

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2021.11.017

❖ 临床研究 ❖

JAK2 V617F 基因突变及网织血小板数量在骨髓增殖性肿瘤并发血栓性疾病的研究

伏俊¹, 任静¹, 咎春梅⁴, 严富天², 李秀蓉³

(广元市中心医院, 1. 检验科; 2. 特检科; 3. 病理科; 4. 广元市中医院妇产科, 四川 广元 628000)

【摘要】目的: 探究 JAK2 V617F 基因突变及网织血小板与骨髓增殖性肿瘤 (MPN) 并发血栓性疾病的相关性。**方法:** 选取 132 例 MPN 患者为研究对象, 依据是否并发血栓分为病例组 ($n = 82$) 和血栓组 ($n = 50$); 另选 40 名同期体检健康志愿者为对照组。比较三组对象外周血网织血小板计数及 MPN 患者 JAK2V617 基因突变情况, 分析其与 MPN 并发血栓性疾病的相关性。**结果:** 血栓组网织血小板计数高于病例组及对照组 ($P < 0.05$), 且病例组高于对照组 ($P < 0.05$)。血栓组 JAK2 V617F 基因突变阳性率高于病例组 ($P < 0.05$)。网织血小板计数及 JAK2V617 基因突变与血栓的发生呈正相关 ($P < 0.05$)。**结论:** MPN 患者并发血栓性疾病与网织血小板计数及 JAK2 V617F 基因突变有一定的相关性, 可能成为评估 MPN 患者血栓早期发生的实验室检查手段。

【关键词】 骨髓增殖性肿瘤; JAK2 V617F 基因; 网织血小板计数

【中图分类号】 R733.3 **【文献标志码】** A

Study on JAK2 V617F gene mutation and reticulocyte count in bone marrow proliferative tumors complicated with thrombotic diseases

FU Jun¹, REN Jing¹, ZAN Chun-mei⁴, YAN FU-tian², LI Xiu-e³

(1. Department of Laboratory; 2. Department of Special Laboratory; 3. Department of Pathology, Guangyuan Central Hospital; 4. Department of Obstetrics and Gynecology, Guangyuan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangyuan 628000, Sichuan, China)

【Abstract】Objective: To explore the relationship between JAK2 V617F gene mutation and reticulocyte and thrombotic disease in bone marrow proliferative tumor (MPN). **Methods:** 132 patients with MPN were divided into case group ($n = 82$) and thrombus group ($n = 50$) according to whether they were complicated with thrombosis, and 40 healthy volunteers were selected as the control group. The peripheral blood reticulocyte count and JAK2 V617 gene mutation in patients with MPN were compared, and their correlation with MPN complicated with thrombotic diseases was analyzed. **Results:** The reticulocyte platelet count of thrombus group was higher than that of case group and control group ($P < 0.05$), and the case group was higher than the control group ($P < 0.05$). The positive mutation rate of JAK2 V617 gene in the thrombosis group was higher than that in the case group ($P < 0.05$). There was a positive correlation between reticulocyte platelet and JAK2 V617 gene mutation and thrombosis ($P < 0.05$). **Conclusion:** Thrombotic diseases in patients with MPN are related to reticulocyte platelet count and JAK2 V617F gene mutation, which may be a laboratory test method to evaluate the early occurrence of thrombosis in patients with MPN.

【Key words】 Bone marrow proliferative tumor; JAK2 V617F genes; Reticulocyte platelet count

骨髓增生性肿瘤 (myeloproliferative neoplasm, MPN) 是克隆性造血干细胞肿瘤, 特征为一种或多种骨髓细胞的增殖。大多数疾病影响中老年人群, 且发病率逐年增加, 易与血栓形成、栓塞或重要器官梗死并发^[1]。尽早发现栓塞并及时采取干预措施, 对降低患者死亡率意义重大。随着研究的深入, 目前发现 MPN 与个体的遗传学突变密切相关, 而 JAK2 V617F 基因突变位点是目前 MPN 最为特征性

的遗传学突变。国内亦有研究^[2]发现, JAK2 V617F 突变阳性患者更易罹患血栓栓塞。目前, JAK2 V617F 突变已被世界卫生组织 (WHO) 列为 BCR/ABL 阴性 MPN 的主要诊断标准之一^[3]。网织血小板由骨髓释放, 细胞浆内含有残留 RNA, 反映骨髓血小板增生的速度^[4]。AK2V617F 基因位点突变与网织血小板相互结合的检测方法对早期诊断 MPN 有一定的应用价值。本研究旨在探讨 JAK2 V617F

基因突变及网织血小板计数与 MPN 并发血栓性疾病的相关性,为早期的干预治疗提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2017 年 2 月至 2019 年 2 月广元市中心医院收治的 132 例 MPN 患者为研究对象,是否并发血栓分为病例组 ($n = 82$) 和血栓组 ($n = 50$);另选 40 名同期体检健康志愿者为对照组。病例组中,男性 43 例,女性 39 例;年龄 31.6 ~ 75.3 岁,平均 (44.7 ± 4.6) 岁。血栓组中,男性 27 例,女性 22 例;年龄 32.8 ~ 77.5 岁,平均 (45.5 ± 4.0) 岁;对照组中,男性 22 名,女性 18 名;年龄 31.4 ~ 75.9 岁,平均 (45.0 ± 3.7) 岁。本研究经院伦理委员会批准,所有对象知情同意。三组对象性别、年龄等一般资料比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。纳入标准:(1)根据“世界卫生组织 (WHO) 相关 MPN 新诊断标准”确诊的患者,包括以下 8 种类型:慢性髓性白血病 BCR/ABL1 阳性 (CML)、真性红细胞增多症 (PV)、原发性血小板增多症 (ET)、原发性骨髓纤维化 (PMF)、慢性中性粒细胞白血病 (CNL)、慢性嗜酸性粒细胞白血病非特质型 (nototherwise specified, CEL)、肥大细胞增多症 (mastocytosis)、骨髓增殖性肿瘤未分类型 (MPN-U);(2)年龄 > 18 岁;(3)血栓事件经计算机断层扫描、磁共振成像、数字减影血管造影或彩色多普勒超声证实,并由家进一步诊断;(4)临床资料完整。排除标准:(1)其他类型血液恶性疾病,如原发白血病;(2)其他引起血栓事件的疾病,如骨科手术、妊娠、房颤;(3)严重肝肾脑肺心等脏器功能障碍。

1.2 方法

1.2.1 网织血小板检测 采集研究对象 EDTA-K3 抗凝全血 3 mL,颠倒混匀 5 ~ 8 次,采用迈瑞 BC-6900 自动血液分析仪检测网状血小板计数,试剂、质控和校准品均为配套 (M-68FD 染色液批号:2019101404 等)。

1.2.2 JAK2V617 基因突变检测 (1)DNA 提取:采用西安天隆全血基因组 DNA 提取试剂盒 (批号: E01888070251 等) 提取,操作严格按试剂盒说明书进行。(2)PCR 检测:引物由上海之江生物合成,引物物序列为 P5'- CCTCAGAACGTTGATGGCA-3', P_{2r} 5'- ATTGCTTTCCTTTTFCACAACA-3', P_{nr} 5'-AG-CATTTGGT TTTAAATTATGGAGTATATG-3' 和 P_{mr} 5'-GTTTACTTACTCTCGTCTCCACAAAA-3'。扩增条件:95 °C 反应 30 s,54 °C 反应 25 s,72 °C 反应 30 s,共 40 个循环,最后 72 °C 反应 10 min 结束。PCR 产

物经 2.5% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定,产物为 453 bp,279 bp (JAK2V617F 突变等位基因) 和 229 bp (野生型等位基因)。所有的实验室检测均在广元市中心医院检验科由具备相应资质的实验室老师完成,实验中所采购和使用的试剂均经过 CFDA 批准。

1.3 统计学分析

采用 SPSS20.0 软件对数据进行分析与处理。计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用 t 检验;计数资料以 $[n (\%)]$ 表示,采用 χ^2 检验;相关性分析采用 Pearson 分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组网织血小板计数及 JAK2V617 基因突变阳性率比较

三组网织血小板计数及 JAK2V617 基因突变阳性率比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),且血栓组 $>$ 病例组 $>$ 对照组。见表 1。

表 1 三组对象网织血小板计数及 JAK2V617 基因突变阳性率比较 $[\bar{x} \pm s, n (\%)]$

组别	网织血小板计数	JAK2V617 基因突变率
血栓组 ($n = 50$)	$24.0 \pm 6.3^{* \#}$	40 (80.0) $^{* \#}$
病例组 ($n = 82$)	$12.9 \pm 1.9^*$	49 (60.0) *
对照组 ($n = 40$)	7.0 ± 1.8	10 (25.0)

* $P < 0.05$,与对照组相比;# $P < 0.05$,与病例组相比。

2.2 网织血小板计数及 JAK2V617 基因突变与血栓形成的相关性

相关性分析显示,网织血小板计数及 JAK2V617 基因突变与血栓形成呈正相关 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 网织血小板计数及 JAK2 V617 基因突变与血栓形成的相关性

变量	例数	血栓发生例数	r 值	P 值
网织血小板升高	72	50	0.778	0.001
JAK2 基因突变阳性	89	50	0.535	< 0.001

3 讨论

随着 MPN 患者数量的增加,且大多数涉及中老年人,容易出现血栓形成、栓塞或重要器官梗塞等并发症^[5]。血小板是由骨髓成熟的巨核细胞所产生,而网织血小板是巨核细胞转化为血小板过程中的一个幼稚阶段,可以反映骨髓血小板增生的速度。本研究结果显示,三组对象网织血小板计数比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),且血栓组 $>$ 病例组 $>$ 对照组,与既往研究^[6-7] 结果一致,表明 MPN 患者存在血小板的异常增生,而血小板增多,会导致血液的

凝固性增高,易诱发血栓的形成。

半个多世纪以来,通过对骨髓增殖性肿瘤持续研究,除了发现染色体 [t(9.22)(q34;q11)] 形成 BCR/ ABL 融合基因是 MPN 特异的分子标记外,而在 BCR/ ABL 阴性患者(如 ET, PMF)中尚未发现类似的特征性分子生物学指标,也没有发现 MPN 早期诊断特异性较强的生物学指标,而 Baxter 等在 2005 年文献首次发现 Janus kinase (JAK) 2 基因 V617F 突变存在于 MPN 患者,成为了此病研究的一大突破^[8]。JAK2 具备,通过对白细胞介素-3、巨噬细胞集落刺激因子、促血小板生成素、促红细胞生成素、生长因子等多种细胞因子的信号传导调节、促进细胞增殖^[9]。多数学者^[10]认为,下游相关信号传导分子表达异常是 JAK2 基因突变后的主要继发性事件,可使一系列细胞产生过度增生,分别向粒细胞、巨核细胞、红细胞分化,最终诱发 MPN、血栓病变。在各种造血生长因子受体的信号转导与 JAK2 V617F 基因的突变率及网状血小板的生成状态有着紧密的联系,或可促进或调节造血细胞的增殖^[11]。本研究结果也显示,三组 JAK2 V617F 基因的突变率比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),且血栓组 > 病例组 > 对照组。相关性分析显示,网织血小板计数及 JAK2 V617F 突变的阳性率呈正相关 ($P < 0.05$),表明网织血小板升高及 JAK2 V617F 突变的阳性率增加,MPN 患者发生血栓的风险更大。本研究的不足在于所收集的病例较少,且仅针对的疾病种类有限,今后将进一步扩大样本量,分析 JAK2 V617F 基因在多种血液病的突变状况。

综上,MPN 患者并发血栓性疾病与网织血小板计数及 JAK2 V617F 基因突变有一定的相关性,可能成为评估 MPN 患者血栓早期发生的实验室检查

手段。

参考文献

- [1] Levine LR, Gilliland DG. Myeloproliferative disorders[J]. Blood, 2008, 112(6): 2190-2198.
- [2] 夏亮, 丁凯阳, 蔡晓燕, 等. 骨髓增殖性肿瘤患者 JAK2V617 基因突变与血栓栓塞相关性研究[J]. 中华血液学杂志, 2010, 31(9): 590-593.
- [3] 莫建文, 黄河, 张春强, 等. JAK-STAT 信号通路在创伤性深静脉血栓形成中作用的实验研究[J]. 中国误诊学杂志, 2007, 7(26): 576-579.
- [4] Dusse LM, Freitas LG. Clinical applicability of reticulated platelets [J]. Clin Chim Acta, 2015, 439: 143-147.
- [5] 何志鹏, 田辉云, 谭明, 等. Ph 阴性骨髓增殖性肿瘤患者驱动基因突变的临床分析[J]. 中国实验血液学杂志, 2018, 26(3): 842-848.
- [6] Lecompte TP, Bernimoulin MP. Novel parameters in blood cell counters[J]. Clin Lab Med, 2015, 35(1): 209-224.
- [7] Thomas-Kaskel AK, Mattern D, Kohler G, et al. Reticulated platelet counts correlate with treatment response in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura and help identify the complex causes of thrombocytopenia in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. Cytometry B Clin Cytom, 2007, 72(4): 241-248.
- [8] 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.
- [9] 张叶华, 郭素丽. JAK2 V617F、DNMT3A、NPM1 和 FLT3-ITD 基因突变与骨髓增殖性肿瘤预后的相关性分析[J]. 中国医学装备, 2019, 16(2): 42-47.
- [10] 张晓南, 孟君霞, 陈杰甫, 等. JAK2V617F 基因突变与 MPN 患者的血细胞计数、凝血指标及血管性疾病关系的临床分析[J]. 现代肿瘤医学, 2019, 27(8): 130-133.
- [11] 冯全管, 杨承玉, 胡慧平. 骨髓增殖性肿瘤 JAK2V617F 突变与中医证候的相关性分析及清肝化痰解毒方的临床干预作用[J]. 山西医药杂志, 2019, 48(2): 21-25.

(收稿日期: 2020-10-05

修回日期: 2021-09-12)