JAK2V617 基因突变阳性骨髓增殖性肿瘤患者 WT1 基因的表达情况

白　波　马梁明　鹿育晋　郑凤丽　杨　波

摘　要　目的　探讨 JAK2V617 基因突变阳性的真性红细胞增多症(polycythemia vera, PV)和原发性血小板增多症(essential thrombocythemia, ET)患者骨髓标本中 WT1 基因的表达情况。**方法**　采用核酸扩增荧光法检测 16 例 PV 患者和 18 例 ET 患者骨髓中 JAK2V617 基因型。采用荧光定量 RT－PCR 方法检测突变阳性的 PV 和 ET 患者骨髓 WT1 基因的表达情况。**结果**　14 例 PV 和 11 例 ET 患者 JAK2V617 基因突变阳性。在这 25 例骨髓增殖性肿瘤(myeloproliferative neoplasms, MPN)患者中,11 例患者 WT1 基因表达高于正常对照组。**结论**　部分 JAK2V617 基因突变阳性的 MPN 患者体内 WT1 基因呈高度表达,WT1 基因高表达可能与 JAK2V617F 基因突变有一定的相关性。

关键词　JAK2V617 突变　WT1　真性红细胞增多症　原发性血小板增多症

[中图分类号]　R733　　**[文献标识码]**　A

Expression of WT1 Gene in JAK2V617F Mutation Positive Myeloproliferative Neoplasms.

Bai Bo, Ma Liangming, Lu Yujin, et al. Department of Hematology, Shanxi Dayi Hospital, Shanxi 030001, China

Abstract　Objective　To elucidate the expression of WT1 gene in bone marrow samples in patients of polycythemia vera(PV) and essential thrombocythemia(ET) with JAK2V617F mutation. **Methods**　The JAK2V617F mutation ratios in 16 PV samples and 18 ET samples were detected by FQ－PCR. Using FQ－RT－PCR, we measured the expression of WT1 gene in JAK2V617F mutation positive PV and ET. **Results**　14 in 16 patients with PV and 11 in 18 patients with ET had JAK2V617F mutation. The expression of WT1 gene increased in 11 of 25 patients with myeloproliferative neoplasms(MPN). **Conclusion**　The expression of WT1 gene was higher in parts of JAK2V617F mutation positive MPN. The higher WT1 expression may associate with the JAK2V617F mutation in MPN.

Key words　JAK2V617F mutation; WT1; Polycythemia vera; Essential thrombocythemia

BCR－ABL 融合基因阴性骨髓增殖性肿瘤(myeloproliferative neoplasms, MPN)是起源于骨髓造血干细胞的恶性克隆性疾病,主要包括真性红细胞增多症(polycythemia vera, PV)、原发性血小板增多症(essential thrombocythemia, ET)、原发性骨髓纤维化(primary myelofibrosis)[1]。WT1 基因是细胞生长、发育过程中的重要调控因子,在正常造血系统以及某些恶性血液病如白血病的发生、发展过程中起重要作用[2,3]。本研究拟探讨 JAK2V617 基因突变阳性的 MPN 患者体内 WT1 基因的表达情况。

材料与方法

1. 研究对象:所有患者来自 2013 年 1 月～2013 年 12 月山西大医院血液科。34 例患者均为初诊患者。其中,PV 患者 16 例,ET 患者 18 例,男性 19 例,女性 15 例;患者年龄 25～81 岁,中位年龄 55 岁,所有患者均经临床、血象、骨髓象等检查,诊断标准符合 WHO 的诊断标准。5 例正常对照骨髓标本来自本科室骨髓移植的供者。

2. 骨髓基因组 DNA 的提取:骨髓细胞基因组 DNA 的提取使用北京天根生化科技有限公司的血液基因组 DNA 提取试剂盒(目录号:DP319)。DNA 提取后,－20℃保存。

3. 骨髓 RNA 的提取:将新鲜骨髓样品加入到 EDTA 抗凝管中混匀,用 RNAiso Plus(TaKaRa)提取总 RNA,紫外分光光度计定量,－80℃冻存。

4. 核酸扩增荧光法检测 JAK2V617F 基因突变:StepOne 荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems 公司,美国)用于检测 JAK2V617F 基因突变。试剂选用北京思尔成生物技术有限公司 JAK2V617F 突变检测试剂盒,使用探针法检测标本中 JAK2 野生型基因和 JAK2V617F 突变基因。反应体系中包括 PCR 反应液 18μl(含引物、探针、PCR 缓冲液、$MgCL_2$、UdNTP、混合酶),标本 DNA 2μl。PCR 反应条件:50℃ 2min;95℃ 10min;95℃ 15s,60℃ 1min,40 个循环。通道选择:JAK2 野生型基因设定荧光为 FAM－MGB,JAK2V617F 突变基因设定荧光为 VIC－MGB,并在 PCR 循环第 2 步 60℃时收集荧光信号,其他为默认值。

5. 荧光定量 PCR 检测 WT1 基因表达:StepOne 荧光定量

作者单位:030032　太原,山西大医院血液科

通讯作者:马梁明,电子信箱:maliangmin@medmail.com.cn

PCR 仪用于检测 WT1 基因表达。试剂选用上海申友生物技术有限公司 WT1 基因检测试剂盒。试剂准备:WT1 PCR 反应液的配制:按每个反应取 WT1 PCR 反应液 13μl,混合酶 2μl 计算,加于一总的无菌离心管中,混匀后短暂离心。同样制备 ABL PCR 反应液。在每一个 PCR 反应管内分别加入各自 15μl 上述混匀后的反应液。在 PCR 反应管中加入抽提后的 RNA 标本、阴性对照、质粒标准品各 10μl。PCR 反应条件:42℃ 37min;94℃ 5min;94℃ 15s,60℃ 1min,40 个循环。设定荧光为 FAM,并在 PCR 循环第 2 步 60℃时收集荧光信号,其他为默认值。WT1 基因复制数与 ABL 内参基因复制数之比作为 WT1 基因的相对表达量。

6. 统计学方法:用 SPSS 13.0 统计分析软件,实验结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组样本均数间比较用独立样本 t 检验,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结　　果

1. JAK2V617F 基因突变率:5 例正常人对照标本中未检测到 JAK2V617 基因突变。34 例 MPN 患者的 JAK2V617F 基因突变总体阳性率为 73.5%(25/34),其中,PV 患者 JAK2V617F 基因突变阳性率为 87.5%(14/16),ET 患者 JAK2V617F 基因突变阳性率为 61.1%(11/18)(图 1)。

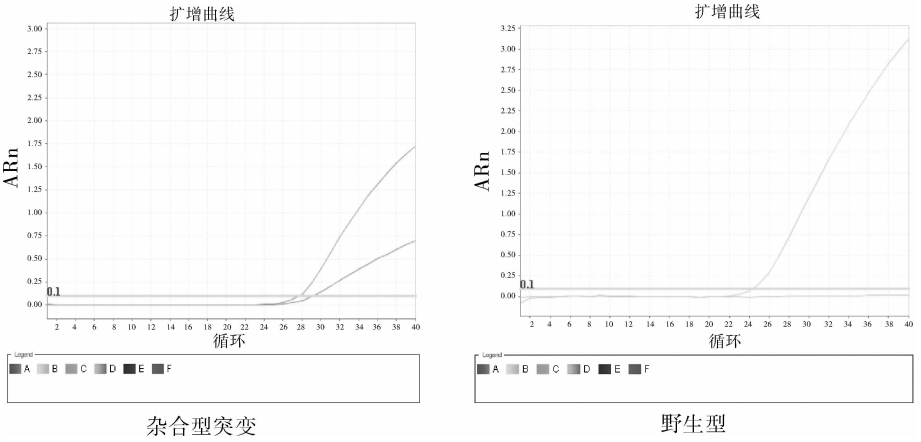

图 1　JAK2V617 基因检测图

2. JAK2V617 基因突变阳性的 MPN 患者体内 WT1 基因表达情况:25 例 JAK2V617 基因突变阳性的 MPN 患者中,11 例 WT1 基因表达(0.102 ± 0.068)明显升高,高于正常对照组(0.001 ± 0.001),两者比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。WT1 基因在 JAK2V617 基因突变阳性的 MPN 患者中检测阳性率为 44%(图 2)。

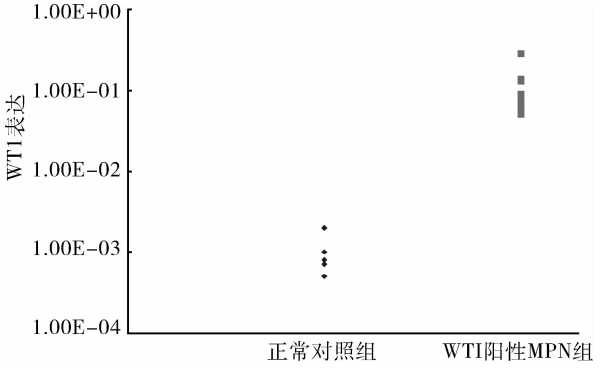

图 2　JAK2V617 突变阳性 MPN 患者中 WT1 基因表达情况

讨　　论

MPN 是指分化相对成熟的一系或多系骨髓细胞不断地克隆性增殖所致的一组肿瘤性疾病。2005 年几个研究小组先后报道了 PV、ET 患者体内存在 JAK2V617F 基因突变,2008 年世界卫生组织将 JAK2V617F 基因突变纳入了 BCR - ABL 阴性 MPN 的诊断标准[4~6]。本研究结果显示,PV 患者 JAK2V617F 基因突变阳性率为 87.5%,ET 患者 JAK2V617F 基因突变阳性率为 61.1%,与国内外研究报道一致[7,8]。

JAK2 是 Janus 蛋白酪氨酸激酶家族成员之一,JAKs 家族通过介导包括促红细胞生成素、血小板生成素、粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子、IL - 3、IL - 10、IL - 12 等多种细胞因子的信号转导,调节细胞的分化、增殖、生存、细胞迁移等,在造血系统和免疫系统发挥重要作用[9]。JAKs 突变可以引发严重的血液系统和免疫系统疾病[10,11]。JAK2 基因羧基末端为具有催化活性的蛋白质酪氨酸激酶结构域(JH1)和假激酶结构域(JH2)。JH2 假激酶结构域调控 JHl 的催化活性,JH2 假激酶结构域具有残存的激酶活性和

磷酸化抑制作用[12]。有研究表明,JAK2V617F 突变发生在 JH2 假激酶结构域,JAK2V617F 突变解除了正常情况下抑制 JH1 活性的作用,从而使 JH1 在没有信号刺激的情况下持续激活,进而导致了 JAK2 - STAT、MAPK、PI_3K/Akt 信号途径的持续激活[13~15]。STAT5 对于 JAK2V617F 调控的细胞增殖起非常关键的作用。通过信号转导途径,调控抗凋亡基因 Bcl - xL、细胞周期调控蛋白 Cyclin D1、Cdc25A 等,对于受影响的细胞而言,表现为增生优势。

WT1 基因有可能是 JAK2 信号途径的下游基因之一。WT1 蛋白梭基末端为锌指蛋白结构域,具有较强的转录调控作用,可以增强或抑制特异靶基因的表达,其靶基因主要与细胞生长、代谢、分化及凋亡等有关。在血液系统肿瘤尤其是急性白血病中,WT1 基因呈高度表达,WT1 基因表达水平的高低与白血病的预后呈负相关,可能主要发挥癌基因的作用。国外研究表明, JAK2V617F 纯合突变的细胞株 HEL 和 UKE - 1,WT1 呈阳性表达。在 HEL 和 UKE - 1 细胞株培养过程中加入 JAK2 抑制剂后,WT1 表达水平明显下降[1]。表明 WT1 表达水平的高低与 JAK2 的活性相关。那么在 JAK2V617F 突变阳性的 MPN 中,是否存在 WT1 基因表达水平的增高,是笔者要探讨的问题。

正常骨髓表达少量的 WT1 基因,正常外周血 WT1 基因表达极低,常检测不到,且 WT1 主要表达于 $CD34^+$ 细胞群。因此,笔者选用骨髓标本作为研究对象。本研究结果显示,部分 JAK2V617 基因突变阳性 MPN 患者 WT1 基因表达升高,另外 9 例 JAK2V617 基因突变阴性的 MPN 患者 WT1 基因表达与正常对照组比较无明显差异。JAK2V617F 基因突变与 WT1 基因表达可能存在一定的相关性。MPN 持续进展可以引起骨髓衰竭或转化为急性白血病。急性髓系白血病患者 WT1 基因呈高度表达,部分也可以检测到 JAK2V617 基因突变。高表达 WT1 基因且 JAK2V617 基因突变阳性的 MPN 患者是否更容易转化为急性白血病,以及 WT1 基因表达水平与 MPN 的预后、进展之间的关系尚需延长观察时间,增加观察样本数进一步深入探讨。

参考文献

1 Berkofsky - Fessler W, Buzzai M, Kim MK, *et al*. Transcriptional profiling of polycythemia vera identifies gene expression patterns both dependent and independent from the action of JAK2V617F [J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(17):4339 - 4352

2 Cilloni D, Saglio G. WT1 as a universal marker for minimal residual disease detection and quantification in myeloid leukemias and in myelodysplastic syndrome[J]. Acta Haematol, 2004(1 - 2), 112:79 - 84

3 Ostergaard M, Olesen LH, Hasle H, *et al*. WT1 gene expression: an excellent tool for monitoring minimal residual disease in 70% of acute myeloid leukaemia patient - results from a single - centre study[J]. Br J Haematol, 2004, 125(5):590 - 600

4 James C, Ugo V, Couedic JPL, *et al*. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signaling causes polycythaemia vera[J]. Nature, 2005, 434 (7037):1144 - 1148

5 Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, *et al*. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myelopmliferative diseases[J]. Lancet, 2005, 65 (9464):1054 - 1061

6 Tefferi A, Thiele J, Orazi A, *et al*. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel[J]. Blood, 2007, 110(4):1092 - 1097

7 Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, *et al*. Again - of - function mutation of JAK2 in myelopmliferative disorders[J]. N Engl J Med, 2005, 352(17):1779 - 1790

8 晁红颖,范峥,张日,等. 412 例骨髓增殖性肿瘤的 JAK2V617F 突变检测及其临床意义[J]. 中华肿瘤杂志, 2009, 31 (7):510 - 514

9 Haan C, Behrmann I, Haan S. Perspectives for the use of structural information, and chemical genetics to develop inhibitors of Janus kinases[J]. J Cell Mol Med, 2010, 14(3):504 - 527

10 Mahindra A, Cirstea D, Raje N. Novel therapeutic targets for multiple myeloma [J]. Future Oncol, 2010, 6(3):407 - 418

11 Riese RJ, Krishnaswami S, Kremer J. Inhibition of JAK kinases in patients with rheumatoid arthritis: scientific rationale and clinical outcomes[J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2010, 24(4):513 - 526

12 Ungureanu D, Wu J, Pekkala T, *et al*. The pseudokinase domain of JAK2 is a dual - specificity protein kinase that negatively regulates cytokine signaling[J]. Nat Struct Mol Biol, 2011, 18(9):971 - 976

13 Gabler K, Behrmann I, Haan C. JAK2 mutants (e. g., JAK2V617F) and their importance as drug targets in myeloproliferative neoplasms [J]. JAKSTAT, 2013, 2(3): e25025

14 Goranda SP, Dechow TN, Gmndler R, *et al*. Oncogenic JAK2V617F requires an intact SH2 - like domain for constitutive activation and induction of a myeloproliferative disease in mice[J]. Blood, 2010, 116 (22):4600 - 4611

15 Pradhan A, Lambert QT, Griner LN, *et al*. Activation of JAK2 - V617F by components of heterodimeric cytokine receptors[J]. J Biol Chem, 2010, 285 (22): 16651 - 16663

(收稿日期:2014 - 03 - 24)
(修回日期:2014 - 04 - 29)