- [9] HOU H, LIU C, KUO Y, et al. Splicing factor mutations predict poor prognosis in patients with de novo acute myeloid leukemia [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(8): 9084-9101.
- [10] PAPAEMMANUIL E, GERSTUNG M, BULLINGER L, et al. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia [J]. *New Eng J Med*, 2016, 374(23): 2209-2221.
- [11] TRAINA F, VISCONTE V, ELSON P, et al. Impact of molecular mutations on treatment response to DNMT inhibitors in myelodysplasia and related neoplasms [J]. *Leukemia*, 2014, 28(1): 78-87.
- [12] JONGENIAVRENCIC M, GROB T, HANEKAMP D, et al. Molecular minimal residual disease in acute myeloid leukemia [J]. *New Eng J Med*, 2018, 378(13): 1189-1199.

(收稿日期:2019-08-13)