

• 基础实验研究论著 •

JAK2V617F 基因突变的定量测定及在慢性骨髓增殖性疾病中的应用

李业华¹, 刘敏², 黄彬², 陈培松^{2△}(1. 广西玉林市红十字会医院检验科, 广西玉林 537000; 2. 中山大学附属第一医院
检验医学部, 广东广州 510080)

摘要:目的 探讨荧光定量 PCR 的方法检测 JAK2V617F 基因突变并分析其在慢性骨髓增殖性疾病(CMPD)中的诊断价值。方法 采用荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测 68 例确诊 CMPD 患者骨髓标本中 JAK2V617F 基因突变的阳性率和相对定量, 分析其在 CMPD 中的诊断价值以及和临床资料之间的联系。结果 68 例确诊患者的骨髓标本均成功扩增 JAK2V617F 野生型和突变型。JAK2V617F 基因突变的总阳性率为 66.2%(45/68), 其中真性红细胞增多症(PV)患者阳性率 75.0%(21/28), 原发性血小板增多症(ET)阳性率 60.6%(20/33), 特发性骨髓纤维化(IMF)阳性率 57.1%(4/7)。PV 患者 JAK2V617F 突变阳性率明显高于 ET 和 IMF 患者。PV 患者 JAK2V617F 的相对定量和血红蛋白数和白细胞数呈正相关。ET 患者中 JAK2V617F 的相对定量和患者的血小板计数呈正相关。结论 荧光定量 PCR 的方法能够快速准确的检测 JAK2V617F 基因突变及其突变比例, 为临床诊断 CMPD 提供有效的实验室指标, JAK2V617F 的相对定量和患者的临床血液学指标存在一定关系。

关键词:骨髓增殖性疾病; 聚合酶链反应; 实验室技术和方法

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.16.005

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)16-2132-03

Quantitative determination of JAK2V617F mutation and its application in chronic myeloproliferative disorders

Li Yehua¹, Liu Min², Huang Bin², Chen Peisong^{2△}

(1. Department of Laboratory, Yulin Municipal Red Cross Hospital, Yulin, Guangxi 537000, China; 2. Department of Laboratory Medicine, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

Abstract: **Objective** To quantitatively determine JAK2V617F mutation by fluorescence quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR) and to analyze its diagnostic value in chronic myeloproliferative disorders(CMPD). **Methods** FQ-PCR was adopted to detect the positive rate and the relative quantification of JAK2V617F gene mutation in the marrow samples of 68 patients with CMPD. Their diagnostic value in CMPD and their relation with the clinical data were analyzed. **Results** The marrow samples in 68 cases of CMPD were successfully amplified in wild-type and mutant JAK2V617F. The total positive rate of the JAK2V617F gene mutation was 66.2%(45/68). The positive rate was 75.0%(21/28) in the patients with polycythemia vera(PV), 60.6%(20/33) in the patients with primary thrombocythemia(ET) and 57.1%(4/7) in patients with idiopathic myelofibrosis respectively. The positive rate of JAK2V617F mutation in the PV patients was significantly higher than that in the patients with ET and IMF. The JAK2V617F relative quantification in the PV patients was positively correlated with the hemoglobin concentration and white blood cell(WBC) count, and which in the ET patients was positively correlated with the platelet count. **Conclusion** FQ-PCR can quickly and accurately detect JAK2V617F mutation and its mutation ratio, which provides an effective laboratory indicator for the clinical diagnosis of CMPD. Certain relation exists between the JAK2V617F relative quantification and the clinical hematological indexes of the patients.

Key words: myeloproliferative disorders; polymerase chain reaction; laboratory techniques and procedures

慢性骨髓增殖性疾病(CMPD)是一类克隆性血液系统恶性疾病,以红细胞、血小板过度增殖多伴脾大、血栓形成、出血并有骨髓纤维化和白血病转化倾向为特征。经典的 CMPD 包括真性红细胞增多症(PV)、原发性血小板增多症(ET)、慢性特发性骨髓纤维化(IMF)等。CMPD 发病机制尚不完全清楚,目前认为其可能与多潜能造血干细胞损伤致克隆性血细胞生成有关。由于过去缺乏特异性的分子诊断标志,故诊断该类疾病仅依靠临床表现、细胞形态学等手段以及排除继发性 CMPD 等方法。近年国外学者相继报道了在 CMPD 中发现新的共同的 JAK2V617F 基因突变,并研究证实该突变发生于干细胞水平,是 CMPD 的主要分子致病机制及诊断标志^[1-3]。然而,常见的检测 JAK2V617F 方法荧光定量 PCR 和 AS-PCR,由于不同实验室 JAK2V617F 的检测方法不同,报道的

JAK2V617F 突变对 CMPD 的诊断效能也存在较大差异^[4-5]。荧光定量聚合酶链反应(PCR)是目前分子诊断实验室最常用的实验方法。采用荧光定量 PCR 的方法可以快速、敏感的测定患者标本中的 JAK2V617F 突变率。因此,研究者采用荧光定量 PCR 的方法,对 68 例确诊 CMPD 患者进行 JAK2V617F 检测,通过 JAK2V617F 基因突变阳性率及相对定量,探讨其在 CMPD 诊断中的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2011 年 11 月至 2013 年 10 月间中山大学附属第一医院确诊 CMPD 的门诊和住院患者 68 例,其中男 46 例,女 21 例,年龄为 17~87 岁,中位年龄 46 岁。所有患者均经骨髓细胞形态学、组织化学、骨髓病理、BCR/ABL 等检查, CMPD 的诊断采用世界卫生组织(WHO)2010 年修订的

CMPD 诊断标准^[6]。

1.2 仪器与试剂 DNA 提取试剂盒(QuickGene SP 公司), JAK2V617F 突变定量检测试剂盒(上海申友生物技术有限责任公司), ABI7500 荧光定量 PCR 扩增仪(美国 ABI 公司), 紫外光凝胶成像仪(法国 Viber Fusion 系统)。

1.3 标本采集 患者初诊时使用 EDTA 抗凝管抽取骨髓 2~3 mL, 使用柱式离心法 DNA 提取试剂盒抽提基因组 DNA。紫外分光光度仪上进行 DNA 产物浓度及纯度检测。A₂₆₀/A₂₈₀ 比率在 1.8~2.0, 可以认为 DNA 产物纯度良好。读取吸光度 260 nm 所测的 OD 值, 按每 OD 值相当于 50 ng/μL, 调整 DNA 终浓度为 100 mg/mL。同时留取外周血 2 mL, 用于血常规分析。

1.4 检测方法

1.4.1 JAK2V617F 突变的检测 在 ABI7500 荧光定量 PCR 仪上参照厂家试剂盒提供的反应引物和条件: 42 °C, 5 min 1 个循环; 94 °C, 5 min 1 个循环; 94 °C, 10 s, 65 °C, 40 s 40 个循环; 37 °C 60 s 保温, 设定在 PCR 循环中 65 °C 时收集荧光信号, 荧光为 FAM 进行 JAK2V617F 基因突变定量检测, 基线设定如下: 分析前先选定检测荧光 FAM, 若没有 Ct<16 的强阳性样品, 就选 5~13 个循环的平均荧光信号为基线再分析 Ct, 若有 Ct<16 的样品, 就将此样品定为强阳性, 并将此样品从数据库中剔除, 再以 5~13 个循环的平均荧光信号为基线再分析。分别测定野生型和突变型的拷贝数, 最终结果以两者的比例表示。每次基线设置在 5~13 个循环, 标准曲线的线性回归系数大于或等于 0.95, 每次扩增均设阴阳性对照。阴性对照无 Ct 值, 临界阳性对照, 阳性对照用野生型反应液和突变型反应液同时检测, 均应显示正常 PCR 反应, 且临界阳性对照的 Ct<32, 阳性对照的 Ct<22。

1.4.2 JAK2V617F 突变的结果分析判断 根据基线设定及标本的扩增曲线得出标本 Ct 值, 若 JAK2 突变型 Ct 值与 JAK2 野生型 Ct 值之差大于或等于 8, 则为完全野生型或 JAK2 突变型低于检测限; 若 JAK2 野生型 Ct 值与 JAK2 突变型 Ct 值之差大于或等于 8, 则为完全突变型或 JAK2 野生型低于检测限; 若处于两者之间, 则直接报告 JAK2 突变型拷贝数/JAK2 野生型拷贝数的比值, 该值为 JAK2V617F 的相对定量。

1.4.3 产物电泳及测序 取 10 μL 扩增 PCR 产物与 2 μL 缓

冲液混匀, 经 2% 琼脂糖凝胶(含 1 μg/mL 溴化乙啶)110 V 电泳 30 min 后, 用紫外光凝胶成像仪分析图像并照相留存, 通过电泳条带的位置和数量判定 JAK2 突变型阳性。所有产物均经测序验证突变位点的情况(送生工生物工程股份有限公司测序)。

1.5 统计学处理 所有统计资料均采用 SPSS13.0 软件包进行统计学处理, 其中计量资料采用方差分析, 计数资料采用卡方检验, P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 JAK2V617F 的检测和验证 68 例确诊骨髓增殖性疾病患者中有 45 例检测出 JAK2V617F 基因突变, 阳性率为 66.2%。所有产物均经琼脂糖凝胶电泳, 证实产物为单一的 DNA 片段, 不存在非特异性扩增见图 1A(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。产物经测序验证突变的位点为 V617F 的 T 突变为 G, 和野生型图。见图 1B(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

2.2 临床资料 68 例确诊骨髓增殖性疾病 JAK2V617F 突变患者, 通过骨髓细胞形态学、组织化学、骨髓病理、BCR/ABL 等检查及 WHO 2010 年修订的 CMPD 诊断。68 例患者的临床资料和检测结果如表 1 所示。其中 PV 患者为 28 例, JAK2V617F 阳性率 75.0%(21/28); ET 患者为 33 例, JAK2V617F 阳性率 60.6%(20/33); IMF 患者 7 例, JAK2V617F 阳性率 57.1%(4/7)。PV 患者中, JAK2V617F 突变阳性率明显高于 ET 和 IMF 患者(P<0.05)。在本研究中, 对 JAK2V617F 进行相对定量测定, 发现在同为 JAK2V617F 阳性的患者中 PV 患者的突变负荷也明显高于其他两组患者(P<0.05)。见图 2A(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

表 1 慢性骨髓增殖性疾病患者 JAK2V617F 突变年龄和性别阳性率

疾病	n	中位年龄(岁)	性别(n)		JAK2V617F 突变[n(%)]	
			男性	女性	阳性率	阴性率
PV	28	48	20	8	21(75.0)*	7(25.0)
ET	33	48	17	16	20(60.6)	13(39.4)
IMF	7	61	5	2	4(57.1)	3(42.9)

*: P<0.05, 与 ET 和 IMF 阳性率比较。

表 2 JAK2V617F 突变和患者临床特征的关系

项目	PV			ET		
	阳性	阴性	P	阳性	阴性	P
白细胞计数(×10 ⁹ /L)	16.61±11.56	9.20±3.74	0.03	15.39±16.57	12.79±5.72	0.18
红细胞计数(×10 ¹² /L)	6.94±0.89	5.99±0.68	0.14	4.98±0.83	4.32±0.60	0.59
血红蛋白(g/L)	196.00±17.79	188.00±23.41	0.01	136.85±21.91	125.82±22.2	0.46
血小板计数(×10 ¹² /L)	401.57±250.12	237.85±121.11	0.16	847.35±225.7	808.69±314.16	0.04
年龄(岁)	55.10±14.70	36.70±16.70	0.21	49.00±15.66	46.69±21.89	0.32

2.3 JAK2V617F 基因突变及与临床资料的关系 由于本次研究所取得的 IMF 患者样本量较小, 未纳入统计。如表 2 所示, JAK2V617F 阳性的 PV 患者, 白细胞数和血红蛋白浓度明显高于 JAK2V617F 阴性的患者。在 ET 患者组中, JAK2V617F 阳性的患者血小板数也明显高于阴性的患者见表

2。研究者进而分析了 JAK2V617F 相对定量和这几个指标的关系, 证实 PV 患者中, JAK2V617F 相对定量和白细胞计数和血红蛋白浓度呈正比, 见图 2B、C(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”), 而在 ET 患者中, JAK2V617F 相对定量和 PLT 数量呈正比, 见图 2D(见《国际检验医学杂志》网站主

页“论文附件”)。

3 讨 论

相关研究表明 JAK2 作为具有酪氨酸激酶活性的激酶系统,在骨髓增殖性疾病的发病中具有十分重要的作用。当 JAK2 发生 V617F 突变时, JAK2V617F 作为一种组成性酪氨酸激酶,可以持续激活 JAK-STAT 信号传导系统,导致骨髓细胞产生异常增殖。特别是当 JAK2V617F 与促红细胞生成素受体(EPOR)、血小板生成素受体(TPOR)共表达时,这种激活作用更强^[3,7-8]。因此 JAK2V617F 的检测在骨髓增殖性疾病的诊断和治疗上具有重要的价值。

本研究运用荧光定量 PCR 方法检测 CMPD 患者的 JAK2V617F 突变的拷贝数来分析其在 CMPD 中的诊断价值。JAK2V617F 突变的检测目前没有公认的金标准,不同的检测方法在敏感性、特异性上的差别也较大。荧光定量 PCR 是分子诊断常用的实验方法,其敏感性和可操作性均高于普通的 PCR。本实验共成功扩增 68 份标本,经电泳凝胶分析,均为单一的 PCR 产物,阳性的标本也经测序后证实为 V617F 突变。然而由于凝胶电泳的敏感性低于荧光定量的方法,在研究过程中,仍然要注意非特异性扩增的现象。如果野生型和突变型的 Ct 值相差较大,在判断结果上应当慎重,一般认为野生型和突变型的 Ct 值相差应控制在 8 以内。国外文献报道 JAK2V617F 突变阳性率在 PV 中为 65%~97%、在 ET 中为 23%~57%、在 IMF 中为 35%~57%^[1,9-11],本研究检测到 JAK2V617F 突变率在 PV 患者中的发生率为 75%,与既往报道基本一致,而在 ET 为 60.6%、IMF 为 57.1%略高于国外文献^[1]报道,考虑原因主要是实验方法的差异,荧光定量 PCR 方法在敏感性上高于普通 PCR 以及测序等方法^[12]。

CMPD 患者中, PV 患者 JAK2V617F 突变阳性率明显高于 ET 和 IMF 患者($P < 0.05$)有统计意义,而对 JAK2V617F 进行相对定量测定,发现在同为 JAK2V617F 阳性的患者中 PV 患者的突变负荷也明显高于其他两组患者($P < 0.05$),这与国内外文献^[13-15]报道相符。

CMPD 患者的临床特征及实验室参数与 JAK2V617F 基因突变负荷率存在一定的关联性。本研究实验观察了 PV 和 ET 患者外周血细胞数, JAK2V617F 基因突变阳性的 PV 患者的白细胞计数及血红蛋白较突变阴性患者高,差异具有统计学意义($P < 0.05$),并且 JAK2V617F 基因突变负荷率和血红蛋白浓度和白细胞计数呈正相关。在 ET 患者中 JAK2V617F 突变阳性患者的血小板计数较突变阴性患者的高,差异具有统计学意义($P < 0.05$),并且也与 JAK2V617F 的突变负荷呈正相关。这提示了在 CMPD 患者中, JAK2V617F 的突变负荷有助于提示疾病的严重程度,对该类患者的治疗监测也具有一定的意义。

综上, 荧光定量 PCR 的方法可以快捷准确地对 JAK2V617F 进行定量测定。不同 CMPD 类型的 JAK2V617F 的发生率不同, JAK2V617F 的突变比例与疾病的血液学特征密切相关。因此,对 CMPD 患者进行 JAK2V617F 基因检测不仅有助于临床诊断,同时对突变负荷数的分析还能有助于判断疾病的程度及监测微小残留病变。

参考文献

[1] Jones AV, Kreil S, Zoi K, et al. Widespread occurrence of the

JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders [J]. *Blood*, 2005, 106(6): 2162-2168.

[2] Takahashi K, Patel KP, Kantarjian H, et al. JAK2 p. V617F detection and allele burden measurement in peripheral blood and bone marrow aspirates in patients with myeloproliferative neoplasms [J]. *Blood*, 2013, 122(23): 3784-3786.

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

[4] Kui JS, Espinal-Witter R, Wang YL. Laboratory detection of JAK2V617F in human myeloproliferative neoplasms [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 999(1): 41-57.

[5] 徐媛媛, 李惠民. 骨髓增殖性疾病 JAK2 V617F 研究进展 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2009, 17(1): 238-242.

[6] Tefferi A, Vardiman J. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms; the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms [J]. *Leukemia*, 2007, 22(1): 14-22.

[7] Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis [J]. *Cancer Cell*, 2005, 7(4): 387-397.

[8] Yan D, Hutchison RE, Mohi G. Tyrosine 201 is required for constitutive activation of JAK2V617F and efficient induction of myeloproliferative disease in mice [J]. *Blood*, 2012, 120(9): 1888-1898.

[9] Levine RL, Pardanani A, Tefferi A, et al. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders [J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(9): 673-683.

[10] Stein BL, Williams DM, Wang NY, et al. Sex differences in the jak2v617f allele burden in chronic myeloproliferative disorders [J]. *Haematologica*, 2010, 95(7): 1090-1097.

[11] Xing S, Wanting TH, Zhao W, et al. Transgenic expression of JAK2V617F causes myeloproliferative disorders in mice [J]. *Blood*, 2008, 111(10): 5109-5117.

[12] 李伟达, 李建勇, 张苏江, 等. 骨髓增生性疾病 JAK2V617F 突变检测方法的比较研究 [J]. *国际检验医学杂志*, 2010, 31(1): 42-44.

[13] Remacha AF, Nomdedeu JF, Puget G, et al. Occurrence of the JAK2 V617F mutation in the WHO provisional entity: myelodysplastic/myeloproliferative disease, unclassifiable-refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis [J]. *Haematologica*, 2006, 91(5): 719-720.

[14] Theocharides A, Boissinot M, Girodon F, et al. Leukemic blasts in transformed JAK2-V617F-positive myeloproliferative disorders are frequently negative for the JAK2-V617F mutation [J]. *Blood*, 2007, 110(1): 375-379.

[15] Bench AJ, White HE, Foroni L, et al. Molecular diagnosis of the myeloproliferative neoplasms: UK guidelines for the detection of jak2 v617f and other relevant mutations [J]. *Br J Haematol*, 2013, 160(1): 25-34.

(收稿日期: 2014-02-20)