再生障碍性贫血克隆性造血及其临床意义

张凤奎*

中国医学科学院&北京协和医学院血液病医院(血液学研究所), 实验血液学国家重点实验室, 天津 300020

* 联系人, E-mail: zhfk@hotmail.com; fkzhang@ihcams.ac.cn

收稿日期: 2017-10-03; 接受日期: 2017-10-20; 网络版发表日期: 2017-12-14

早在50年前, 血液学家就注意到再生障碍性贫血(再障)与其他克隆性造血疾病相关, 引发著名的“Dameshek之谜”^[1,2]. 此后, X染色体灭活式样分析以及细胞遗传学研究相继揭示再障骨髓偏颇造血和经常出现染色体核型异常, 证明其克隆性造血特征. 与其他原发恶性血液肿瘤克隆性造血发生机制并不完全相同, 再障骨髓造血干祖细胞池极度萎缩和免疫发病机制的病理生理背景在其克隆造血的发生发展中同样发挥着重要作用, 赋予再障克隆性造血独特特性. 现代分子遗传学技术, 尤其二代基因测序技术的应用, 使多种低变异位点频率(variant allele frequency, VAF)的克隆也得以辨识, 认识在再障患者检出的这些突变克隆造血及其意义非常重要.

1 再障克隆性造血是一普遍现象

基因突变源自复制错误或DNA损伤修复异常, 机体在各种内部和外部DNA损伤因素作用下, 随着生命过程的延长, 体细胞基因突变将不可避免并逐渐积累. 造血干祖细胞和其他组织干细胞一样, 随着存活时间延长和增殖分裂次数增多, 细胞突变也逐渐发生和积累. 有研究表明, 平均每个造血干细胞每10年发生 1.3 ± 0.2 次外显子突变^[3]. 采用X染色体灭活式样分析检测6例女性再障患者, 4例(67%)外周血粒细胞呈单克隆造血模式^[4]; 骨髓造血细胞染色体检查则约15%患者存在细胞遗传学异常克隆; 流式细胞术检测细胞膜锚蛋

白或锚联蛋白, 1/2再障患者存在PIGA基因突变所致的PNH克隆细胞^[5]. 最近, 全外显子和靶向基因测序等更为敏感的检测技术应用于再障患者, 克隆性造血检出率更是高达47%~72%^[6-9]. 若将细胞遗传学、单核苷酸多态性基因芯片, 以及全外显子/二代基因靶向测序等结果综合, 则从儿童再障的60%到成人患者的近乎100%, 绝大多数(70%~85%)再障患者可检测到克隆造血.

2 克隆性造血类型提示可能的发生机制

体细胞基因突变大多并不改变相关蛋白质的合成和结构, 因而为无害突变; 某些突变则引致细胞多样性, 并使造血干细胞及其子细胞适应环境压力; 然而, 若基因突变使造血干细胞自我更新分裂加快, 或凋亡减缓, 则可导致造血干细胞过多复制形成更大克隆以及外周血细胞的不平衡. 再障患者最常见的细胞遗传学异常包括-7/7q-和+8染色体异常, 另外常见者尚有13q-, +6, +15和+21, 其他类型异常则较为少见. ~13%再障单核苷酸芯片基因型检测具有6号染色体短臂MHC位点部位拷贝数中性杂合性缺失(6p CN-LOH), 而该位点缺失在普通人群极少发生(<0.09%)^[10]. 分子遗传学克隆性造血异常类型也主要集中在PIGA, BCOR/BCORL1, ASXL1和DNMT3A基因异常. 这些在再障患者出现的高度偏倚的克隆造血类型, 提示其发生同样是以骨髓免疫异常微环境为背景, 遵循达尔文

引用格式: 张凤奎. 再生障碍性贫血克隆性造血及其临床意义. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 1410-1414

Zhang F K. Clonal hematopoiesis in aplastic anemia and its clinical significance. Sci Sin Vitae, 2017, 47: 1410-1414, doi: 10.1360/N052017-00275

“适应-选择”的结果。反之, 依据某些异常造血克隆类型也可推测其可能的筛选压力。PIGA突变造血克隆就是最好的例证。现有资料无证据表明, PNH造血干细胞具有内源性生存优势, 其克隆扩增更主要得益于外部因素即免疫攻击的作用。由于再障异常免疫攻击的靶抗原可能为锚联蛋白, 因而, PNH造血干细胞丢失GPI锚和锚联蛋白则逃逸了免疫攻击。6p CN-LOH影响HLA-I类分子, 尤其HLA-A*02:01, A*02:06, A*03:01和B*40:02表达, 导致自身抗原不能有效递呈。造血干祖细胞缺失细胞毒T淋巴细胞攻击靶抗原, 逃逸免疫攻击从而获得相较正常造血干祖细胞的生长和克隆扩增优势。因此, 当再障患者出现PNH克隆和6p CN-LOH克隆则可推测存在造血免疫攻击压力, 判断该骨髓造血衰竭免疫发病机制更为可靠。

再障患者克隆性造血是以年龄相关克隆性造血类型为基础, 先期存在的年龄相关突变再经细胞毒T淋巴细胞免疫攻击造血微环境筛选, 加之造血干祖细胞功能减退、耗竭, 或二者兼而有之, 竞争减少, 获得某些突变者可能更易扩张, 最终形成免疫原性丢失或减少和耐受细胞毒T淋巴细胞介导凋亡与细胞因子介导的造血抑制, 具有逃逸免疫攻击和相对生长优势的造血克隆。与成年和老年患者比较, 儿童和年轻成人较少发生MDS相关的体细胞突变支持这种考虑。

3 依据分子遗传学克隆造血不能除外再障诊断

早已证明在正常人群, 随着年龄增加其骨髓偏颇造血发生的几率也随之增加^[11]。应用单核苷酸多态性芯片法检测, 在2个大样本研究中发现, 50岁以下人群外周血染色体重排的发生率<0.5%, 而在老年人这一机率明显上升至2%~3%^[12,13]。在无任何血液学异常表现的正常人或其他疾病患者全外显子测序结果同样表明, 随着年龄增加外周血体细胞突变发生的机率逐渐增高, 年龄大于65岁老年人发生克隆性造血近10%^[14~16]。尽管血液学表现正常而具有克隆性造血特征者发生血液恶性肿瘤的机会较未有克隆造血表现者增高大约10倍, 但就高克隆性造血发生率而言每年仅大约0.5%~1.0%进展为MDS/AML, 转化率非常之低, 并且有研究表明克隆造血维持长达10年而不发生恶性血液病转化^[15,16]。由此提出潜力未定的克隆性造血

(clonal hematopoiesis with indeterminate potential, CHIP)概念^[17], 其临床意义与意义未定单克隆球蛋白血症(monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS)和单克隆B淋巴细胞增多(monoclonal B-cell lymphocytosis, MBL)相同。

再障在疾病诊断之初大约1%~4% (0~23%)即可检测到克隆性染色体异常, 随着免疫抑制治疗骨髓造血恢复, 这些异常克隆可持续存在或完全消失。除伴有-7/7q-染色体异常的再障对免疫抑制治疗反应不佳、容易发生MDS进展、预后不良较为明确外, 出现其他染色体异常克隆的意义并不十分明了, 甚至某些常见的克隆性染色体异常, 如+8, 13q-等, 不仅未有恶劣预后, 相反常伴有更高的免疫抑制治疗血液学反应率和更好的预后, 当伴有PNH克隆时其预后优势更为明显。因此目前认为, 除了WHO认定的MDS特异的染色体改变外^[18,19], 在其他表现均较为典型的再障患者, 甚至细胞遗传学克隆造血的存在也不应成为否定再障转而诊断为MDS的依据。

对癌前病变进行基因检测研究肿瘤发生动力学结果表明, 肿瘤的发生符合多步骤发病模型, 即一系列事件、突变或其他损害, 驱动异常克隆逐渐增大, 并进展至较先前更为异常的表型。迄今, 尚不能确定肿瘤的发生需要多少驱动突变。尽管二代基因测序揭示再障MDS/AML样基因异常克隆性造血高发生率, 但再障突变克隆通常较小, 相对更稳定, 多数患者并不一定进展为MDS/AML, 即使在最终进展为MDS/AML者也常可克隆大小及造血保持较长时期的稳定。与细胞遗传学改变相似, 不应单凭出现分子遗传学克隆造血而排除再障诊断。

4 分子遗传学异常类型与再障预后

应用靶向基因测序检测患者MDS/AML样基因突变, 不同研究组间识别的再障复发性体细胞突变类型基本一致, 集中在少数基因类型, 包括PIGA, BCOR/BCORL1, ASXL1和DNMT3A, 其他类型突变均较少见^[6,8,9]。Kulasekararaj等人^[8]报告, 只要再障患者获得MDS相关基因突变其MDS转化的风险就明显增高, 病史超过6个月疾病进展转化为MDS的机会高达40%。鉴于再障高MDS/AML相关基因突变发生率, 短时间如此高的MDS转化率与本研究组及文献报告的再障晚

期克隆性血液学异常发生率差别巨大。Babushok等人^[20]在18例儿童和4例成人发病再障共22例患者中检出*PIGA*突变7例为最多见突变类型; 检出2例MDS样基因突变克隆性造血, 至报告时均未疾病转化。最近Yoshizato等人^[9]的报告明显不同于Kulasekararaj等人^[8]结果, 他们发现伴或不伴获得性体细胞MDS/AML样基因突变, 对患者免疫抑制治疗血液学反应、总生存和无进展生存均无影响; 然而, 分别分析不同类型基因突变与预后关系时则发现, 获得*BCOR*和*BCORL1*突变者免疫抑制治疗血液学反应率更高, 该两种类型突变与*PIGA*突变共同构成“良好突变”(favourable mutations), 不仅血液学反应率较高, 生存率和无进展生存率也较高。获得*ASXL1*, *DNMT3A*, *TP53*, *RUNX1*, *JAK2*, *JAK3*和*CSMD1*突变者则血液学反应率、总生存率和无进展生存率均较低, 为“不良突变”(unfavourable mutations)。上述不同类型突变与再障预后的关系提示, 逃逸T细胞免疫攻击保护性机制筛选突变为“良好突变”, 而与年龄相关或促进自我更新和减低分化相关者多为“不良突变”。随着再障病程的延长, 前者倾向于克隆稳定或逐渐减小, 后者则倾向于克隆逐渐增大。尽管基于对多步骤肿瘤发病机制的认识, 获得“不良突变”克隆造血的再障患者可能已经行进在通往MDS/AML的道路上, 但肿瘤发生通常需要至少需要2~8次驱动突变, 加之再障克隆造血动力学非常复杂、变异极大。因而在特定患者, 分子遗传学异常的检出并不意味着一定发生MDS/AML转化, 其预后预测能力有限。

5 再障骨髓克隆性造血的微环境选择作用

业已证明骨髓造血微环境改变导致正常的造血功能发生紊乱, 并促进恶性血液肿瘤转化^[21,22]。分子遗传学突变的发生和异常造血克隆的生长受骨髓造血微环境选择作用的影响, 并且, 细胞外在因素的异质性也可以解释缘何不同的临床条件下产生不同的体细胞突变及其克隆。再障患者经常发生非年龄相关的6pLOH和*PIGA*基因突变克隆也认为与此相关。再生障碍性贫血是以T淋巴细胞免疫异常攻击造血细胞为主要机制的骨髓造血衰竭, 淋巴细胞免疫攻击依赖于HLA-I类分子有效递呈抗原, 而*PIGA*基因编码的锚蛋白及锚联其上的细胞膜蛋白本身可能作为自身抗原^[23]。鉴于正常人可检测到微小PNH型造血干细胞而PNH临床极

为罕见, 并且PNH细胞本身不具内源性生长优势, 因而, 再障抗原递呈缺陷干细胞和丢失靶抗原的PNH型造血干细胞可逃逸免疫攻击, 其表现的克隆扩增归因于外部选择压力更为合理^[23,24]。细胞外部压力对异常造血克隆的发生和动态演变影响在接受化疗肿瘤患者体现得更为突出。细胞毒化疗药作为强烈的造血微环境压力, 倾向于筛选出更能抵御凋亡和耐受DNA损伤的干细胞克隆^[25], 化疗后原有的突变细胞克隆可逐渐扩增转化为治疗相关MDS/AML, 也可能逐渐减小或消失, 形成造血重塑。老年人长时间的低水平有毒环境和内源性不良代谢产物暴露、急慢性炎症, 以及衰退的免疫监视功能等, 也可能与克隆性造血的发生相关^[26]。这些均提示自然选择决定克隆发生和发展, 机体和骨髓微环境因素在克隆性造血中发挥着极其重要的作用。

6 免疫抑制治疗与克隆性血液学异常

再障发生晚期克隆性血液学异常主要涉及免疫抑制治疗患者, 接受造血干细胞移植治疗者则很少发生。本研究组认为, 这很可能与免疫抑制治疗是由残存的造血干祖细胞恢复自身造血, 而干细胞移植是重建正常造血, 二者造血干祖细胞池构成不同有关。研究发现, 再障病史长、复发难治者更易发生疾病转化, 而不同方案免疫抑制治疗者这一并发症的发生并无明显不同^[27,28]。再障患者即使获得血液学反应, 残存造血干细胞也还持续地受到以维持外周血细胞正常的造血压力的细胞端粒缩短, 遗传不稳定性增加, 与先期即已存在的获得性体细胞突变叠合, 赋予患者更高的MDS/AML转化倾向。最近的研究结果, 长时间获得血液学反应的再障患者, 其血清血小板生成素水平仍较正常人明显增高^[29], 采用血小板生成素受体激动剂艾曲泊帕治疗难治性重型再生障碍性贫血, 18.6%患者发生异常造血克隆进展, 似乎也支持获得血液学缓解再障仍存在较高的造血压力, 而造血压力加大可能与克隆演化相关^[30]。而免疫抑制治疗获得血液学反应可能只是赋予患者更长的生存时间, 使造血干祖细胞内源性遗传不稳定得以体现^[31,32]。

7 结语

细胞内在生物学特性受多种因素影响, 包括端

粒、表观遗传修饰, 以及线粒体和细胞质蛋白的累积氧化损伤等. 造血细胞分子遗传学异常仅是反映细胞内在生物学特性的重要指标之一, 单凭二代基因测序检出基因异常克隆并不能完全决定细胞行为或疾病演化趋势. 另外, 克隆造血发生和发展同样符合自然选择学说, 机体和骨髓微环境因素在克隆性造血中发挥着极其重要的作用, 而单凭基因测序检查并不能反映这些细胞外在因素. 目前对于再障克隆性造血的认识非常有限, 促使克隆性造血进展和稳定的因素也还知之甚少, 免疫监视功能在克隆性造血中作用如何评估, 哪种环境因素促进克隆性造血, 等均需更多研究明确. 因而, 克隆性造血的解读应结合疾病和机体状况谨慎进行, 缺少足够证据、不适当地解读克隆性造血势必

引起患者和医师焦虑, 或过治疗^[33,34].

总之, 再障克隆性造血非常常见; 克隆性造血的发生是在年龄相关造血克隆基础上, 经细胞毒T淋巴细胞免疫攻击、造血微环境筛选获得; 再障造血干祖细胞池萎缩, 造血压力加大、端粒缩短、遗传不稳定性明显增加, 新发或使先期存在的造血克隆获得“二次打击”. 除某些特定的细胞遗传学异常外, 克隆性造血, 尤其分子遗传学检出造血克隆, 不应成为否定再障转而诊断为MDS的依据. 再障克隆造血是“适应-选择”的结果, 依据异常造血克隆类型也可推测其可能的筛选机制. 不同类型造血克隆提示不同的再障预后, 随访观察克隆动态变化更为重要.

参考文献

- 1 Dameshek W. Riddle: what do aplastic anemia, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and “hypoplastic” leukemia have in common? *Blood*, 1967, 30: 251
- 2 Young N S. The problem of clonality in aplastic anemia: Dr Dameshek’s riddle, restated. *Blood*, 1992, 79: 1385–1392
- 3 Welch J S, Ley T J, Link D C, et al. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell*, 2012, 150: 264–278
- 4 Anan K, Ito M, Misawa M, et al. Clonal analysis of peripheral blood and haemopoietic colonies in patients with aplastic anaemia and refractory anaemia using the polymorphic short tandem repeat on the human androgen-receptor (HUMARA) gene. *Br J Haematol*, 1995, 89: 838–844
- 5 Stanley N, Olson T S, Babushok D V. Recent advances in understanding clonal haematopoiesis in aplastic anaemia. *Br J Haematol*, 2017, 177: 509–525
- 6 Lane A A, Odejide O, Kopp N, et al. Low frequency clonal mutations recoverable by deep sequencing in patients with aplastic anemia. *Leukemia*, 2013, 27: 968–971
- 7 Heuser M, Schlarmann C, Dobbernack V, et al. Genetic characterization of acquired aplastic anemia by targeted sequencing. *Haematologica*, 2014, 99: e165–e167
- 8 Kulasekararaj A G, Jiang J, Smith A E, et al. Somatic mutations identify a subgroup of aplastic anemia patients who progress to myelodysplastic syndrome. *Blood*, 2014, 124: 2698–2704
- 9 Yoshizato T, Dumitriu B, Hosokawa K, et al. Somatic mutations and clonal hematopoiesis in aplastic anemia. *N Engl J Med*, 2015, 373: 35–47
- 10 Score J, Chase A, Forsberg L A, et al. Detection of leukemia-associated mutations in peripheral blood DNA of hematologically normal elderly individuals. *Leukemia*, 2015, 29: 1600–1602
- 11 Busque L, Mio R, Mattioli J, et al. Nonrandom X-inactivation patterns in normal females: lyonization ratios vary with age. *Blood*, 1996, 88: 59–65
- 12 Jacobs K B, Yeager M, Zhou W, et al. Detectable clonal mosaicism and its relationship to aging and cancer. *Nat Genet*, 2012, 44: 651–658
- 13 Laurie C C, Laurie C A, Rice K, et al. Detectable clonal mosaicism from birth to old age and its relationship to cancer. *Nat Genet*, 2012, 44: 642–650
- 14 Xie M, Lu C, Wang J, et al. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat Med*, 2014, 20: 1472–1478
- 15 Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med*, 2014, 371: 2488–2498
- 16 Genovese G, Kähler A K, Handsaker R E, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med*, 2014, 371: 2477–2487

- 17 Steensma D P, Bejar R, Jaiswal S, et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. [Blood](#), 2015, 126: 9–16
- 18 Brunning R, Orazi A, Germing U, et al. Myelodysplastic Syndromes. Lyon: IARC Press, 2008
- 19 Cazzola M, Della Porta M G, Malcovati L. The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. [Blood](#), 2013, 122: 4021–4034
- 20 Babushok D V, Perdignes N, Perin J C, et al. Emergence of clonal hematopoiesis in the majority of patients with acquired aplastic anemia. *Cancer Genetics*, 2015, 208: 115–128
- 21 Latchney S E, Calvi L M. The aging hematopoietic stem cell niche: phenotypic and functional changes and mechanisms that contribute to hematopoietic aging. [Semin Hematol](#), 2017, 54: 25–32
- 22 Scadden D T. Nice neighborhood: emerging concepts of the stem cell niche. [Cell](#), 2014, 157: 41–50
- 23 Luzzatto L. Recent advances in the pathogenesis and treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. [F1000Res](#), 2016, 5: 209
- 24 Zaimoku Y, Takamatsu H, Hosomichi K, et al. Identification of an HLA class I allele closely involved in the autoantigen presentation in acquired aplastic anemia. [Blood](#), 2017, 129: 2908–2916
- 25 Mohammad R M, Muqbil I, Lowe L, et al. Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. [Semin Cancer Biol](#), 2015, 35: S78–S103
- 26 Adams P D, Jasper H, Rudolph K L. Aging-induced stem cell mutations as drivers for disease and cancer. [Cell Stem Cell](#), 2015, 16: 601–612
- 27 Scheinberg P, Townsley D, Dumitriu B, et al. Moderate-dose cyclophosphamide for severe aplastic anemia has significant toxicity and does not prevent relapse and clonal evolution. [Blood](#), 2014, 124: 2820–2823
- 28 Scheinberg P, Rios O, Scheinberg P, et al. Prolonged cyclosporine administration after antithymocyte globulin delays but does not prevent relapse in severe aplastic anemia. [Am J Hematol](#), 2014, 89: 571–574
- 29 Zhao X, Feng X, Wu Z, et al. Persistent elevation of plasma thrombopoietin levels after treatment in severe aplastic anemia. [Exp Hematol](#), 2017, in press, doi: 10.1016/j.exphem.2017.09.006
- 30 Olnes M J, Scheinberg P, Calvo K R, et al. Eltrombopag and improved hematopoiesis in refractory aplastic anemia. *N Engl J Med*, 2012, 367: 11–19
- 31 张丽红, 王慧君, 张莉, 等. 免疫抑制治疗对再生障碍性贫血患者骨髓细胞遗传不稳定性的影响. *中华血液学杂志*, 2008, 29: 728–732
- 32 张丽红, 王慧君, 张莉, 等. 再生障碍性贫血骨髓造血细胞遗传不稳定性的意义. *中华血液学杂志*, 2010, 31: 219–222
- 33 Bejar R. CHIP, ICUS, CCUS and other four-letter words. [Leukemia](#), 2017, 31: 1869–1871
- 34 Cooper J N, Young N S. Clonality in context: hematopoietic clones in their marrow environment. [Blood](#), 2017, 130: 2363–2372