



· 综述 ·

克隆性造血对肿瘤体细胞突变检测的影响

陈馨宁¹, 王蓓丽^{1,2}, 郭 玮^{1,2}

1. 复旦大学附属中山医院检验科, 上海 200032 ;
2. 复旦大学附属中山医院厦门医院检验科, 福建 厦门 361015

[摘要] 克隆性造血 (clonal hematopoiesis, CH) 突变是造血干细胞 (hematopoietic stem cell, HSC) 携带的突变, 是年龄和外在环境 (吸烟、放化疗等) 共同作用的结果。随着肿瘤基因研究的进展, 基因检测已成为实体瘤患者全病程管理中一个重要的环节。目前CH在实体瘤中的价值越来越受到关注。将围绕CH的检出, 详细阐述实体瘤患者组织样本及循环肿瘤DNA (circulating tumor DNA, ctDNA) 样本中CH的检测方法, 探讨CH对肿瘤体细胞突变检测的影响和挑战。

[关键词] 克隆性造血; 肿瘤; 基因检测; 循环肿瘤DNA; 体细胞突变

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2020.09.011

中图分类号: R730 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2020)09-0707-05

Impact of clonal hematopoiesis on the detection of somatic mutation CHEN Xinning¹, WANG Beili^{1,2}, GUO Wei^{1,2} (1. Department of Laboratory Medicine, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China; 2. Department of Laboratory Medicine, Xiamen Branch, Zhongshan Hospital, Fudan University, Xiamen 361015, Fujian Province, China)

Correspondence to: GUO Wei E-mail: guo.wei@zs-hospital.sh.cn

[Abstract] Clonal hematopoiesis (CH) is mutation derived from hematopoietic stem cell (HSC). It is the result of the joint action of age and external environment (smoking, radiotherapy and chemotherapy, etc.). With the development of tumor genomics, genetic testing has become an important part in the whole course medical management of patients with tumor. The value of CH in solid tumors has attracted more and more attention. Focusing on the detection of CH, this review described in detail the detection methods of CH in tissue samples and circulating tumor DNA (ctDNA) samples. Furthermore, we explored the influence and challenge of CH on the detection of somatic mutation in tumors.

[Key words] Clonal hematopoiesis; Tumor; Genetic testing; Circulating tumor DNA; Somatic mutation

克隆性造血 (clonal hematopoiesis, CH) 是一种与年龄相关的生物学状态^[1]。随着对这一问题探索的深入, 研究人员逐渐摸索出CH的大致突变谱, 对其发生、发展的机制也有了初步了解。相关研究^[1]也揭示了CH与恶性血液肿瘤及非恶性疾病间的关联性。在近5年内, CH的文献报道爆炸式增长, 越来越多的研究者开始着眼于其对肿瘤体细胞突变的影响。

肿瘤的诊疗已经逐渐步入精准医疗时代, 医患双方在追求个体化的同时也更加强调精确性。CH对基因检测会带来怎样的影响? 是否会对后续临床应用产生干扰? 医师和患者在报告解读时

有哪些需要额外关注的地方? 以上都是业界关注的热点, 本文也将就此展开讨论。

1 CH的定义

CH通常是指具有单或多个体细胞突变的血细胞克隆亚群的增殖, 伴或不伴轻度血细胞减少^[1]。2015年提出了意义未明的CH (CH of indeterminate potential, CHIP) 这一术语用于描述血液肿瘤前状态, 指不符合恶性血液疾病的个体, 血液或骨髓中出现相关体细胞突变的现象, 亦被称为与年龄相关的CH (age-related CH, ARCH)^[2-3]。在血液相关文献表述中, CHIP这一表达更为常用, 而其余如实

体瘤或非恶性疾病相关文献中则更倾向于使用CH。为了便于临床应用和基因检测结果解读,

CH需要在定义上与体细胞突变进行明确的区分(表1)^[4]。

表1 CH与体细胞突变的比较

Tab. 1 Comparison between CH and somatic mutation

Item	CH	Somatic mutation
Mutant cell	Hematopoietic stem cell	Cells other than germ cells
Mutant gene*	<i>DNMT3A</i> , <i>TET2</i> , <i>PPM1D</i> , etc.	<i>TP53</i> , <i>KRAS</i> , <i>PIK3CA</i> , etc.
Clinical consequence	Hematological tumors, cardiovascular diseases, etc.	Cancer, etc.
Fragment length	173-191 bp and 346-361 bp	127-141 bp and 272-292 bp

*: Genes listed in this table are the three mutations with the highest incidence

2 CH相关因素

CH的发生是造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)内在衰老和外环境因素共同作用的必然结果和客观存在^[5]。

2.1 年龄

普遍认为, CH与年龄相关, 但并非必然结局。2012年, 相关研究^[6]报道并首次证明了体细胞突变基因*TET2*的CH发生在健康老年个体身上。CH的发生率和突变数随着年龄的增长而增长, 且在老年个体中(>60岁)发生率达到5.7%~20.0%^[1, 7-8]。因此, 尽管CH与特定癌种并没有直接关系, 但生殖系统肿瘤由于其发病年龄普遍较低, CH发生率也最低^[9]。

2.2 性别

在60岁及60岁以上人群中, 有研究^[11]发现, 男性相较于女性, 突变检出率更高。这与男性患骨髓增生异常综合征和急性髓系白血病的风险更高一致。

2.3 吸烟史

CH在有吸烟史的个体中也更常见。吸烟史甚至会影响CH突变的类型^[9]。

2.4 人种

根据报道, 西班牙裔人群中CH相对较低, 这与他们除急性早幼粒细胞白血病外其他髓系肿瘤的发病率低相一致^[1]。

2.5 治疗

接受放疗的患者CH的发生率较高, 甲状腺癌患者由于放射性碘治疗的原因, CH的发生率在所有非血液系统肿瘤中最高。化疗对于CH的影响存在争议, 部分认为存在一定促进克隆

扩增的作用。在异体HSC移植中, 如果供体存在CHIP, 可能导致移植后受体体内发生克隆增长, 尽管不会加速恶化血液疾病本身, 但仍可能带来如感染、移植物抗宿主病等风险^[10]。

3 CH的意义

常见CH基因通常与血液恶性肿瘤相关, 如*DNMT3A*、*TET2*、*PPM1D*、*ASXL1*、*ATM*和*TP53*依次是发生频率较高的CH突变, 占到了所有CH突变的60%^[11]。CH的基因突变谱尚不明确, 研究^[12]中所报道过的与CH相关的基因包括*DNMT3A*、*TET2*、*ASXL1*、*TP53*、*JAK2*、*SF3B1*、*GNB1*、*CBL*、*SRSF2*、*GNAS*、*PPM1D*、*CUX1*、*KMT2D*、*BCOR*、*SETDB1*、*CREBBP*、*PIGA*、*SETD2*、*BCORL1*、*U2AF1*、*ZRSR2*、*LUC7L2*、*EZH2*、*RUNX1*、*MPL*、*RAD21*、*STAG2*、*SMC3*、*SMC1A*、*CTCF*、*FLT3*、*ATM*、*GATA2*、*WT1*、*ETV6*、*IDH1*、*IDH2*、*PHF6*、*NRAS*、*KRAS*、*PTPN11*、*SH2B3*、*STAT3*、*MYD88*、*CALR*、*CEBPA*、*KIT*、*NPM1*、*NF1*和*FAT1*。

目前, 倾向于将CH界定为一种生理性突变。但越来越多的研究表明, CH将是未来疾病风险的一种重要生物标志物。Coombs等^[9]发现, CH, 尤其是携带白血病相关驱动突变(CH-PD)与肿瘤的较差生存质量相关, 且后续可能继发治疗相关的髓系肿瘤包括骨髓增殖性肿瘤和急性白血病。同时, 也与较短的生存时间相关, 患者大多死于原发肿瘤的进展^[5, 13]。CH可以作为较差临床转归的间接衡量指标。CH与癌症进展之间的关联有可能是由于CH克隆与癌症细胞

间的相互作用^[9]，也可能是由于CH对免疫监控产生的影响^[14]。目前仍缺乏对患者的大样本长期随访来明确描述CH实体肿瘤患者的不良事件谱及其机制。因此，目前也无法建立有效的干预手段^[15]。

4 CH的检测和挑战

随着测序技术的普及，基因检测在肿瘤中广泛使用。医师和患者可能在无意间接受

CH相关检测结果。基因检测对CH鉴定，通常需要肿瘤来源DNA，如肿瘤组织或循环肿瘤DNA（circulating tumor DNA, ctDNA）和配对基因组DNA，如外周血或白细胞等。其次，测序技术的选择对CH检出率至关重要，检出率在很大程度上受到样本种类、最低检出限、测序深度、灵敏度及生物信息学分析的影响（表2）。

表2 检测CH的方法比较

Tab. 2 Comparison among CH detecting methods

Sequencing technology	Minimum detection limit	Prevalence of CH
ESC	0.01%	The prevalence of CH among healthy people between the age 60 and 69 is >20.0% ^[7]
Targeted	0.50%	The prevalence of CH among healthy people older than 55 is 27.7% ^[16]
WES	3.00%	The prevalence of CH among healthy people older than 65 is 10.4% ^[8]
WGS	7.00%	The prevalence of CH among all ages is 12.4% ^[17]

ESC: Error corrected sequencing; WES: Whole-exome sequencing; WGS: Whole-genome sequencing

4.1 组织样本

与先前将CH研究重点放在血液系统疾病中不同，2017年，Coombs等^[9]首次将这一概念推广至非血液系统领域。造血细胞渗透于所有的组织，在肿瘤组织中也不例外。因此，在肿瘤微环境中可以检测到CH相关突变。该研究^[9]检测了8 810例患者的配对肿瘤组织和血样，并得出如下结论：相关CH突变的等位基因的突变丰度（variant allele fraction, VAF）与肿瘤纯度成反比；血液中CH突变中位VAF是4.4%，而肿瘤组织中CH突变中位VAF是0.5%，且23%的CH突变在组织中无法检出，可能是肿瘤组织中血细胞的浸润所致。

值得注意的是，组织中对CH界定的方法通常为双层过滤模式：当血液VAF是肿瘤组织VAF的2倍以上，在剔除假阳性及胚系突变后，将突变为白血病淋巴瘤相关基因及无关基因。根据自定义的读长等生物信息学条件作为阈值，随后再根据VAF层层界定^[9, 14, 18-19]。

4.2 ctDNA样本

在基因诊断行业，液体活检早已不陌生，它是一种将人体体液作为样本来源检测获取疾病信息的技术^[20]。液体活检的发展适时地与“精准医疗”概念的推广相契合。ctDNA凭借其在肿瘤

全病程（早诊早筛、耐药监测、伴随诊断等）中的应用成为强有力的生物标志物，已经开始从科研走向临床。对许多癌种，如非小细胞肺癌、结肠直肠癌等带来理解上的颠覆。

许多研究也就CH突变之于ctDNA检测的影响进行了一系列数据积累和分析（表3）。综合表中罗列的研究，不难发现，CH相关研究对测序深度有一定的要求。

ctDNA中对于CH的界定，除了上述同组织一样应用过滤条件外，Hu等^[22]通过流式细胞分选技术，同时引入数字聚合酶链反应（digital droplet polymerase chain reaction, ddPCR）技术，对测序结果进行单位点验证，明确其中KRAS突变患者的突变来源。在且仅在淋巴细胞及其四个亚群中只检测到KRAS突变，表明一个淋巴细胞获得该突变后经历克隆增殖，这与CH情况一致。

4.3 CH对基因检测提出的挑战

2019年，Razavi等^[25]提出通过超高深度ctDNA测序分析发现，93.6%的无癌志愿者的白细胞携带一个CH突变，而这一比例在癌症患者群体中竟高达99.1%。这一结论一时在业界激起千层浪，人们无外乎质疑起ctDNA的临床应用场景。

表 3 二代测序检测ctDNA在实体瘤中CH的研究

Tab. 3 CH related research on next-generation sequencing of ctDNA in patients with solid tumor

Publication time	Cancer type	Case	Detection platform	Sequencing depth	Detected genes	Matched sample	Results
2017	Colorectal cancer, lung cancer, ovarian cancer, breast cancer	200	Illumina MiSeq	30 000	58 genes	Tumor-derived DNA	One case of <i>GNAS</i> mutation with ctDNA inconsistent with tissue was found, which was confirmed to be a metastatic mutation two years later. CH changes may be confused with heterogeneous tumor-specific mutations and lead to overdiagnosis ^[21]
2018	Lung cancer	143	Illumina NextSeq	1 200	<i>TP53</i> and <i>KRAS</i>	Peripheral blood cells derived DNA	The prevalence of <i>KRAS</i> mutations derived from CH was 3%, and most of the <i>TP53</i> mutations were CH-derived (19/33) ^[22]
2018	Metastatic prostate cancer	217	SeqCap EZ system	NA	58-658 genes (including multiple panels)	WBC-derived DNA	Forty false positive mutations were found in 31 patients (14.6%). Hotspot mutations in CH were <i>AKT1</i> , <i>BRAF</i> , <i>CTNNB1</i> , <i>DNMT3A</i> , <i>NRAS</i> , <i>SF3B1</i> and <i>TP53</i> ^[23]
2018	Colorectal cancer	58	Illumina NextSeq500	2 689-6 420	32 genes	Tumor-derived DNA	CH derived <i>TP53</i> mutations were found in 2 cases. The prevalence of CH was 7% ^[24]
2019	Pan-cancer	124	Illumina TruSeq	60 000	508 genes	WBC-derived DNA	CH mutations accounted for 53.2% of the mutations in tumor patients. Most of the mutations were <i>DNMT3A</i> , <i>TET2</i> , <i>PPM1D</i> and <i>TP53</i> ^[25]

NA: Not acknowledged

4.3.1 靶向药物治疗位点

以液体活检发展较为成熟的肺癌为例, 在最新版非小细胞肺癌美国国立综合癌症网络 (National Comprehensive Cancer Network, NCCN) 指南 (2020.1版) 中列出其基因检测相关靶点: 传统靶点包括 *EGFR*、*ALK*、*ROS1*、*BRAF*、*KRAS*、*NTRK*、*PD-L1*; 新靶点包括 *MET*、*RET*、*HER2*、*TMB*。可以发现, CH 涉及到的基因基本与靶向治疗位点无关。其他癌种相关靶点如胃癌的 *HER2*、*NTRK*, 卵巢癌的 *BRCA1/2*、*NTRK* 等, 由此可见, 对于实体瘤患者来说, CH 的发生对靶向药物的使用影响较小。

4.3.2 血液肿瘤突变负荷 (blood tumor mutation burden, bTMB)

TMB 是免疫治疗领域中重要的生物标志物之一。ctDNA 具有无创、动态监测的优势, 但是由于肿瘤异质性、检测平台敏感性及欠规范化, 对于 ctDNA 检测 TMB 本身还需更多大样本、前瞻性的临床研究进行探索。撇去以上因素, CH 现

象对于肿瘤患者 bTMB 结果的影响, 可以通过配对白细胞同等深度测序的过滤及优化算法等技术规避^[23]。

4.3.3 微小残留病变 (minimal residual disease, MRD) 监测

尽管目前掌握患者 CH 状态后并没有明确的临床干预措施。ctDNA 对于术后患者具有潜在的意义^[26], 目前认为术后微小残留病变监测涉及高深度测序的手段, 大多需要纳入手术组织作为基线状态以去除 CH 的影响。

因此 CH 的检出对于基因检测的临床发展并非一种阻碍。通过过滤方法、筛选条件和流程优化可以明确结果中 CH 的存在, 并提出其可能对相应临床应用场景产生的干扰。CH 的存在使精准医疗更加精准化、规范化。

5 结语与展望

在血液肿瘤和心血管等非恶性疾病与 CH 的认知基础上, 研究已经开始着眼于 CH 现象对于实体肿瘤的重要临床意义。本综述也明确了基因检测, 无论是组织样本还是 ctDNA 样本, 若想在

实体肿瘤的全病程中得到长足的发展, CH对肿瘤体细胞检测所产生的影响必定是要解决的问题之一。尽管在技术和生物信息学层面可以识别鉴定CH突变的存在以及在报告中对CH突变进行剔除, 但仍亟待行业规范的制定。

[参 考 文 献]

- [1] 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.
- [2] STEENSMA D P, BEJAR R, JAISWAL S, et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes [J]. *Blood*, 2015, 126(1): 9–16.
- [3] CHEN S, WANG Q, YU H, et al. Mutant *p53* drives clonal hematopoiesis through modulating epigenetic pathway [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 5649.
- [4] MARASS F, STEPHENS D, PTASHKIN R, et al. Fragment size analysis may distinguish clonal hematopoiesis from tumor-derived mutations in cell-free DNA [J]. *Clin Chem*, 2020, 66(4): 616–618.
- [5] 施 均. 我如何理解克隆性造血的临床问题 [J]. *中华血液学杂志*, 2018, 39(11): 895–897.
SHI J. How I understand clonal hematopoiesis in clinical practices [J]. *Chin J Hematol*, 2018, 39(11): 895–897.
- [6] BUSQUE L, PATEL J P, FIGUEROA M E, et al. Recurrent somatic *TET2* mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis [J]. *Nat Genet*, 2012, 44(11): 1179–1181.
- [7] ACUNA-HIDALGO R, SENGUL H, STEEHOUWER M, et al. Ultra-sensitive sequencing identifies high prevalence of clonal hematopoiesis-associated mutations throughout adult life [J]. *Am J Hum Genet*, 2017, 101(1): 50–64.
- [8] GENOVESE G, KÄHLER A K, HANDSAKER R E, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence [J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(26): 2477–2487.
- [9] COOMBS C C, ZEHIR A, DEVLIN S M, et al. Therapy-related clonal hematopoiesis in patients with non-hematologic cancers is common and associated with adverse clinical outcomes [J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 21(3): 374–382. e4.
- [10] GIBSON C J, KENNEDY J A, NIKIFOROW S, et al. Donor-engrafted CHIP is common among stem cell transplant recipients with unexplained cytopenias [J]. *Blood*, 2017, 130(1): 91–94.
- [11] 丁宇斌, 唐玉凤, 唐旭东. 潜质未定的克隆性造血研究进展 [J]. *白血病·淋巴瘤*, 2019, 28(4): 245–247.
DING Y B, TANG Y F, TANG X D. Progress of clonal hematopoiesis of indeterminate potential [J]. *J Leuk Lymphoma*, 2019, 28(4): 245–247.
- [12] GIBSON C J, STEENSMA D P. New insights from studies of clonal hematopoiesis [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(19): 4633–4642.
- [13] 丁亦含, 李玉峰. 意义不明的克隆性造血的研究进展 [J]. *中华血液学杂志*, 2016, 37(6): 542–544.
DING Y H, LI Y F. Progress of clonal hematopoiesis of indeterminate potential [J]. *Chin J Hematol*, 2016, 37(6): 542–544.
- [14] COOMBS C C, GILLIS N K, TAN X, et al. Identification of clonal hematopoiesis mutations in solid tumor patients undergoing unpaired next-generation sequencing assays [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(23): 5918–5924.
- [15] BOLTON K L, GILLIS N K, COOMBS C C, et al. Managing clonal hematopoiesis in patients with solid tumors [J]. *J Clin Oncol*, 2019, 37(1): 7–11.
- [16] ARENDS C M, GALAN-SOUSA J, HOYER K, et al. Hematopoietic lineage distribution and evolutionary dynamics of clonal hematopoiesis [J]. *Leukemia*, 2018, 32(9): 1908–1919.
- [17] ZINK F, STACEY S N, NORDDAHL G L, et al. Clonal hematopoiesis, with and without candidate driver mutations, is common in the elderly [J]. *Blood*, 2017, 130(6): 742–752.
- [18] PTASHKIN R N, MANDELKER D L, COOMBS C C, et al. Prevalence of clonal hematopoiesis mutations in tumor-only clinical genomic profiling of solid tumors [J]. *JAMA Oncol*, 2018, 4(11): 1589–1593.
- [19] SEVERSON E A, RIEDLINGER G M, CONNELLY C F, et al. Detection of clonal hematopoiesis of indeterminate potential in clinical sequencing of solid tumor specimens [J]. *Blood*, 2018, 131(22): 2501–2505.
- [20] CORCORAN R B, CHABNER B A. Application of cell-free DNA analysis to cancer treatment [J]. *N Engl J Med*, 2018, 379(18): 1754–1765.
- [21] PHALLEN J, SAUSEN M, ADLEFF V, et al. Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA [J]. *Sci Transl Med*, 2017, 9(403): eaan2415.
- [22] HU Y, ULRICH B C, SUPPLEE J, et al. False-positive plasma genotyping due to clonal hematopoiesis [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(18): 4437–4443.
- [23] MAYRHOFER M, DE LAERE B, WHITINGTON T, et al. Cell-free DNA profiling of metastatic prostate cancer reveals microsatellite instability, structural rearrangements and clonal hematopoiesis [J]. *Genome Med*, 2018, 10(1): 85.
- [24] MANSUKHANI S, BARBER L J, KLEFTOGIANNIS D, et al. Ultra-sensitive mutation detection and genome-wide DNA copy number reconstruction by error-corrected circulating tumor DNA sequencing [J]. *Clin Chem*, 2018, 64(11): 1626–1635.
- [25] RAZAVI P, LI B T, BROWN D N, et al. High-intensity sequencing reveals the sources of plasma circulating cell-free DNA variants [J]. *Nat. Med*, 2019, 25(12): 1928–1937.
- [26] WANG Y, LI L, COHEN J D, et al. prognostic potential of circulating tumor DNA measurement in postoperative surveillance of nonmetastatic colorectal cancer [J]. *JAMA Oncol*, 2019, 5(8): 1118–1123.

(收稿日期: 2020-04-16 修回日期: 2020-07-08)