

干扰素- α 对骨髓增殖性肿瘤 JAK2V617F 基因表达的影响

庞 纓, 蔡晓东, 刘 凌, 周旭红, 叶 絮, 冯 莹
(广州医学院第二附属医院血液科, 广东 广州 510260)

摘 要:【目的】研究干扰素- α 在治疗骨髓增殖性肿瘤(MPN)中的疗效及对 JAK2V617F 基因表达的影响。【方法】分析 73 例应用干扰素- α 治疗超过 6 个月的 MPN 患者的临床资料及 JAK2V617F 基因表达,并与同期单用羟基脲治疗的 20 例 MPN 做对照。治疗前后采用 AS-PCR 方法检测 JAK2V617F 基因表达。【结果】干扰素- α 治疗组中真性红细胞增多症、原发性血小板增多症分别有 85.2%、87% 达到完全或部分缓解(与对照组单用羟基脲治疗比较, $P < 0.01$)。随访 1~6 年,56 例干扰素- α 治疗组的真性红细胞增多症、原发性血小板增多症 JAK2V617F 突变基因转阴率分别为 54%、41%,转阴患者 100% 达到临床及血液学完全缓解,而对照组无一例转阴。干扰素- α 治疗过程中的副作用主要表现为流感样症状,但均能耐受。【结论】干扰素- α 治疗 MPN 能取得很好的疗效及较好的耐受性,JAK2V617F 或可作为骨髓增殖性肿瘤患者能否达到分子生物学缓解的主要标志之一。

关键词: 骨髓增殖性肿瘤;干扰素- α ;JAK2V617F 基因

中图分类号: R552 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2011)03-0316-05

Effect of Interferon Alpha on JAK2V617F Gene Expression in Patients with Myeloproliferative Neoplasm

PANG Ying, CAI Xiao-dong, LIU Ling, ZHOU Xu-hong, YE Xu, FENG Ying

(Department of Hematology, The Second Affiliated Hospital, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510260, China)

Abstract: 【Objective】 To explore the therapeutic effect of interferon alpha (IFN- α) in patients with myeloproliferative neoplasm (MPN) as well as its effect on JAK2V617F gene expression. 【Methods】 In the present study, clinical data and JAK2V617F gene expression were evaluated in 73 cases of MPN patients who had been treated with IFN- α for more than 6 months, in comparison to the control group which consisted of 20 cases of MPN patients treated with hydroxyurea. The expression of JAK2V617F was evaluated before and after the treatment by AS-PCR method. 【Results】 After 6 months of IFN- α treatment, 85.2% of MPN patients with polycythemia vera and 87% of MPN patients with essential thrombocythemia achieved complete remission or partial remission. The difference is statistically significant in comparison to the results of the control group with hydroxyurea treatment ($P < 0.01$). In MPN patients presented with positive JAK2V617F gene expression, continuous treatment with IFN- α_1 for 1 to 6 years reversed the gene expression to negative in 54% (13/24) of the cases with polycythemia vera and 41% (13/32) of the cases with essential thrombocythemia. All of these cases with reversed gene expression remained complete remission. No reversion of JAK2V617F gene expression could be observed in the control group with hydroxyurea treatment. Although the major side effect of IFN- α was flu-like syndrome, all of the patients in this study could tolerate the therapy well. 【Conclusion】 In the present study, IFN- α has shown promising therapeutic response and patient tolerance in the management of MPN. JAK2V617F might be used as one of the important markers to evaluate whether MPN patients have been achieved molecular biologic remission.

Key words: myeloproliferative neoplasm; interferon- α ; JAK2V617F gene

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2011, 32(3):316-320]

在 2008 年新修订的 WHO 慢性髓系肿瘤分类中,骨髓增殖性疾病(myeloproliferative disorder, MPD)被骨髓增殖性肿瘤(myeloproliferative

neoplasm, MPN)一词所代替^[1],它是起源于造血干/祖细胞的恶性克隆性疾病,其特征是:骨髓一系或多系血细胞增殖,外周血出现过多的成熟或

收稿日期:2011-01-12

基金项目:广东省中医药管理局科研课题(2008363);广州市中医药科研立项课题(2008A54)

作者简介:庞纓,副主任医师,研究方向:血液病的诊断及治疗, E-mail: pylth@yahoo.com.cn

幼稚细胞,造血的祖细胞对细胞因子的敏感性增强。传统治疗骨髓增殖性肿瘤的方法多选用细胞毒性药物,如:羟基脲、马利兰及放射性磷等,然而,这些方法均有可能促使疾病向白血病转化。近年来,干扰素(IFN- α)治疗骨髓增殖性肿瘤的有效性已日益引起人们的重视。我科应用干扰素- α 治疗骨髓增殖性肿瘤,并通过长期的临床观察,发现获得较好的疗效,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 病人资料

所有骨髓增殖性肿瘤病例均来自我院 2004 年 9 月至 2010 年 10 月间诊治患者,符合 MPD/MPN 诊断标准^[2],共 93 例,其中接受干扰素- α 治疗半年以上的有 73 例(男 27 例,女 46 例),就诊时中位年龄 52 岁(19 ~ 82 岁),其中真性红细胞增多症 27 例,原发性血小板增多症 46 例。对照组 20 例骨髓增殖性肿瘤患者单用传统的羟基脲治疗,其中真性红细胞增多症 8 例(男性 3 例,女性 5 例,中位年龄 54 岁),原发性血小板增多症 12 例(男性 4 例,女性 8 例,中位年龄 56 岁)。

1.2 方 法

1.2.1 治疗前处理 白细胞 $> 50 \times 10^9/L$ 、血红蛋白 $> 200 g/L$ 、血小板 $> 1\,000 \times 10^9/L$ 的患者先经过百特 CS-3000 plus 血细胞分离机作相应的血细胞去除 1 ~ 2 次,使得患者外周血白细胞 $< 50 \times 10^9/L$ 、血红蛋白 $< 180 g/L$ 、血小板 $< 800 \times 10^9/L$ 以下后,再进行干扰素- α 或羟基脲治疗。

1.2.2 治疗方案 干扰素组:73 例骨髓增殖性肿瘤患者接受干扰素- α (甘若能,1800 万单位/支,先灵保雅公司生产)治疗半年以上。具体方案如下:开始每周 2 ~ 3 次,每次 300 万单位,皮下注射,3 个月根据血象及临床表现,逐步减量至每周 1 ~ 2 次。真性红细胞增多症和原发性血小板增多症患者治疗早期均加用小剂量羟基脲(0.25 ~ 0.5 g/d)、小剂量的阿司匹林(100 mg/d)和活血化瘀药物,完全缓解后减量甚至停药。每周查血常规,必要时复查骨髓。羟基脲组:羟基脲(0.5 ~ 2.0 mg/d),以控制血象至正常为目标,同时加用小剂量的阿司匹林(100 mg/d)和活血化瘀药物。

1.2.3 疗效判定标准 完全缓解判断标准:临床表现及血细胞计数(包括白细胞、红细胞、血红蛋

白、血小板)恢复正常;部分缓解判断标准:血细胞计数较治疗前下降 50%,临床表现有所减轻;治疗无效判断标准:达不到部分缓解者。

1.2.4 JAK2V617F 突变基因检测 治疗前对骨髓增殖性肿瘤患者采用 AS-PCR 方法检测 JAK2-V617F 突变情况^[3]。①基因组 DNA 制备:抽取患者和正常对照外周血 5 mL,按酚-氯仿法提取白细胞基因组 DNA。用紫外分光光度仪检测 DNA 的浓度和纯度,取吸光度 $D(260)/D(280)$ 介于 1.6 ~ 1.8 的标本,DNA 终浓度 50 ~ 100 mg/L,置于 -80℃ 冰箱冻存储备用。②PCR 扩增:采用 AS-PCR 法,设计 2 条正义引物 F1、F2 和一条反义引物 R,引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。F1 在野生型和突变型 DNA 中均可出现,作为内参照以保证反应的精确度;F2 为突变特异性引物,跨越 G-T 突变位点。F1 序列为:5'-ATCTATAGTCA TGCTGAAAGTAGGAGAAAG-3';F2 序列为:5'-AGCATTGTTGTTTTAAATTATGGAGTATATT-3';R 序列为:5'-CTGAATAGTCCTACAGTGTTCAGTTT CA-3'。反应体系为:模板 DNA 2 μ L,反义引物 R 1.0 μ mol/L,正义引物 F1 0.5 μ mol/L,F2 0.5 μ mol/L,10 \times PCR Buffer 5 L,MgCl₂ 1.2 mmol/L,dNTP 各 2 mmol/L,TaqDNA 聚合酶 2.5 U(广州莱德尔生物科技有限公司),去离子水 25.5 μ L。反应条件:94℃ 预变性 11 min,94℃ 变性 30 s,55℃ 30 s,72℃ 30 s,循环 36 次,72℃ 延伸 6 min。③琼脂糖凝胶电泳:取 5 μ L PCR 产物经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳后紫外光透视仪分析图像、摄像并保存结果。出现 364 bp 产物为野生型,出现 364 bp 和 243 bp 2 条产物为突变型(图 1)。

对治疗前 JAK2-V617F 突变阳性患者,在接受干扰素- α 或羟基脲治疗后复查,比较两组 JAK2-V617F 转阴效果。

1.3 统计学处理

计量数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 13.0 软件分析数据。组间比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组治疗中并发症的发生率比较

真性红细胞增多症患者接受干扰素- α 治疗组在高血压、血栓形成及出血的发生率分别为

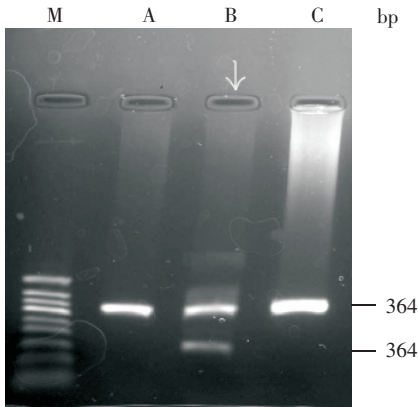


图 1 紫外光透视仪显示 JAK2 阳性表达
Fig.1 The picture in ultraviolet scenograph

Positive JAK2 was shown by the arrow. M:PCR Mark;A;C:wild type JAK2;B:variant JAK2

14.8%、18.5%及 6.5%，均明显低于羟基脲组的发生率(37.5%、50%和 25%)，($P < 0.01$)。原发性血小板增多症患者接受干扰素- α 治疗组在高血压、血栓形成及出血的发生率分别为 13.0%、17.4%及 8.7%，亦均低于羟基脲组的发生率(25%、33.3%和 33.3%； $P < 0.01$ ，见表 1)。

2.2 短期疗效

治疗 12 个月后，干扰素治疗组中，真性红细胞增多症患者里有 59.3%达到完全缓解，26.1%部分缓解，总缓解率为 85.1%；原发性血小板增多症患者里 25.9%达到完全缓解，39.1%达到部分缓解，总缓解率为 65.1%；而羟基脲治疗组里，真性

表 1 两组 MPN 患者治疗中主要临床表现及并发症发生率比较

Table 1 Comparison of the clinical symptoms and complications in MPN patients between IFN- α group and HU group during treatments (%)

	IHT		Thrombosis		Hemorrhage	
	IFN- α	HU	IFN- α	HU	IFN- α	HU
PV	14.8 ¹⁾	37.5	18.5 ¹⁾	50	6.5 ¹⁾	25
ET	13 ¹⁾	25	17.4 ¹⁾	33.3	8.7 ¹⁾	33.3

MPN:myeloproliferative neoplasm, IFN- α : interferon- α , HU: hydroxyurea, PV: polycythemia vera, ET: essential thrombocythemia, IHT: intractable hypertension
Compared with hydroxyurea group ¹⁾ $P < 0.01$

红细胞增多症和原发性血小板增多症总缓解率分别为 62.5%、57.2%，两组比较，差异有统计学意义($P < 0.01$)。干扰素治疗组中，真性红细胞增多症和原发性血小板增多症达到完全缓解平均时间分别为(3.5 \pm 1.7)月、(4.2 \pm 2.3)月，较羟基脲对照组(6.0 \pm 1.7)月、(8.0 \pm 1.9)月明显减少($P < 0.01$)，且完全缓解持续时间分别为(14 \pm 3.2)月和(28 \pm 5.6)月，也较羟基脲对照组(2 \pm 1.7)月和(3 \pm 1.9)月明显延长($P < 0.01$ ；表 2)。

2.3 干扰素- α 的长期疗效观察

干扰素治疗组中，最长维持时间为 6 年，最小维持剂量为每周 1 次，每次 200 万 U。真性红细胞增多症患者完全缓解的维持时间中位数为 14(4 ~ 28)个月；原发性血小板增多症组维持时间中位数为 32(5 ~ 60)个月(表 2)。

表 2 比较干扰素- α 和羟基脲治疗 MPN 的疗效

Table 2 Comparison of the treatment effects between INF- α group and Hydroxyurea group in MPN patients ($\bar{x} \pm s$)

Before treatment/case	After treatment									
			CR/case		PR/case		Time to CR/months		Time to keep CR/months	
	IFN- α	HU	IFN- α	HU	IFN- α	HU	IFN- α	HU	IFN- α	HU
PV	27	8	4 ¹⁾	2	7	3	3.5 \pm 1.7 ¹⁾	6 \pm 1.7	14 \pm 3.2 ¹⁾	2 \pm 1.7
ET	46	12	12 ¹⁾	2	18 ¹⁾	5	4.2 \pm 2.3 ¹⁾	8 \pm 1.9	28 \pm 5.6 ¹⁾	3 \pm 1.9

MPN:myeloproliferative neoplasm;PV:polycythemia vera;ET:essential thrombocythemia;IFN- α :interferon- α ;HU:hydroxyurea;CR: complete remission;PR: partial remission. Compared with hydroxyurea group, $P < 0.01$

2.4 JAK2V617F 突变基因转阴率比较

在接受干扰素- α 治疗 1 ~ 3 年后复查原来 JAK2V617F 突变基因阳性的 56 例患者，发现 JAK2V617F 突变基因在真性红细胞增多症的转阴率为 56%(13/24)、原发性血小板增多症转阴率为 41%(13/32)。所有 JAK2V617F 转阴的患者，其临

床表现及血细胞计数均达到完全缓解。而羟基脲治疗对照组原来 JAK2V617F 突变基因阳性的 10 例患者无一例转阴，其中 2 例血象正常外，余 8 例白细胞、红细胞计数、血红蛋白量及血小板均高于正常水平，未达到血液学完全缓解状态。

2.5 干扰素不良反应

流感样症状:48 例在首次注射干扰素后出现发热,体温波动在 37.5 ~ 39 °C,多在注射 4 ~ 6 h 后发生,注射 2 ~ 4 次后逐渐减轻至消失。有 56 例首次注射后分别出现不同程度的肌肉酸痛、疲乏、骨痛、体重下降、嗜睡、抑郁,应用解热镇痛剂(酚咖片,商品名:加合百服宁)可控制症状。有 2 例出现消化道反应,食欲下降、腹胀等,1 例出现脱发。

3 讨 论

对于骨髓增殖性肿瘤的治疗,传统的方法多是应用羟基脲、血细胞分离等降低血细胞数量,但多只能控制症状,不能从分子生物学效应中达到长期缓解治愈的疗效,同时长期应用羟基脲类烷化剂药物,一方面容易产生耐药,另一方面亦存在转化为白血病的风险。根据近年的研究,已证实 JAK2V617F 基因突变与骨髓增殖性肿瘤发病密切相关^[4],很快 JAK2V617F 抑制剂就开始进入了临床研究阶段^[5],但尚未广泛运用,小分子 JAK2 靶向药物治疗能否像伊马替尼治疗慢性粒细胞白血病一样成功,目前尚不清楚^[6-7]。

干扰素既往主要应用于治疗毛细胞白血病、多发性骨髓瘤,以及低度恶性的淋巴瘤、肾癌等实体瘤^[8],在骨髓增殖性疾病中可使部分慢性粒细胞白血病患者细胞遗传学获得完全缓解^[9],已有报道干扰素不但可诱导白血病细胞凋亡^[9],同时可以促进单克隆到多克隆转化,对骨髓增殖性肿瘤的治疗有一定的效果^[10]。

Larsen 等^[11]报道 7 例真性红细胞增多症患者接受干扰素治疗 4 ~ 30 个月后,JAK2V617F 呈非常低的表达,从而达到分子生物学缓解及长期的血液学缓解。Kiladjian 等^[12]亦报道 29 例真红患者用干扰素治疗 1 年后,有 26 例(89.6%) JAK2V617F 滴度明显减低,随着干扰素治疗时间的延长(12 个月、18 个月、24 个月及 36 个月),JAK2V617F 的表达从 45% 分别降至 22.5%, 17.5%, 5%, 7 例持续 6 ~ 18 个月无法检出 JAK2V617F。证明长期的干扰素治疗可使 JAK2V617F 的表达降低甚至消失,最终达到分子生物学完全缓解。

本文研究了近 6 年来接受干扰素- α 治疗的骨髓增殖性肿瘤病例,发现接受干扰素治疗的患者的临床缓解(包括完全缓解及部分缓解)率都达

到令人满意的结果,致完全缓解时间短,持续缓解时间长,且无一例转化为急性白血病。JAK2V617F 基因突变阳性的病例,接受长期的干扰素治疗后,相当部分的病例 JAK2V617F 基因定性转阴,这部分病例临床及血液学均为持续完全缓解,这与国外文献报道相仿^[10-12]。虽然本实验仅用了 PCR 方法作 JAK2V617F 的定性分析,但是只有在 JAK2V617F 滴度很低的患者才会在 PCR 呈阴性表达,因此我们的研究也证实长期的干扰素治疗有助于骨髓增殖性肿瘤分子生物学缓解。

既往影响干扰素在临床上应用的主要原因,一方面是不不良反应较大,患者难以长期坚持治疗。我院观察的 73 例患者,开始用量为每次 300 万单位皮下注射,每周 2 ~ 3 次,不良反应主要表现为刚开始用药时的流感样症状,经对症处理,其后均能长期耐受治疗。我们还发现早期应用干扰素,可及早控制及减少骨髓增殖性肿瘤并发症(如严重高血压、多部位的梗塞和内脏出血)的发生,从而减少了治疗其并发症的相关治疗费用。本研究同时发现有部分真性红细胞增多症及原发性血小板增多症患者,在干扰素治疗达到完全缓解后如停药,未作低剂量维持,容易在停药后复发,尤其是 JAK2V617F 基因定性检测尚未转阴的患者复发率明显增高,因而推断 JAK2V617F 基因是骨髓增殖性肿瘤患者能否达到分子生物学缓解的主要标志之一,可能是决定干扰素使用剂量及疗程的主要因素。

干扰素- α 在治疗骨髓增殖性肿瘤疗效确切,到达完全缓解时间短、维持完全缓解时间长、维持较低的原发性骨髓纤维化及转白血病的发病率,长期维持治疗,可以使患者获得很好的疗效,不易复发。

参考文献:

- [1] Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point of care diagnostic algorithms[J]. *Leukemia*, 2008, 22(1): 14-22.
- [2] 张之南,沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版,北京:科学出版社,2007: 87-91, 163-165, 181-183.
- [3] 刘凌,庞纓,周旭红,等. Jak2-V617F 突变初步研究[J]. *中外医疗*, 2010, 29(3): 19-23.
- [4] Lacout C, Pisani DF, Tulliez M, et al. JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD

- mimicking human PV with secondary myelofibrosis [J]. Blood, 2006, 108(5): 1652-1660.
- [5] Mesa RA. Ruxolitinib, a selective Jak1 and Jak2 inhibitor for the treatment of myeloproliferative neoplasms and psoriasis[J]. Drug, 2010, 13(6): 394-403.
- [6] Verstovsek S, Kantar JH, Mesa RA, et al. Safety and efficacy of INCB018424, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis [J]. N Engl J Med, 2010, 363 (12): 1117-1127.
- [7] Dawson MA, Curry JE, Barber K, et al. AT9283, a potent inhibitor of the Aurora kinases and JAK2, has therapeutic potential in myeloproliferative disorder [J]. Br J Haematol, 2010, 150(1): 46-57.
- [8] 李晓飞, 吴荣佩, 丘少鹏, 等. 肾癌根治术后 α -干扰素治疗的初步观察[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2003, 24(38): 105-107.
- [9] 黄云燕, 夏焱, 郭海霞, 等. 干扰素 α , 5-AZA-CdR 对白血病细胞 HL-60 和 K562 的作用[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2007, 28(3): 274-278.
- [10] Kiladjian JJ, Chomienne C, Fenaux P, et al. Interferon-alpha therapy in bcr-abl-negative myeloproliferative neoplasms[J]. Leukemia, 2008, 22(11): 1990-1998.
- [11] Larsen TS, Moller MB, Destricker 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.
- [12] Kiladjian JJ, Cassinat B, Chevret S, et al. Pegylated interferon-alfa-2a induces complete hematologic and molecular responses with low toxicity in polycythemia vera[J]. Blood, 2008, 112(8): 3065-3072.

(编辑 张恩健)

《中山大学学报(医学科学版)》被美国《剑桥科学文摘》(CSA)及其 ProQuest 数据库收录

据美国剑桥科学文摘(Cambridge Scientific Abstracts, CSA)社 ProQuest 数据库内容采集专家罗勃·诺思拉普(Rob Northrup)先生 2011 年 4 月 11 日信息,由中国高校科技期刊研究会及中国科学技术期刊编辑学会最新推荐的 24 种中国科技期刊中,有 14 种被其文摘 CSA 及 ProQuest 数据库接受收录,《中山大学学报(医学科学版)》榜上有名。本刊在其数据库的上网日期为 2011 年 4 月 31 日,其文摘刊发日期为 2011 年 7 月 10 日。据悉,CSA 是仅次于美国 SCI 和 EI 的权威国际性检索数据库,收录范围包括社会科学、人文艺术、自然科学、工程技术等各学科。

《中山大学学报(医学科学版)》编辑部