

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.1912034

综述

## B 细胞淋巴增生性疾病中微小残留病检测的新进展

王妍 综述 文飞球 审校

(中国医科大学深圳市儿童医院血液肿瘤科, 广东 深圳 518031)

**[摘要]** 在许多恶性血液系统疾病中, 癌细胞清除率均与疾病预后息息相关。临床研究表明, 微小残留病(MRD)可直接反映癌细胞清除率的高低, 但目前用于MRD检测的工具仍有待完善。该综述介绍了数字聚合酶链反应和二代测序技术在B细胞淋巴增生性疾病MRD检测中的应用进展。

[中国当代儿科杂志, 2020, 22(6): 667-671]

**[关键词]** 微小残留病; 数字聚合酶链反应; 二代测序; 液体活检; 循环肿瘤基因

### Latest advances in minimal residual disease evaluation in B-cell lymphoproliferative disease

WANG Yan, WEN Fei-Qiu. Department of Pediatric Hematology and Oncology, Shenzhen Children's Hospital, China Medical University, Shenzhen, Guangdong 518031, China (Wen F-Q, Email: fwen62@126.com)

**Abstract:** The clearance of cancer cells is closely associated with the prognosis of various hematologic malignancies. Clinical studies have shown that minimal residual disease (MRD) can directly reflect the clearance of cancer cells, but the tools for MRD detection need to be improved. This article reviews the latest advances in the MRD detection by digital polymerase chain reaction and next-generation sequencing in B-cell lymphoproliferative disease.

[Chin J Contemp Pediatr, 2020, 22(6): 667-671]

**Key words:** Minimal residual disease; Digital polymerase chain reaction; Next-generation sequencing; Liquid biopsy; Circulating tumor DNA

近几十年来, 大量研究表明, 在许多恶性血液系统疾病中, 癌细胞清除率均与疾病预后息息相关。自1991年, 第一项将PCR应用于淋巴瘤微小残留病(minimal residual disease, MRD)检测的临床研究发表后<sup>[1]</sup>, 依赖于PCR的多种分子技术陆续应用于淋巴疾病的MRD检测中。

根据不同的原理和方法, 可将PCR工具大致分为定性和定量两类。定性策略包括巢式和半巢式PCR分析, 灵敏度可观, 为 $1.00 \times 10^{-5}$ 。但由于缺乏量化指标, 定性PCR提供的信息有限<sup>[2]</sup>。定量策略目前以实时定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)为主, 它能够准确评估连续随访时间点的残留肿瘤细胞数量<sup>[3]</sup>。其中qPCR至今仍是公认最有效、最标准的

MRD检测方法。但qPCR灵敏度阈值较低, 在许多患者体内无法找到可靠的MRD靶点<sup>[4]</sup>。

综上, 现存的两大类PCR工具均存在一定局限性, 因此MRD检测方法的改良、创新依旧十分必要。本文就B细胞淋巴增生性疾病中MRD检测方法的最新进展综述如下。

### 1 qPCR: 原有MRD检测方式的局限性

PCR方法自发现以来不断进化, 但仍存在一些局限性。

理想的分子标记物只存在于肿瘤细胞中, 因此, MRD检测靶点的选择很大程度上取决于疾病的亚型。在B细胞分化的早期过程中, 免疫球蛋白

[收稿日期] 2019-12-09; [接受日期] 2020-04-21

[作者简介] 王妍, 女, 硕士研究生。

[通信作者] 文飞球, 男, 教授。Email: fwen62@126.com。

白基因的不同片段发生重排。每一个肿瘤淋巴细胞都含有相同重排的免疫球蛋白重链(IgH)基因,因此IgH可作为检测MRD的理想肿瘤特异性标记物<sup>[5]</sup>。然而,并非每一种B细胞淋巴瘤疾病都有可靠的特异性分子改变,所以肿瘤特异性标记物并不适用于所有患者的MRD检测。例如,在霍奇金淋巴瘤中,虽然某些畸变的确反复发生,但发生同种畸变的恶性肿瘤细胞在大块组织中非常罕见(<5%),因此难以确定检测的目的基因<sup>[6]</sup>。同样,弥漫性大B细胞淋巴瘤需要对个体进行标记筛选,才能确定用于MRD检测的靶点<sup>[7]</sup>。

目前,常规应用qPCR方法对MRD进行检测。qPCR方法的灵敏度取决于DNA重排类型、连接区域的大小及每个反应可用的DNA数量。相对来讲,病理细胞数越低,分析的准确性就越低。因此,除了获得定量数据之外,达到足够的灵敏度对于qPCR来说至关重要。由于试验灵敏度低、分析样本中肿瘤浸润性低、克隆进化模式差异等原因可能造成假阴性的PCR结果,这可能使患者面临更高的复发风险。另外,对低水平qPCR结果的解释尚不明确:qPCR的短板在于无法在有限的灵敏度和定量范围中为某些肿瘤样本提供可靠的量化靶点<sup>[8]</sup>,这些样本目前被定义为“阳性不可量化”(positive non-quantifiable)。理论上,“阳性不可量化”结果也可能表明一组特定的患者其预后介于MRD阳性和阴性之间<sup>[9]</sup>。

除此之外,为了相对准确的量化靶点,需要人工建立一个标准的稀释曲线,并设计特定于个体的引物,这对实验室人员的专业知识及时间成本要求较高。

## 2 数字聚合酶链反应:改良MRD检测方式

作为PCR的最新进展之一,数字聚合酶链反应(digital polymerase chain reaction, dPCR)的出现为qPCR提升了实用价值。dPCR通过水油乳浊液滴系统将模板DNA分子分割成微滴,用端点PCR的方式实现模板扩增,最后通过荧光数据采集及泊松统计分析得到结果。从而将核酸的定量由相对定量提高到绝对定量。

相较于传统PCR,dPCR具有以下优势:

(1)绝对定量:dPCR不依赖于样本定量的标

准曲线,能够规避与反应效率波动相关的陷阱,因此可以重新覆盖那些由于肿瘤负荷较低而无法生成可靠标准曲线的患者,同时能够节约检测组织。(2)灵敏度高:能够实现单分子级检测。(3)稳定性强:由于靶序列划分的体积更小,dPCR对不同抑制剂类型的耐受性要高于qPCR,因此可适用于复杂样本<sup>[10-11]</sup>。

Cavalli等<sup>[12]</sup>分别用qPCR与微滴式dPCR的方法对滤泡性淋巴瘤患者进行了MRD检测。在不同时间点进行测试,结果显示微滴式dPCR与qPCR一致性较高(82%),但微滴式dPCR具有更高的敏感度,且能够在44%巢式PCR定为阴性的样本中发现分子标记。通过微滴式dPCR测量的肿瘤负荷可显著预测无进展生存(progression-free survival)时间,而qPCR则无法做到这一点。

另一方面,Guerini等<sup>[13]</sup>将微滴式dPCR用于毛细胞白血血病患者的基因检测。将其与qPCR对比,结果显示,微滴式dPCR的灵敏度比qPCR高出半个对数。在华氏巨球蛋白血症患者中,上述结果依然成立<sup>[14]</sup>。但上述研究使用的是不同的阳性定义标准,尚需通用标准对其进行规范。

在成熟的淋巴增生性疾病中,微滴式dPCR与qPCR有很好的一致性<sup>[15]</sup>。在多发性骨髓瘤、套细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤中,将qPCR和dPCR比较发现,dPCR具有与qPCR相当的灵敏度、准确性和可重复性<sup>[16]</sup>。

目前,dPCR技术主要用于各种液体样本中微量DNA的检测。多个团队正在进行验证dPCR实验装置及标准化实验指导方针的工作,dPCR对MRD的检测在科学界的传播仍需要时间及标准化的程序来检验。

## 3 二代测序在MRD分析中的应用

二代测序(next-generation sequencing, NGS)又称为高通量测序,它能够在一次测试中对数百至数千基因进行测序。将NGS与金标准等位基因特异性寡核苷酸-PCR(ASO-PCR)检测方法在急性淋巴细胞白血血病中的样本检测的对比试验中发现,NGS具有高通量、高灵敏度等优势<sup>[17]</sup>。在多发性骨髓瘤、套细胞淋巴瘤中,二者检测出的MRD结果也具有良好的相关性( $r=0.791, P<0.001$ ),但

NGS灵敏度更高,可行性更强<sup>[18]</sup>。此外,NGS能够识别qPCR无法识别和检测的某些MRD分子标记,为靶点检测、未知基因检测提供了更多可能性,对于发病机制研究、预后判断具有重要意义。

目前,多个团队正致力于设计NGS-IgH分析程序,制订生物信息学分析的标准。现已开发出一个可重复的方法,即从样本中提取循环肿瘤基因(circulating tumor DNA, ctDNA),对其进行测序及信息分析。根据检测项目类型、待测标本类型、灵敏度要求等选择测序平台。在急性淋巴细胞白血病样本上进行试点研究,数据表明,在平台符合要求的情况下,各实验室内和实验室间的结果一致<sup>[19-20]</sup>。

有试验证实,在绝大多数患者中,NGS检测MRD均为有效可行的早期复发预测工具<sup>[21]</sup>。它能够将那些在随访期间通过qPCR评分为阳性不可量化但已完全缓解的患者分为不同的类别。其中部分被qPCR定为MRD假阳性的患者,可被NGS重新定义为MRD阴性。这表示NGS是一种可靠且更准确的MRD检测方法<sup>[9]</sup>。

NGS能产生大量的生物信息,对这些信息的诠释和解读尤为重要。现已开发出多种生物软件工具,它们在灵活性、便捷性、交互性、特异性等方面各有千秋<sup>[22-24]</sup>。但由于计算程序较为复杂,这些软件还没有得到系统的比较,因此,其分析的可重复性仍然是一个有争议的问题。在血液疾病中,采用NGS检测MRD仍处于起步阶段,一些与标准化、数据解析、临床意义相关的问题仍需进一步剖析<sup>[18,25]</sup>。

## 4 ctDNA检测

液体活检是B细胞淋巴瘤中MRD检测发展的一个新领域,即在血浆或其他体液中检测ctDNA。实际上,几乎在所有可获得的体液中都能发现ctDNA。临床最常检测的样本是血液和尿液<sup>[26]</sup>。

目前临床上常采用外周血及骨髓样本进行MRD检测,以上两种样本均需对患者进行侵袭性操作。液体活检克服了这一弊端,拓宽了非侵袭性MRD检测的范围,可对非白血病疾病(如侵袭性淋巴瘤、浆细胞疾病、实体瘤等)进行突变研究。由于液体活检的样本灵活多样,采集过程更

加舒适,从而提高了患者的依从性,增加了随访期间采样时间点的可能性<sup>[26]</sup>。与传统的血清学肿瘤标志物检测相比,液体活检的检测更具靶向性,更加突显肿瘤组织的异质性,有利于促进肿瘤诊治的精准化<sup>[27]</sup>。

然而,现有的分子技术还无法达到足够的灵敏度,尚不能检测小量的ctDNA。近年来,各类检测技术不断改进、更新,PCR和测序技术的发展使得液体活检也可以应用于血液学疾病。综上,对淋巴增生性疾病进行ctDNA和dPCR分析可能是一个很有前景的选择。

液体活检可通过NGS的方法同时识别和追踪复发的体细胞突变。针对反复突变的基因,有实验设计了新的NGS工具——癌症个性化分析(cancer personalized profiling, CAPP)测序。它是一种超灵敏的测序方法,提高了突变筛选度及与结果的相关性<sup>[28]</sup>。利用CAPP测序技术发现和追踪淋巴瘤相关的突变,其灵敏度高于90%,特异度接近100%,可很好地反映肿瘤的异质性。

然而,在临床实践中引入ctDNA分析仍需克服一些问题。ctDNA的提取受样本处理时间及离心前血液样本温度的影响,因此,需将实验步骤严格标准化。数据分析过程也尚欠缺权威标准。

目前,液体活检仍处于性能指标确认及临床应用可行性的评估阶段,亟待大规模的临床研究验证。

## 5 总结

本文对近年来在淋巴增生性疾病中应用于MRD检测的最新分子技术进行了综述,结论如下:dPCR是采用靶向分析的方法,其灵敏度高达 $5.00 \times 10^{-5}$ <sup>[29-30]</sup>,且分析时不需要标准曲线,可在低浓度靶点下进行高精度测量,但不足之处是无法发现未知突变,无法克服等位基因特异设计的局限性;而NGS具有同样可观的灵敏度,约为 $1.00 \times 10^{-4}$ <sup>[31]</sup>,优势在于应用过程中无需专人专用的试剂,且可能发现新的突变,但相对而言价格昂贵,对相关人员技术、知识水平要求较高,且周转时间长,一些相关问题尚未完全规范。

现已证明dPCR是一种精确、敏感的方法,它能够克服qPCR在敏感性、可行性及重现性方

面的一些不足,因此这种方法在许多血液疾病的MRD分析中都是极具吸引力的选择。NGS是一种新的、强大的工具,它展现了淋巴瘤许多亚型的突变景观,提高了大众对克隆异质性及相关疾病动力学的认识。这两种技术都显示出了高灵敏度、高准确性和可重复性的特点,且都可应用于易获取的组织样本,从而减免了进行外科活检或放射监测的需求。

无疑,引入NGS可以改变常规实验室诊断的质量,但其成本和尚未标准化的程序仍然是有待解决的问题。

### [参 考 文 献]

- [1] Gribben JG, Freedman AS, Neuberg D, et al. Immunologic purging of marrow assessed by PCR before autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma[J]. *N Engl J Med*, 1991, 325(22): 1525-1533.
- [2] van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 concerted action BMH4-CT98-3936[J]. *Leukemia*, 2003, 17(12): 2257-2317.
- [3] González D, González M, Balanzategui A, et al. Molecular characteristics and gene segment usage in IGH gene rearrangements in multiple myeloma[J]. *Haematologica*, 2005, 90(7): 906-913.
- [4] Ferrero S, Drandi D, Mantoan B, et al. Minimal residual disease detection in lymphoma and multiple myeloma: impact on therapeutic paradigms[J]. *Hematol Oncol*, 2011, 29(4): 167-176.
- [5] Scherer F, Kurtz DM, Diehn M, et al. High-throughput sequencing for noninvasive disease detection in hematologic malignancies[J]. *Blood*, 2017, 130(4): 440-452.
- [6] Tiacci E, Penson A, Schiavoni G, et al. New recurrently mutated genes in classical hodgkin lymphoma revealed by whole-exome sequencing of microdissected tumor cells[J]. *Blood*, 2016, 128(22): 1088.
- [7] Rossi D, Diop F, Spaccarotella E, et al. Diffuse large B-cell lymphoma genotyping on the liquid biopsy[J]. *Blood*, 2017, 129(14): 1947-1957.
- [8] van der Velden VH, Cazzaniga G, Schrauder A, et al. Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data[J]. *Leukemia*, 2007, 21(4): 604-611.
- [9] Kotrova M, van der Velden VHJ, van Dongen JJM, et al. Next-generation sequencing indicates false-positive MRD results and better predicts prognosis after SCT in patients with childhood ALL[J]. *Bone Marrow Transplant*, 2017, 52(7): 962-968.
- [10] Nixon G, Garson JA, Grant P, et al. Comparative study of sensitivity, linearity, and resistance to inhibition of digital and nondigital polymerase chain reaction and loop mediated isothermal amplification assays for quantification of human cytomegalovirus[J]. *Anal Chem*, 2014, 86(9): 4387-4394.
- [11] Dingle TC, Sedlak RH, Cook L, et al. Tolerance of droplet-digital PCR vs real-time quantitative PCR to inhibitory substances[J]. *Clin Chem*, 2013, 59(11): 1670-1672.
- [12] Cavalli M, De Novi LA, Della Starza I, et al. Comparative analysis between RQ-PCR and digital droplet PCR of BCL2/IGH gene rearrangement in the peripheral blood and bone marrow of early stage follicular lymphoma[J]. *Br J Haematol*, 2017, 177(4): 588-596.
- [13] Guerrini F, Paolicchi M, Ghio F, et al. The droplet digital PCR: a new valid molecular approach for the assessment of B-RAF V600E mutation in hairy cell leukemia[J]. *Front Pharmacol*, 2016, 7: 363.
- [14] Albitar A, Ma W, Dedios I, et al. Positive selection and high sensitivity test for MYD88 mutations using locked nucleic acid[J]. *Int J Lab Hematol*, 2016, 38(2): 133-140.
- [15] Wang WJ, Zheng CF, Liu Z, et al. Droplet digital PCR for BCR/ABL ABL(P210) detection of chronic myeloid leukemia: a high sensitive method of the minimal residual disease and disease progression[J]. *Eur J Haematol*, 2018, 101(3): 291-296.
- [16] Della Starza I, Nunes V, Cavalli M, et al. Comparative analysis between Rq-PCR and digital-droplet-PCR of immunoglobulin/T-cell receptor gene rearrangements to monitor minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia[J]. *Br J Haematol*, 2016, 174(4): 541-549.
- [17] Faham M, Zheng J, Moorhead M, et al. Deep-sequencing approach for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia[J]. *Blood*, 2012, 120(26): 5173-5180.
- [18] Ladetto M, Brüggemann M, Monitillo L, et al. Next-generation sequencing and real-time quantitative PCR for minimal residual disease detection in B-cell disorders[J]. *Leukemia*, 2014, 28(6): 1299-1307.
- [19] Langerak AW, Brüggemann M, Davi F, et al. High-throughput immunogenetics for clinical and research applications in immunohematology: potential and challenges[J]. *J Immunol*, 2017, 198(10): 3765-3774.
- [20] Bystry V, Reigl T, Krejci A, et al. ARResT/interrogate: an interactive immunoprofiler for IG/TR NGS data[J]. *Bioinformatics*, 2017, 33(3): 435-437.
- [21] Kotrova M, Muzikova K, Mejstrikova E, et al. The predictive strength of next-generation sequencing MRD detection for relapse compared with current methods in childhood ALL[J]. *Blood*, 2015, 126(8): 1045-1047.
- [22] Aouinti S, Giudicelli V, Duroux P, et al. IMGT/statclonotype for pairwise evaluation and visualization of NGS IG and TR IMGT clonotype (AA) diversity or expression from IMGT/HighV-QUEST[J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 339.
- [23] Beccuti M, Genuardi E, Romano G, et al. Hashclone: a new tool to quantify the minimal residual disease in B-cell lymphoma from deep sequencing data[J]. *BMC Bioinformatics*, 2017, 18(1): 516.
- [24] Bystry V, Agathangelidis A, Bikos V, et al. ARResT/AssignSubsets: a novel application for robust subclassification of chronic lymphocytic leukemia based on B cell receptor IG stereotypy[J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(23): 3844-3846.

- [25] Martinez-Lopez J, Lahuerta JJ, Pepin F, et al. Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma[J]. *Blood*, 2014, 123(20): 3073-3079.
- [26] Finzel A, Sadik H, Ghitti G, et al. The combined analysis of solid and liquid biopsies provides additional clinical information to improve patient care[J]. *J Cancer Metastasis Treat*, 2018, 4(5): 21.
- [27] Zeng H, He B, Yi C, et al. Liquid biopsies: DNA methylation analyses in circulating cell-free DNA[J]. *J Genet Genomics*, 2018, 45(4): 185-192.
- [28] Scherer F, Kurtz DM, Newman AM, et al. Distinct biological subtypes and patterns of genome evolution in lymphoma revealed by circulating tumor DNA[J]. *Sci Transl Med*, 2016, 8(364): 364ra155.
- [29] Camus V, Sarafan-Vasseur N, Bohers E, et al. Digital PCR for quantification of recurrent and potentially actionable somatic mutations in circulating free DNA from patients with diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Leuk Lymphoma*, 2016, 57(9): 2171-2179.
- [30] Camus V, Stamatoullas A, Mareschal S, et al. Detection and prognostic value of recurrent exportin 1 mutations in tumor and cell-free circulating DNA of patients with classical Hodgkin lymphoma[J]. *Haematologica*, 2016, 101(9): 1094-1101.
- [31] Kurtz DM, Jin M, Soo J. Circulating tumor DNA is a reliable measure of tumor burden at diagnosis of diffuse large B cell lymphoma: an international reproducibility study[J]. *Blood*, 2017, 130(Suppl 1): 31.

(本文编辑: 邓芳明)

· 消息 ·

## 2020年《中国当代儿科杂志》征稿征订启事

《中国当代儿科杂志》是由中华人民共和国教育部主管、中南大学及中南大学湘雅医院主办的国家级儿科专业学术期刊。本刊为中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊),中国科学引文数据库(CSCD)核心期刊,北京大学图书馆中文核心期刊和国际权威数据库美国MEDLINE/PubMed/PMC、美国《化学文摘》(CA)、美国EBSCO、荷兰《医学文摘》(EM)及世界卫生组织西太平洋地区医学索引(WPRIM)收录期刊,同时被中国学术期刊(光盘版)、中国科学院文献情报中心、中国社会科学院文献信息中心评定为《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊,并获评2016中国国际影响力优秀学术期刊。2019年9月进入国家首批发布的临床医学领域高质量科技期刊目录,这将推动同等水平的国内外期刊等效使用。

本刊内容以儿科临床与基础研究并重,反映我国当代儿科领域的最新进展与最新动态。辟有论著(临床研究、罕见病/疑难病研究、病例分析、儿童保健、流行病学调查和实验研究)、临床经验、专家讲座、述评、综述及国外儿科动态等栏目。读者对象主要为从事儿科及相关学科的临床、教学和科研工作者。

本刊为月刊,每月15日出版,向国内外公开发售。欢迎全国各高等医学院校,各省、市、自治区、县医院和基层医疗单位,各级图书馆(室)、科技情报研究所及广大医务人员和医学科技人员订阅。每期定价20元,全年240元。邮发代号:国内42-188;国外3856(BM)。可通过全国各地邮局订阅或直接来函与本刊编辑部联系订阅。

向本刊投稿一律通过网上稿件处理系统(www.zgddek.com),免审稿费,审稿周期2~4周。欲详细了解本刊,请扫描下方二维码或微信公众平台二维码。网站提供免费全文下载。



杂志官方网址



微信公众平台

《中国当代儿科杂志》编辑部