

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.19.012

联合检测 JAK2V617F、MPLW515L/K 和 CALR 基因突变在原发性血小板增多症患者中的意义

穆启明,熊娅玲,姚文娟[△]

(湖北省十堰市人民医院 442000)

摘要:目的 研究成人原发性血小板增多症(PT)患者外周循环血液中 JAK2V617F、MPLW515L/K 和 CALR 基因的突变率,并分析联合检测的诊断价值。**方法** 共纳入 342 例单纯血小板持续升高($\geq 300 \times 10^9/L$)的患者,分别行血常规、骨髓活检和基因检测,共确诊 PT 患者 154 例(45.03%),继发性血小板增多症 188 例。采用等位基因特异性-聚合酶链反应(AS-PCR)检测 JAK2V617F 和 MPLW515L/K 的点突变,直接测序法检测 CALR 基因突变。**结果** 3 种基因的突变型有两条电泳条带,野生型仅有一条;JAK2V617F 和 MPL 突变不引起读码框改变,而 CALR 突变可导致读码框改变。PT 组 JAK2V617F 和 CALR 基因突变率显著高于继发组,差异有统计学意义($P < 0.05$);MPL 阳性突变率为 4.55%。采用受试者工作特征(ROC)曲线分析,单独检测 JAK2V617F 突变诊断 PT 的曲线下面积(AUC)为 0.721,敏感度为 72.4%,特异度为 79.5%;单独 CALR 突变的 AUC 为 0.664,敏感度为 68.4%,特异度为 82.4%;JAK2V617F 联合 CALR 突变的 AUC 为 0.862,敏感度为 85.9%,特异度为 87.8%。**结论** PT 中以 JAK2V617F 和 CALR 突变率较高,联合二者检测可明显提高 PT 的诊断价值。

关键词:原发性血小板增多症; JAK2V617F; MPLW515L/K; CALR; 基因突变

中图分类号:R558+.3

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)19-2884-04

Significance of combined detection of JAK2V617F, MPLW515L/K and CALR gene mutation in patients with primary thrombocytosis

MU Qiming, XIONG Yaling, YAO Wenjuan[△]

(Shiyan Municipal People's Hospital, Shiyan, Hubei 442000, China)

Abstract: Objective To study the gene mutation rates of JAK2V617F, MPLW515L/K and CALR in peripheral circulation blood of the patients with primary thrombocytosis (PT) and to analyze the diagnostic value of their combined detection. **Methods** A total of 342 patients with simple platelet continued increase ($\geq 300 \times 10^9/L$) were included in this study. The blood routine, bone marrow biopsy and gene testing were respectively performed. PT was definitely diagnosed in 154 cases (45.03%) and secondary thrombocytosis in 188 cases. Then the point mutation of AK2V617F, MPLW515L/K was detected by using the allele specific polymerase chain reaction (AS-PCR) and CALR gene mutation was detected by using the direct sequencing method. **Results** There were two electrophoresis strips in the mutant type of three genes and only one strip in wild type. The gene mutations of JAK2V617F and MPLW515L/K did not cause the changes of reading frame, while which of CALR could cause changes of reading frame. The mutation rates of JAK2V617F and CALR in the PT group were significantly higher than those in the secondary thrombocytosis group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$), the positive mutation rate of MPLW515L/K was only 4.55%. In adopting ROC curve analysis, the area under the curve (AUC) of single detection of JAK2V617F positive mutation for diagnosing PT was 0.721, the sensitivity was 72.4% and the specificity was 79.5%; AUC of single CALR mutation was 0.664, the sensitivity was 68.4% and the specificity was 82.4%; while AUC of JAK2V617F combined CALR mutation was 0.862, the sensitivity was 85.9% and the specificity was 87.8%. **Conclusion** The mutation rates of JAK2V617F and CALR are higher in PT patients, and their combined detection can increase the diagnostic value of PT.

Key words: primary thrombocytosis; JAK2V617F; MPLW515L/K; CALR; gene mutation

原发性血小板增多症(PT)是以 Ph 染色体阴性 为典型病理特征的一类骨髓增殖性疾病(MPN),临床

中最常见的并发症主要包括骨髓纤维化、血栓形成和高出血风险,约 10% 患者可向急性白血病转化^[1]。PT 的发病机制可能是遗传和环境共同作用的结果。JAK2V617F 突变可发生在 50%~60% 的 PT 患者,阳性突变患者有更高的血栓栓塞风险,逆转阳性突变可改善生存结局和降低严重不良事件的发生,提示 JAK2V617F 突变在 PT 的发病过程中发挥重要作用^[2]。但仍有一半患者表现为 JAK2V617F 阴性,最近基因测序发现, MPLW515L/K 和 CALR 基因突变可弥补 JAK2V617F 阴性的不足^[3-4],为阐述 PT 发病的遗传学机制提供重要依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

连续选择 2015 年 1 月至 2017 年 5 月在本院门诊以单纯血小板持续升高 ($\geq 300 \times 10^9/L$) 就诊患者共 342 例,排除合并白细胞、红细胞和血红蛋白升高或降低,近期手术、出血、输血史,妊娠史,恶性肿瘤患者;明确的血液系统疾病,如白血病、骨髓增生性疾病患者;严重肝、肾功能障碍,合并神经、精神系统疾病患者;依从性差、不能完成各种检查操作患者,如骨髓活检和基因检测;数据资料不完善等患者。所有患者完成血常规、骨髓活检和基因检测,本研究经本院伦理委员会审核通过,所有患者均知情同意。

根据 2008 年世界卫生组织关于 PT 的分类标准^[5]:(1)外周循环静脉血中血小板计数持续升高 $\geq 450 \times 10^9/L$;(2)骨髓病理中以成熟体积增大的巨核细胞增多为主要表现,而无明显的中性粒细胞或红细胞增多;(3)可排除其他骨髓增殖性疾病,如真性红细胞增多症、原发性骨髓纤维化、慢性粒细胞增多症等;(4)获得性 JAK2V617F 突变,或其他克隆标记,或在没有克隆标记情况下除外继发性血小板增多。最终确诊 PT 患者共 154 例(45.03%),继发性血小板增多症 188 例。其中 PT 组男 86 例,女 68 例;年龄 38~69 岁,中位年龄 53.4 岁;血小板计数 $(463 \sim 3\,547) \times 10^9/L$,平均 $(865.3 \pm 65.4) \times 10^9/L$ 。继发组男 98 例,女 90 例;年龄 34~72 岁,中位年龄 56.3 岁;血小板计数 $(357 \sim 2\,451) \times 10^9/L$,平均 $(732.8 \pm 82.3) \times 10^9/L$ 。两组患者的性别、年龄和血小板计数差异无统计学意义 ($P > 0.05$),具有可比性。

1.2 方法

采用等位基因特异性-聚合酶链反应 (AS-PCR) 检测 JAK2V617F 和 MPLW515L/K 的点突变。主要步骤:(1)DNA 合成。取外周静脉血 500 μL 加入 2 mL EP 管中,加入 1 mL 4 $^{\circ}C$ 红细胞裂解液震荡 30 s,10 000 r/min 离心 1 min;弃上清液,管底残留白色块状物加入 125 μL 蛋白酶震荡 5 s;于 65 $^{\circ}C$ 水浴器中孵育 10 min,每 2 min 震荡 1 次,至沉淀完全溶解;加入 275 μL 蛋白清除液震荡 5 s;-20 $^{\circ}C$ 放置 10 min,12 000 r/min 离心 5 min;将上清液(含 DNA) 转移到另一个 2 mL EP 管中;加入 500 μL 4 $^{\circ}C$ 冷藏

乙醇,震荡使 DNA 沉淀,可看到半透明团块状的 DNA;弃上清液,加入 1 mL 70% 乙醇震荡 5 s,12 000 r/min 离心 1 min;倒去乙醇,使 DNA 风干;加入 100 μL DNA 溶解液,于 65 $^{\circ}C$ 水浴器中孵育 15 min 充分溶解;测量其浓度和纯度。(2)引物设计。引物由上海生物工程有限公司设计合成,包括两条上游和一条公共下游引物,F-特异:5'-AGC ATT TGG TTT TAA ATT ATG GAG TAT ATT-3';F-中间:5'-ATC TAT AGT CAT GCT GAA AGT AGG AGA AAG-';反向:5'-CTG AAT AGT CCT ACA GTG TTT TCA GTT TCA-3'。MPLW515L/K 引物序列:F-M1:5'-AGT AGG GGC TGG CT GGA T-3';R-M2:5'-CTA GTC GCC GAG GTG AGC-3';特异-M3:5'-CTC CCT GTT GCT CTC CTT GT-3';R-M2:5'-CAT CTC GTA ATG GTG TAG-3'。反应体系终体积 25 μL ,PCR 扩增循环参数:95 $^{\circ}C$ 4 min,95 $^{\circ}C$ 30 s,55 $^{\circ}C$ 30 s,72 $^{\circ}C$ 1 min,共 25 个循环,72 $^{\circ}C$ 7 min 结束。(3)基因测序。阳性标本用外侧引物重新 PCR 扩增后回收和纯化,上海生物工程有限公司进行测序。采用直接测序法检测 CALR 基因突变,DNA 提取试剂盒(美国 Qiagen 公司)9 号外显子扩增引物(Invitrogen 公司,5.0 pmol/ μL)引物序列,F:5'-CTG GTC CTG GTC CTG ATG T-3';R:5'-TCT CAC AGA GAC ATT ATT TGG C。反应体系终体积 30 μL ,反应条件:98 $^{\circ}C$ 3 min,98 $^{\circ}C$ 10 s,63 $^{\circ}C$ 30 s,72 $^{\circ}C$ 30 s,共 20 个循环,72 $^{\circ}C$ 5 min 结束。基因测序同上。

1.3 观察指标

比较两组 JAK2V617F、MPLW515L/K 和 CALR 基因阳性突变率和相对表达水平。

1.4 统计学处理

应用 SPSS19.0 统计软件进行统计分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料以率表示,组间比较采用 χ^2 检验;诊断的敏感度、特异度和准确度采用受试者工作特征 (ROC) 曲线分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 种基因突变测序结果

3 种基因的突变型有两条电泳条带,野生型仅有 1 条;JAK2V617F 位于第 12 号外显子,第一个碱基 G 被 T 取代,密码子由 V 变成 F;点突变仅累及 V617 密码子,引起错义突变,未改变读码框。MPLW515L/K 也未改变读码框。CALR 基因突变有 52 bp 缺失和 5 bp 插入两种,所有突变位点均可引起读码框改变,CALR 蛋白 C 端氨基酸序列改变。

PT 组共检出 89 例(57.79%)JAK2V617F 突变,7 例(4.55%)MPLW515L/K 突变,48 例(31.17%)CALR 突变;JAK2V617F 和 CALR 同时突变阳性 7 例(4.55%),同时阴性 24 例(15.58%),JAK2V617F 阳性且 CALR 阴性 82 例(53.25%),JAK2V617F 阴性且 CALR 阳性 41 例(26.62%)。继发组共检出 6

例(3.19%)JAK2V617F 突变,0 例 MPLW515L/K 突变,1 例(0.53%)CALR 突变。PT 组的 JAK2V617F 和 CALR 突变率显著高于继发组,差异均有统计学意义($\chi^2=125.800,64.734,P<0.05$)。

2.2 ROC 曲线分析 JAK2V617F 和 CALR 同时突变阳性患者的 JAK2V617F 平均表达水平为 0.34 ± 0.06 ,CALR 平均表达水平为 0.15 ± 0.04 ;同时阴性患者的平均表达水平为 0.07 ± 0.01 和 0.03 ± 0.01 ;JAK2V617F 阳性且 CALR 阴性患者的平均表达水平为 0.58 ± 0.04 和 0.04 ± 0.01 ;JAK2V617F 阴性且 CALR 阳性患者的平均表达水平为 0.08 ± 0.02 和 0.22 ± 0.03 。

以单独 JAK2V617F 突变诊断 PT,曲线下面积(AUC)为 0.721,95% CI 为 0.356~0.925,敏感度 72.4%,特异度 79.5%,cut off 值为 0.25;单独 CALR 突变的 AUC 为 0.664,95% CI 为 0.291~0.848,敏感度为 68.4%,特异度为 82.4%,cut off 值为 0.09;JAK2V617F 联合 CALR 突变的 AUC 为 0.862,95% CI 为 0.467~0.963,敏感度为 85.9%,特异度为 87.8%,cut off 值为 0.21 和 0.07。见图 1。

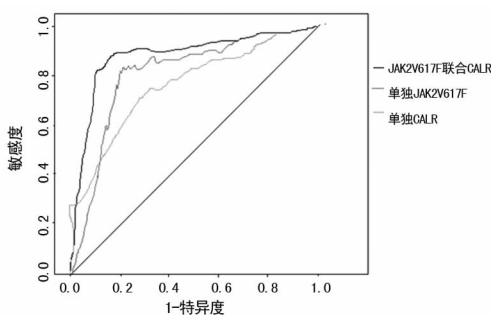


图 1 ROC 曲线分析

3 讨论

JAK 是一类非受体酪氨酸蛋白激酶,编码 JAK2 的基因在 9 号染色体(9p24)上,JAK2 几乎在所有组织中表达。JAK 的典型结构为 C 端有两个催化区段,N 端有 3 个保守结构区段,中部有两个区段。JAK 的下游信号是信号转导子和转录激活子蛋白家族(STAT),通过与细胞因子受体保守区 BOX1 和 BOX2 结合,识别受体近膜区域基因序列,进而发生一系列磷酸化,并选择性激活下游底物 STAT,并转位到核内与特异性 DNA 调控元件结合而指导转录,即 JAK-STAT 途径^[6]。JAK2V617F 的发现为探索 PT 的发病机制提供了重要线索。

MPL 为促血小板生成素受体,多肽序列全长有 633 个氨基酸。MPLW515L/K 两种体细胞突变被证实存在于 5%和 1%的 JAK2V617F 阴性骨髓纤维化患者中^[7]。MPLW515 位于 MPL 内唯一的兼性区域,主要功能是抑制 MPL 基因的自发性激活。MPLW515L 突变位于 MPL 基因细胞质与跨膜区接合处的抑制序列 KWQFP 内,突变可使序列抑制功能

受损,从而组成性激活 JAK-STAT 信号传导通路^[8]。CALR 为 Ca^{2+} 结合蛋白复合体,主要定位于内质网腔内,其介导的 Ca^{2+} 稳态可调节巨核细胞分化成熟和血小板形成、整合素介导的信号转导、免疫应答、细胞凋亡、伤口愈合和纤维化等多种细胞功能^[9]。KLAMP-FL 等^[10] 和 NANGALIA 等^[11] 采用外显子测序法在 JAK2 和 MPL 表达阴性的标本中检测到 CALR 第 9 个外显子突变,而在健康人群、淋巴瘤系统肿瘤、急性白血病和实体肿瘤中均未发现 CALR 基因突变。

本研究发现,JAK2V617F 和 MPLW515/K 突变不引起读码框改变,而 CALR 突变可导致读码框改变。PT 组的 JAK2V617F 和 CALR 基因突变率显著高于继发组,而 MPLW515/K 突变率仅为 4.55%。MPLW515/K 较低的突变率可能与种族、样本量有关。本研究的创新点是在既往研究提示上述 3 种基因在 MPN 中有一定的突变率基础上,对门诊以单纯血小板持续升高就诊患者进行基因分析,提示 JAK2V617F 和 CALR 突变可作为筛选 PT 的特异性指标。本研究的不足是未涉及其他类型 MPN,无法对 JAK2V617F 和 CALR 突变在不同类型 MPN 中进行比较。此外,本研究通过定量分析 JAK2V617F 和 CALR 相对表达水平,分别以单独 JAK2V617F、CALR 突变和联合两种指标突变诊断 PT,发现联合两种指标诊断的敏感度、特异度和准确度明显提高,可为临床早期识别 PT 提供重要参考依据。

综上所述,PT 中以 JAK2V617F 和 CALR 突变率较高,联合二者检测可明显提高诊断 PT 的敏感度、特异度和准确度。

参考文献

- [1] 宋军,胡蕊,李刚,等.原发性血小板增多症转化为急性髓系白血病临床分析[J].河北医药,2013,35(24):3761-3762.
- [2] 邹煦,常炳庆,杜文津,等.原发性血小板增多症患者血栓发生与 JAK2V617F 基因相关性的荟萃分析[J].癌症进展,2014,12(2):172-178.
- [3] 夏亮,吴竞生,丁凯阳,等.87 例骨髓增殖性肿瘤患者 JAK2 及 MPL 基因突变位点研究[J].临床血液学杂志,2010,23(1):16-19.
- [4] 王彦丽,戚光祖,郭洪娜,等.CALR 基因突变在骨髓增殖性肿瘤中的临床研究[J].中国医药导报,2015,12(26):86-89.
- [5] 黄莉.原发性血小板增多症的诊断标准及治疗进展[J].医学综述,2010,16(15):2287-2290.
- [6] 高晓冬,张志南,宋燕,等.JAK2V617F 基因突变与骨髓增殖性肿瘤类型及疾病转化的相关性分析[J].哈尔滨医科大学学报,2015,49(3):236-238.
- [7] CABAGNOLS X,FAVALE F,PASQUIER F A,et al. Presence of atypical thrombopoietin receptor (MPL) mutations in triple-negative essential thrombocythemia patients[J]. Blood,2016,127(3):333-342.

体,其有两种特异性抗原结合位点,在肿瘤细胞的不同靶点之间同时发挥效应功能,产生协同抑制的效果,更好地发挥靶向抑制的功能;并且其相对于全长抗体的优势在于,其相对分子质量较小和生产成本较低,拥有更好的体内外渗透性,故在抗肿瘤领域拥有较好的应用价值^[10,13,17]。

本研究以双靶向 HER2 和 EGFR 的双特异性单链抗体为研究对象,考察其在体内外抑制乳腺癌 BT474 细胞的活性,获得增强的抗肿瘤功能,可以为双靶向抑制 HER2 和 EGFR 通路的乳腺癌治疗策略,以及新型抗乳腺癌药物的开发提供一定的经验和理论基础。首先设计并表达双特异性单链抗体,流式细胞术结合实验验证了改造的双特异性单链抗体保留了其原有的乳腺癌细胞靶向性。MMT 法验证了双特异性单链抗体较其他抗体更为有效的体外抗肿瘤活性。最后,利用 BT474 细胞裸鼠移植瘤模型对双特异性单链抗体体内的抗肿瘤活性进行研究,实验表明相比于其他抗体,双特异性单链抗体可以显著抑制小鼠体内移植瘤的生长,抑制 EGFR 的磷酸化和肿瘤细胞的增殖。

综上所述,双特异性单链抗体双靶向 HER2 和 EGFR 信号通路,对乳腺癌 BT474 细胞的体内外抗肿瘤作用效果优于单靶向的抗体,可以为 HER2 和 EGFR 信号通路联合治疗提供一种新的临床治疗思路和经验。

参考文献

[1] 朱琳莲. 对乳腺癌患者进行分子靶向治疗的效果研究[J]. 当代医药论丛, 2017, 15(5): 62-63.
 [2] 刘现义, 李中, 王晓春, 等. 早期乳腺癌保乳手术治疗的有效性及其安全性[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2016, 23(6): 695-697.
 [3] 关润芝. 乳腺癌术后化疗后放疗与内分泌治疗同期或序贯治疗的比较[J]. 西南国防医药, 2016, 26(10): 1192-1194.
 [4] 李鹏兴. 分子靶向治疗在 HER2 阳性乳腺癌中的临床应用策略[J]. 中国实用医药, 2016, 11(29): 276-277.
 [5] 周子平, 陆剑豪. 靶向药物联合阿霉素靶向制剂治疗 Her-2 阳性乳腺癌的效果及安全性研究[J]. 海南医学院学报, 2017, 23(9): 1265-1268.

[6] 廖云梅, 罗阔, 卢家希. 免疫治疗在三阴性乳腺癌中的研究进展[J]. 免疫学杂志, 2016, 32(2): 177-180.
 [7] 陈唯, 夏苏建, 李鹤, 等. 曲妥珠单抗辅助治疗人表皮生长因子受体-2 阳性早期乳腺癌患者的成本效果分析[J]. 中国药理学杂志, 2017, 52(8): 696-701.
 [8] 桂安萍, 姚和瑞, 凌飞海. 三阴性乳腺癌细胞中上皮间质转化与 EGFR 单抗治疗效果的相关性[J]. 肿瘤防治研究, 2016, 43(4): 249-252.
 [9] 何丹丹, 王玉德, 唐海康, 等. 具有 EGFR/HER2 双重抑制作用的小分子抑制剂的研究进展[J]. 中中药学, 2016, 14(9): 913-923.
 [10] 陈治国, 邢黎军, 徐孟怀, 等. 一种全人源 IgG 样抗 EGFR/抗 KDR 双特异性抗体的构建与表达[J]. 药物生物技术, 2015, 22(3): 193-197.
 [11] 吕海燕, 刘传杰, 黄建华, 等. 抗 CD133/CD3 双特异性抗体介导的细胞因子诱导杀伤细胞体外杀伤 CD133 阳性肿瘤细胞研究[J]. 解放军医学院学报, 2015, 36(12): 1227-1231.
 [12] PRASAD S, GAEDICKE S, MACHEIN M, et al. Effective eradication of glioblastoma stem cells by local application of an AC133/CD133-specific T-cell-engaging antibody and CD8 T cells[J]. Cancer Res, 2015, 75(11): 2166-2176.
 [13] DIERMEIER-DAUCHER S, BREINDL S, BUCHHOLZ S, et al. Modular anti-EGFR and anti-Her2 targeting of SK-BR-3 and BT474 breast cancer cell lines in the presence of ErbB receptor-specific growth factors[J]. Cytometry A, 2011, 79(9): 684-693.
 [14] 刘倩, 刘琼, 李文波, 等. ¹³¹I 标记的甲状腺未分化癌人源单链抗体在荷瘤裸鼠模型的放射免疫显像[J]. 中国医学影像学杂志, 2017, 25(5): 321-324.
 [15] BYRNE H, CONROY P J, WHISSTOCK J C, et al. A tale of two specificities; bispecific antibodies for therapeutic and diagnostic applications [J]. Trends Biotechnol, 2013, 31(11): 621-632.
 [16] 王婷, 雷佳文, 李培武, 等. 抗黄曲霉毒素单链抗体在毕赤酵母 X-33 中的表达[J]. 中国油料作物学报, 2017, 39(1): 113-116.
 [17] 姜文国, 张树平, 刘荣, 等. 靶向 4-1BBL 和 CD3 双信号的协同抗肿瘤作用机制研究[J]. 中国肿瘤临床, 2010, 37(21): 1201-1204.

(收稿日期: 2018-01-02 修回日期: 2018-05-15)

(上接第 2886 页)

[8] MILOSEVIC F J, NIVARTHI H, GISSLINGER H, et al. Whole-exome sequencing identifies novel MPL and JAK2 mutations in triple-negative myeloproliferative neoplasms [J]. Blood, 2016, 127(3): 325-332.
 [9] VERGER E, CASSINAT B, CHAUVEAU A, et al. Clinical and molecular response to interferon- α therapy in essential thrombocythemiapatient with CALR mutations [J]. Blood, 2015, 126(24): 2585-2591.
 [10] KLAMPFL T, GISSLINGER H, HARUTYUNYAN A

S, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms [J]. N Engl J Med, 2013, 369(25): 2379-2390.
 [11] NANGALIA J, MASSIE C E, BAXTER E J, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2 [J]. N Engl J Med, 2013, 369(25): 2391-2405.

(收稿日期: 2018-01-06 修回日期: 2018-05-19)