

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.29.008

原发性血小板增多症患者钙网蛋白基因突变及其与临床疗效的相关性

丁莉,王季,唐君玲,马涛,汤计瑞,朱小凤,王雪梅,李晓明[△]

(西南医科大学附属医院血液科,四川泸州 646000)

[摘要] **目的** 检测原发性血小板增多症(ET)患者钙网蛋白(CALR)基因突变情况,评价其与临床疗效的相关性。**方法** 采用 PCR 及其产物直接测序法检测 ET 患者 CALR 基因第 9 号外显子的突变情况,回顾性分析 61 例接受常规方案治疗的 ET 患者临床资料。**结果** CALR 基因第 9 号外显子突变阳性在 JAK2V617F 突变阴性的 ET 患者中检出率较高(51.4%)。其中以 1 型(52 bp 缺失)最多见,占总突变 83.3%;其次为 2 型(5 bp 插入),占总突变 11.1%。相较于 JAK2V617F 突变阳性及 JAK2V617F、CALR 突变双阴性的 ET 患者,CALR 突变阳性的 ET 患者初诊时年龄更小、危险度更低($P<0.05$)。基于羟基脲及干扰素的常规临床治疗方案能使较多的 JAK2V617F 突变阳性及 CALR 突变阳性患者获得完全或部分血液学缓解,相较于双阴性患者总缓解率更高。**结论** CALR 基因 9 号外显子突变是 ET 患者重要分子遗传学标志之一,基于羟基脲及干扰素的常规临床治疗方案能使具有 CALR 基因突变的患者获得较好的血液学反应。

[关键词] 血小板增多;钙网蛋白;突变;治疗结果**[中图分类号]** R558.3**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)29-3755-04

Detection of CALR gene mutation in patients with essential thrombocythemia and its correlation with clinical efficacy

DING Li, WANG Ji, TANG Junling, MA Tao, TANG Jirui,
ZHU Xiaofeng, WANG Xuemei, LI Xiaoming[△]

(Department of Hematology Medicine, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To detect the frequency of calreticulin (CALR) gene mutation in patients with essential thrombocytosis (ET) and evaluate its correlation with clinical efficacy. **Methods** PCR and its direct sequencing were used to detect the mutation of exon 9 of CALR gene in ET patients. The clinical data of 61 patients with ET who received conventional regimen were retrospectively analyzed. **Results** The total mutations of CALR gene exon 9 in JAK2V617F(-) ET patients was 51.4%. Among them, type 1 (52 bp deletion) was the most common, accounting for 83.3% of the total mutation; followed by type 2 (5 bp insertion), accounting for 11.1% of the total mutation. Compared with JAK2V617F(+) and double-negative mutation ET patients, CALR(+) patients with ET were younger ($P<0.05$) and less dangerous ($P<0.05$) at the time of initial diagnosis. Conventional clinical treatment based on hydroxyurea and interferon enable more patients with JAK2V617F(+) or CALR(+) to achieve complete or partial hematologic remission when compared with double-negative ET patients. **Conclusion** The mutation of exon 9 of CALR gene is one of the important molecular genetic markers of ET patients. The conventional clinical treatment based on hydroxyurea and interferon can obtain good hematologic response in patients with mutation of CALR gene.

[Key words] thrombocytosis; calreticulin; mutation; treatment outcome

原发性血小板增多症(essential thrombocythemia, ET)是一类以骨髓巨核细胞系终末分化细胞及外周血血小板增多为主要表现的造血干细胞恶性克隆性疾病。临床可无症状或有血管舒缩功能障碍相关表现,有发生动静脉血栓、出血、进展为骨髓纤维化或急性白血病的风险。既往的研究表明 50%~60%

的 ET 患者具有 JAK2V617F 突变,近年的研究发现钙网蛋白(calreticulin, CALR)基因第 9 号外显子突变存在于 70%~80%的 JAK2V617F 突变阴性 ET 患者中^[1]。有研究表明 CALR 基因突变常与更高的血细胞负荷及血栓事件相关^[2],但目前关于 CALR 基因突变是否影响 ET 患者临床疗效的相关报导尚少见,

故本研究旨在检测 ET 患者 CALR 基因的突变情况,评价其与 ET 患者临床疗效的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2014 年 12 月至 2017 年 6 月就诊于本科室确诊为 ET 的 61 例患者(均已行 JAK2V617F 突变检测),诊断标准及危险分层参照 WHO2008 诊断标准^[3]。其中 JAK2V617F 突变阳性(+)26 例(男 14 例,女 12 例;年龄 18~79 岁),JAK2V617F 突变阴性(-)35 例(男 16 例,女 19 例;年龄 21~83 岁)。收集 35 例 JAK2V617F(-)患者骨髓或外周血标本,检测其 CALR 基因第 9 号外显子的突变情况。上述患者接受临床常规方案治疗,回顾性分析其临床资料,评估疾病缓解情况。本研究通过本院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 CALR 基因第 9 号外显子突变检测 (1)在患者知情同意情况下,抽取患者骨髓或外周血 EDTA 抗凝标本约 3 mL,提取全基因组 DNA (DNA 提取试剂盒由天根生化科技有限公司生产),使用无菌去离子水将其稀释至终浓度 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。(2)PCR 反应体系及循环参数。CALR 基因 9 号外显子目标片段 PCR 引物由上海 Invitrogen 生物技术有限公司合成(正向引物 5'-CTG GCA CCA TCT TTG ACA ACT T-3';反向引物 5'-GGC CTC TCT ACA GCT CGT C-3')。反应体系 25 μL ;其中 Taq 酶混合液 12.5 μL (Takara 公司产品)、上下游引物各 1.0 μL 、去离子水 8.5 μL 、DNA 模板 2.0 μL 。PCR 反应参数:预变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s,40 个总循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min。(3)PCR 产物检测:使用 2% 琼脂糖凝胶电泳初步检测 PCR 产物。扩增出 PCR 产物的样本剩余部分送 Invitrogen 公司纯化后,使用 ABI3730DNA 测序仪(美国应用生物技术公司)进行双向测序。检测到突变的样本进一步送作克隆测序。

1.2.2 危险分层标准^[3] (1)低危组:年龄小于 60 岁,无心血管疾病高危因素(如吸烟、肥胖、高血压、糖尿病、高血脂等),无血栓或栓塞病史。(2)高危组:年龄大于或等于 60 岁,且(或)有血栓或栓塞病史。(3)中危组:介于低危与高危组之间。

1.2.3 治疗方案 所有入组患者:当血小板计数大于或等于 $1\,000 \times 10^9/\text{L}$ 时联合血小板单采,同时辅以羟基脲口服辅助降细胞以减小栓塞风险(据初治时血小板具体计数、年龄来确定起始剂量 15~20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)。当血小板计数小于 $1\,000 \times 10^9/\text{L}$ 时,低危组及中危组患者单用重组人干扰素 $\alpha 2\text{b}$ (IFN- $\alpha 2\text{b}$,北京凯因益生公司)60 $\mu\text{g}/\text{d}$ 皮下注射(注射前

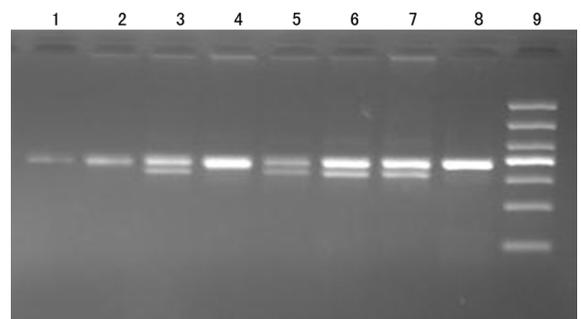
0.5 h 口服奈普生预防流感样不良反应),血小板降至正常上限开始减量为每 2 天 1 次,缓解后逐步减量至 1~2 次/周维持;高危组患者在使用干扰素(方案同上)时继续联合羟基脲辅助降细胞至安全范围(血小板降至 $600 \times 10^9/\text{L}$ 左右)后单用干扰素,血小板降至正常上限开始减量为每 2 天 1 次,缓解后逐步减量至 1~2 次/周维持。

1.3 疗效评价标准 完全缓解:临床症状消失,血象(白细胞、红细胞、血红蛋白、血小板)恢复正常。部分缓解:血细胞计数较治疗前下降 50%,临床表现有所减轻。治疗无效:达不到部分缓解者^[4]。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析。 χ^2 检验或 Fisher 精确检验行计数资料的比较。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PCR 产物电泳及测序结果 CALR 基因野生型样本 PCR 目标产物长度 377 bp,突变型长度则不等于 377 bp。突变型电泳后可见双条带或较厚重模糊的单条带,提示混合型产物(图 1 所示)。PCR 产物剩余部分送双向测序。35 例 JAK2V617F(-)患者中共检出 18 例(51.4%)CALR 基因突变。包含 3 种类型:1 型(52 bp 缺失)15 例(42.8%)、2 型(5 bp 插入)2 例(5.7%)、3 bp 缺失 1 例(2.9%)。测序提示存在突变的样本进一步送克隆测序,3 bp 缺失型未克隆成功。



1、2:野生型产物。3、5、6、7:野生型及 52 bp 缺失型混合产物;4、8:野生型及 5 bp 插入型混合产物;9:DNA 分子标记物

图 1 部分样本 PCR 产物凝胶电泳结果

2.2 ET 患者临床特征及血液学疗效分析 JAK2V617F(+),CALR(+),JAK2V617F 及 CALR 双阴性患者分别设为 A、B、C 组,各组间性别比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。B 组 ET 患者,初诊时年龄常较其余两组年轻化,同时危险度分层相对较低($P < 0.05$)。经常规临床治疗后,较多的 A、B 组患者能获得不同程度血液学缓解,两者间差异无统计学意义($P > 0.05$),同时两组患者的总缓解率均较 C 组患者高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 患者临床特征及血液学缓解情况 (n)

项目	总体 (n=61)	A 组 (n=26)	B 组 (n=18)	C 组 (n=17)	P		
					A 组 vs. B 组	A 组 vs. C 组	B 组 vs. C 组
年龄(̄±s,岁)	55.33±15.81	58.23±15.03	46.22±14.72	60.53±15.81	0.041	0.386	0.025
性别					0.436	0.963	0.446
男	31	14	8	8			
女	30	12	10	9			
危险分层					0.033	0.542	0.038
低危组	23	9	9	5			
中危组	16	7	5	4			
高危组	22	10	4	8			
总缓解	48	22	15	11	0.732	0.033	0.025
低危组	21	9	7	5			
中危组	15	6	5	4			
高危组	12	7	3	2			
完全缓解	14	7	5	2			
低危组	6	3	2	1			
中危组	5	2	2	1			
高危组	3	2	1	0			
部分缓解	34	15	10	9			
低危组	15	6	5	4			
中危组	10	4	3	3			
高危组	9	5	2	2			

3 讨 论

ET 属于 BCR-ABL 阴性骨髓增殖性肿瘤(classic myeloproliferative neoplasm,MPN)范畴。导致 MPN 的恶性克隆复杂多样,其中 JAK2、CALR、MPL 基因突变被认为是 MPN 发病的使动因素,对 MPN 具有诊断意义。CALR 已被证实可对多种细胞功能(如蛋白质折叠、胞内钙离子浓度调控、细胞增殖、分化、凋亡等过程)造成影响^[5]。FALCHI 等^[6]、MELIKYAN 等^[7]的研究发现:ET 患者 CALR 基因突变常与更高的血小板计数、更低血栓事件及更好的总生存相关。

本研究发现 CALR 基因第 9 号外显子突变在 JAK2V617F 阴性的 ET 患者中检出率较高(18/35, 51.4%)。其中以 1 型(52 bp 缺失)最多见,占总突变 83.3%;其次为 2 型(5 bp 插入)占总突变 11.1%;与近期国内外相关研究结果相近^[8-9]。同时检出 1 例少见的 3 bp(AAG)缺失。相较于 JAK2V617F(+)及双阴性的 ET 患者,CALR(+)的 ET 患者初诊时年龄更小、危险度更低,其生存、预后判断受高龄伴随其他疾病所带来的影响可能相对较小。

联合羟基脲及干扰素的常规临床治疗方案能使较多的 JAK2V617F(+)及 CALR(+)患者获得完全或部分血液学缓解,相较于双阴性患者总缓解率更高,这得益于具有 JAK2 或 CALR 基因突变的患者相

较于双阴性患者对干扰素应答更佳。有研究表明单一的 JAK2V617F 突变^[10-11]或 CALR 突变^[12]的细胞对干扰素-α 可保持持久的敏感性。干扰素 α 治疗红细细胞增多症(PV)和 ET 的多年临床实践已证实可清除 JAK2V617F 突变造血干细胞,使患者获得完全分子生物学缓解,但部分患者停药后可在分子学水平复发^[13]。大多数患者仅能通过常规临床治疗获得部分血液学缓解,如何使更多患者获得完全、持续的血液学缓解甚至分子生物学缓解成为临床治疗的困难之处。

通过本次研究分析得出:CALR 基因 9 号外显子突变是 ET 患者重要分子遗传学标志之一,此突变影响患者对临床治疗的应答。检测 ET 患者 CALR 基因突变有助于提高对该类患者的临床诊断、预后判断及为设定更加个性化的治疗方案提供依据,为更多患者带来福音。

参考文献

[1] CHUZI S,STEIN B L. Essential thrombocythemia; a review of the clinical features, diagnostic challenges, and treatment modalities in the era of molecular discovery[J]. Leuk Lymphoma,2017,58(12):2786-2798.
 [2] OJEDA M J,BRAGÓS I M,CALVO K L, et al. CALR, JAK2 and MPL mutation status in Argentinean patients

- with BCR-ABL1-negative myeloproliferative neoplasms [J]. *Hematology*, 2017, 9(1):1-4.
- [3] THIELE J, KVASNICKA H M. The 2008 WHO diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis [J]. *Curr Hematol Malig Rep*, 2009, 4(1):33-40.
- [4] QUINTÁSCARDAMA A, KANTARJIAN H, MANSOURI T, et al. Pegylated interferon alfa-2a yields high rates of hematologic and molecular response in patients with advanced essential thrombocythemia and polycythemia vera [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(32):5418-5424.
- [5] WANG W A, GROENENDYK J, MICHALAK M. Calreticulin signaling in health and disease [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44:842-846.
- [6] FALCHI L, KANTARJIAN H M, VERSTOVSEK S. Assessing the thrombotic risk of patients with essential thrombocythemia in the genomic era [J]. *Leukemia*, 2017, 31(9):1845-1854.
- [7] MELIKYAN A L, SUBORTSEVA I N, SUDARIKOV A B. Clinical features of essential thrombocythemia and primary myelofibrosis, depending on the molecular characteristics of disease [J]. *Ter Arkh*, 2017, 89(7):4-9.
- [8] CLINTON A, MCMULLIN M F. The Calreticulin gene and myeloproliferative neoplasms [J]. *J Clin Pathol*, 2016, 69(10):841-845.
- [9] 汤琴, 张修文, 夏雷, 等. 慢性骨髓增殖性肿瘤患者钙网蛋白基因突变及其临床意义 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2017, 25(1):151-156.
- [10] LARSEN T S, MØLLER M B, STRICKER K, et al. Minimal residual disease and normalization of the bone marrow after long-term treatment with alpha-interferon2b in polycythemia vera. A report on molecular response patterns in seven patients in sustained complete hematological remission [J]. *Hematology*, 2009, 14(6):331-334.
- [11] SILVER R T, KILADJIAN J J, HASSELBALCH H C, et al. Interferon and the treatment of polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelo? brosis [J]. *Expert Rev Hematol*, 2013, 14(6):49-58.
- [12] CASSINAT B, VERGER E, KILADJIAN J J. Interferon Alfa Therapy in CALR-Mutated Essential Thrombocythemia [J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(2):188-189.
- [13] SILVER R T, KILADJIAN J J, HASSELBALCH H C. Interferon and the treatment of polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis [J]. *Expert Rev Hematol*, 2013, 6(1):49-58.

(收稿日期:2018-05-18 修回日期:2018-06-16)

(上接第 3754 页)

- Astrocytes mediated the nootropic and neurotrophic effects of Sarsasapogenin-AA13 via upregulating brain-derived neurotrophic factor [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(9):4015-4025.
- [5] 李金路, 谭莹, 衡新华. 丙泊酚对脑损伤大鼠认知功能及 BDNF 表达的影响 [J]. *昆明医科大学学报*, 2016, 37(8):30-34.
- [6] ZHU L, YANG L, ZHAO X, et al. Xanthoceraside modulates NR2B-containing NMDA receptors at synapses and rescues learning-memory deficits in APP/PS1 transgenic mice [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2018, 235(1):337-349.
- [7] SAFFARPOUR S, NASIRINEZHAD F. Functional interaction between N-methyl-D-aspartate receptor and ascorbic acid during neuropathic pain induced by chronic constriction injury of the sciatic nerve [J]. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 2017, 28(6):601-608.
- [8] 陈堃, 张志发, 廖明锋, 等. 低氧预处理减缓缺氧对大鼠海马突触功能抑制及其机制初探 [J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2017, 38(5):704-707.
- [9] JIANG S, FANG D F, CHEN Y. Involvement of N-methyl-D-aspartic acid receptor and DL- α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-Isloxazole propionic acid receptor in ginsenosides Rb1 and Rb3 against oxygen-glucose deprivation-induced injury in hippocampal slices from rat [J]. *Pharmacology*, 2018, 101(3/4):133-139.
- [10] KOZINN J, MAO L, ARORA A, et al. Inhibition of glutamatergic activation of extracellular signal-regulated protein kinases in hippocampal neurons by the intravenous anesthetic propofol [J]. *Anesthesiology*, 2006, 105(6):1182-1191.
- [11] SATO Y, KOBAYASHI E, MURAYAMA T, et al. Effect of N-methyl-D-aspartate receptor epsilon1 subunit gene disruption of the action of general anesthetic drugs in mice [J]. *Anesthesiology*, 2005, 102(3):557-561.
- [12] DREXLER B, JURD R, RUDOLPH U, et al. Distinct actions of etomidate and propofol at beta3-containing gamma-aminobutyric acid type A receptors [J]. *Neuropharmacology*, 2009, 57(4):446-455.
- [13] 段金旗, 马丽琼, 刘远林, 等. TERT 基因转染 BMSC 血管性痴呆大鼠记忆功能及海马 CA1 区突触可塑性的影响 [J]. *重庆医学*, 2017, 46(10):1300-1303, 1307.
- [14] 窦超, 张敏, 赵源征, 等. 甲状腺激素 T3 对大鼠脑缺血再灌注损伤后 NGF 和 BDNF 表达的影响研究 [J]. *重庆医学*, 2017, 46(15):2030-2033.
- [15] HUANG Y, LI Z, NAN G. Effect of hippocampal L-NBP on BDNF and TrkB expression and neurological function of vascular dementia rats [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(5):7673-7678.

(收稿日期:2018-05-18 修回日期:2018-06-26)