

骨髓纤维化患者 RAS 基因突变特征及其预后意义

吴君颖 李冰 贾玉娇 张培红 徐泽锋 秦铁军 曲士强 潘丽娟 刘晋琴
严欣 张喻堤 陈佳 龚婧晔 肖志坚

中国医学科学院血液病医院(中国医学科学院血液学研究所),实验血液学国家重点实验室,国家血液系统疾病临床医学研究中心,天津 300020

通信作者:肖志坚,Email:zjxiao@ihcams.ac.cn

【摘要】 目的 分析骨髓纤维化(MF)患者RAS基因突变的分子特征及其临床特点和预后意义。**方法** 收集2011年12月至2019年12月在我中心有二代基因测序数据的226例MF患者临床资料,回顾性分析RAS基因突变特征、与临床和实验室参数之间的关系,及对总生存(OS)期的影响。**结果** 226例原发性骨髓纤维化(PMF)及真性红细胞增多症(PV)或原发性血小板增多症(ET)后骨髓纤维化(post-PV/ET MF)患者中,共14例(6.2%)检出RAS基因突变:NRAS突变9例(4.0%),KRAS突变8例(3.5%),NRAS及KRAS突变并存3例(1.3%)。所有NRAS突变均发生在第12-13号密码子。RAS基因突变多为亚克隆突变,常与SETBP1、SRSF2、MPL共同发生。伴RAS基因异常患者平均突变基因个数(3.36个)与无RAS基因异常组(1.77个)相比,差异有统计学意义($P < 0.001$)。RAS基因突变患者与无突变患者相比,外周血单核细胞水平升高($P = 0.003$),血小板水平减低($P = 0.026$),骨髓原始细胞比例升高($P = 0.022$),脾脏肋缘下 ≥ 10 cm患者比例更高($P = 0.005$)。突变组患者非常高危(VHR)染色体核型比例(18.2%, 2/11)显著高于无突变组患者(2.3%, 3/133)($P = 0.031$)。单因素分析中, NRAS基因突变的MF患者及PMF患者的OS时间较无突变患者显著缩短($P = 0.001$, $P = 0.008$)。多因素分析显示, NRAS突变是影响OS的独立预后不良因素。**结论** RAS突变常与外周血单核细胞水平升高、血小板计数减低、骨髓原始细胞比例升高、VHR染色体核型等高危临床特征及实验室参数相关,多为发生在MF晚期的亚克隆突变。伴NRAS基因突变PMF及MF患者的OS时间显著缩短。

【关键词】 骨髓纤维化; RAS基因; 突变; 预后

基金项目:国家自然科学基金(81530008、81770129);北京协和医学院“中央高校基本科研业务费”项目(3332019093);中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2016-I2M-1-001);天津市自然科学基金(18JCZDJC34900、19JCQNJC09400)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2020.12.004

Genetic characteristics and prognostic values of RAS mutations in patients with myelofibrosis

Wu Junying, Li Bing, Jia Yujiao, Zhang Peihong, Xu Zefeng, Qin Tiejun, Qu Shiqiang, Pan Lijuan, Liu Jinqin, Yan Xin, Zhang Yudi, Chen Jia, Gong Jingye, Xiao Zhijian

State Key Laboratory of Experimental Hematology, National Clinical Research Center for Blood Diseases, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China

Corresponding author: Xiao Zhijian, Email: zjxiao@ihcams.ac.cn

【Abstract】 Objective To explore the genetic characteristics, clinical features, and prognostic values of RAS mutations in patients with myelofibrosis (MF). **Methods** We analyzed 112-gene targeted sequencing data from 226 patients who had a diagnosis of either primary myelofibrosis (PMF) or post-polycythemia vera/post-essential thrombocythemia (post-PV MF and post-ET MF) from December 2011 to December 2019. A retrospective analysis of the genetic characteristics, clinical features, and prognosis of RAS mutations was performed. **Results** Among 266 patients diagnosed PMF or post-PV/ET MF, RAS mutations were found in 14 (6.2%) cases, including 9 (4.0%) cases of NRAS mutations, 8 (3.5%) cases of KRAS mutations, and 3 (1.3%) cases of both NRAS and KRAS mutations. All of the NRAS mutations

were located in codons 12 and 13. The median VAFs of RAS mutations were significantly lower than those of the driver mutations, confirming that they represent sub-clonal events that are acquired during the disease course. SETBP1, SRSF2, and MPL tended to be clustered with RAS mutations. Patients with RAS mutations had a higher number of additional oncogenic mutations (median, 3.36 vs 1.17, $P < 0.001$). RAS mutations had a statistically significant association with elevated monocyte cell counts ($P = 0.003$), lower platelet counts ($P = 0.026$), higher bone marrow blasts ($P = 0.022$), splenomegaly ($P = 0.005$), and very high-risk (VHR) karyotype abnormality percentage ($P = 0.031$). In univariate analysis, the OS of patients with NRAS mutations were significantly inferior in the entire MF and PMF cohorts ($P = 0.001$, $P = 0.008$). In a multivariate model, NRAS retained an independent negative prognostic factor in PMF. **Conclusion** RAS gene mutations were constantly related to elevated monocyte cell counts, lower platelet counts, higher bone marrow blasts, and VHR karyotype abnormality percentage that usually defined high-risk disease and often occurred as sub-clonal events. NRAS mutation is an independent poor prognostic factor in PMF.

【Key words】 Myelofibrosis; RAS gene; Mutation; Prognosis

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81530008, 81770129); PUMC Youth Fund and Fundamental Research Funds for the Central Universities (3332019093); CAMS Initiative Fund for Medical Sciences (2016- I2M- 1- 001); Tianjin Key Natural Science Funds (18JCZDJC34900, 19JCQNJC09400)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2020.12.004

骨髓纤维化(MF)包括原发性骨髓纤维化(PMF)、真性红细胞增多症(PV)后骨髓纤维化(post-PV MF)和原发性血小板增多症后骨髓纤维化(post-ET MF)^[1]。除JAK2、CALR及MPL等驱动基因突变以外, MF尚有ASXL1、SRSF2、IDH1/2及EZH2等非驱动基因突变^[2]。最近有研究报道RAS基因突变的MF患者预后不良且白血病转化风险增高^[3]。本研究中,我们对226例MF患者进行回顾性分析,探讨RAS基因突变MF患者的分子学特征、与临床和实验室参数之间的关系及对总生存(OS)的影响。

病例与方法

1. 病例资料:2011年12月至2019年12月在中国医学科学院血液病医院MDS诊疗中心确诊并完成二代基因测序的MF患者共226例,男135例(59.7%),女91例(40.3%)。按2016年世界卫生组织(WHO)PMF诊断标准或骨髓增殖性肿瘤研究和治疗国际工作组(IWG-MRT)建议的post-PV MF或post-ET MF诊断标准^[4],其中PMF患者180例(79.6%),post-PV MF患者24例(10.6%),post-ET MF患者22例(9.7%)。定义从诊断到二代基因测序时间间隔 ≤ 6 个月的患者为新诊断患者,从诊断到二代基因测序时间间隔 > 6 个月的患者为诊断后测序患者^[3],其中新诊断患者151例(66.8%),诊断后测序患者75例(33.2%)。

144例(63.7%)患者靶向测序检测基因突变时有可分析的染色体核型结果,其中正常核型94例

(65.3%),异常核型50例(34.7%)。根据“两层”细胞遗传学危险度分层^[5],28例(19.4%)患者检出不良染色体核型。根据改良版的“三层”细胞遗传学危险度分层^[6]:非常高危(VHR)染色体核型5例(3.5%),不良染色体核型35例(24.3%),良好染色体核型104例(72.2%)。

共194例(85.8%)患者可追踪到治疗方案,54例(23.9%)接受芦可替尼或以芦可替尼为基础的治疗,4例(1.8%)接受造血干细胞移植,其他患者治疗药物包括促造血药物(糖皮质激素、雄激素及类似物、红细胞生成素)、免疫调节剂(沙利度胺或来那度胺)和降细胞治疗药物(羟基脲或干扰素),9例(4.0%)加速期患者接受了地西他滨或阿扎胞苷治疗。

2. 靶向测序检测基因突变:所有患者DNA样本来源于骨髓单个核细胞。使用PCR引物扩增目的基因组(涵盖112个血液肿瘤相关基因),富集后采用Ion Torrent半导体测序平台进行测序。平均基因覆盖率98.3%,平均测序深度1140 \times 。测序后原始数据利用CCDS、人类基因组数据库(HG19)、dbSNP(v138)、1000genomes、COSMIC、PolyPhen-2等数据库进行生物信息学分析,筛选致病性基因突变位点^[7-8]。

3. 基因突变时序分析:采用等位基因突变频率(VAF)对携带两种及以上突变的患者进行突变时序分析^[9]。同一患者存在1个以上突变时,VAF值显著高的突变被判定为主克隆,VAF值显著低的突变被判定为亚克隆,VAF值之间无显著差异时均被判

定为主克隆。

4. 随访:随访截止时间为2020年7月31日,随访资料来源于住院病例、门诊病例及电话随访记录。对随访期间死亡的病例,按照病例记录或与患者家属电话联系确认。中位随访时间为36(1~194)个月,失访患者共34例(15%)。OS期按患者在我院首次留取基因突变二代测序检测标本时间至死亡或随访截止日期计算。

5. 统计学处理:统计分析利用SPSS 25.0软件完成。非正态分布的计量资料采用Mann-Whitney *U*检验,数据以“中位数(范围)”表示,分类资料采用卡方检验或Fisher精确概率法进行差异性分析,突变时序分析采用皮尔森拟合优度检验^[10]。单因素分析采用Kaplan-Meier法绘制生存曲线和Log-rank检验,多因素分析采用Cox回归分析,双侧检验 *P* < 0.05为差异有统计学意义。应用Graphpad Prism 7.0及R 3.6.1制图。

结 果

一、RAS基因突变特征

1. RAS基因突变频率:226例MF患者中共14例(6.2%)检出NRAS/KRAS基因突变,其中NRAS突变9例(4.0%),KRAS突变8例(3.5%),

NRAS及KRAS突变并存3例(1.3%)。

NRAS/KRAS基因突变的PMF患者13例(7.2%),post-PV/ET MF患者中仅1例(4.2%),二者检出率差异无统计学意义。14例患者共检出4种NRAS突变及7种KRAS突变,均为错义突变。所有NRAS突变均发生在第12及13号密码子。13例伴NRAS/KRAS突变PMF患者的临床资料详见表1。

2. RAS基因突变负荷分析:NRAS突变VAF值中位数为16.6%(2.4%~27.5%),KRAS突变VAF值中位数为5.8%(2.1%~39.7%),远低于JAK2V617F(VAF值中位数45.5%)、CALR(VAF值中位数为40.0%)和MPL(VAF值中位数为50.0%)。对11例同时有NRAS/KRAS突变及其他基因突变的PMF患者各基因突变VAF值进行分析,NRAS/KRAS突变10例(90.9%)为亚克隆突变,1例(9.1%)为主克隆突变,提示RAS基因突变在PMF患者中为较晚发生的事件(图1、图2)。

3. RAS基因共突变特征:伴有NRAS/KRAS基因突变、无NRAS/KRAS基因突变患者携带平均基因突变数目分别为(3.36±1.01)个、(1.77±1.03)个(*P* < 0.001)。

MF患者中突变比例≥2%的基因突变有JAK2(62.1%)、ASXL1(30.0%)、CALR(15.4%)、TET2

表1 伴NRAS/KRAS基因突变骨髓纤维化患者临床资料

例号	性别	年龄	诊断	MIPSS70-plus 分级	染色体核型	基因	外显子	DNA序列 改变	氨基酸序列 改变	突变 类型	VAF (%)
1	女	49	PMF	中危	46,XX[15]	NRAS	Exon 2	35G→A	G12D	错义	18.7
2	男	62	PMF	高危	46,XY,add(12)(p13)[20]	NRAS	Exon 2	35G→A	G12D	错义	27.5
3	女	31	PMF	高危	46,XX,del(2)(q32),del(12)(p12)[1]/46,XX,del(12)(p12)[19]	NRAS	Exon2	35G→A	G12D	错义	19.9
4	女	48	PMF	极高危	46,XX,i(17)(q10)[13]/46,XX,?del(20)(q11.2q13.3)[2]/46,XX[5]	NRAS	Exon2	35G→T	G12V	错义	8.8
						NRAS	Exon2	35G→C	G12A	错义	26.8
						NRAS	Exon2	35G→A	G12D	错义	8.7
5	男	50	PMF	极高危	45,X,-Y[17]/46,XY[3]	NRAS	Exon2	38G→A	G13D	错义	2.9
						NRAS	Exon2	35G→A	G12D	错义	11.0
						KRAS	Exon3	182A→C	Q61P	错义	37.5
6	男	63	PMF	高危	46,XY[20]	NRAS	Exon2	35G→T	G12V	错义	2.4
						KRAS	Exon4	436G→C	A146P	错义	5.8
7	男	67	PMF		ND	KRAS	Exon2	34G→A	G12S	错义	2.6
8	女	64	PMF	中危	46,XX[20]	NRAS	Exon2	35G→T	G12V	错义	3.9
9	男	51	PMF	中危	46,XY[20]	KRAS	Exon4	436G→A	A146T	错义	21.2
10	男	51	PMF	低危	46,XY[14]	KRAS	Exon2	57G→T	L19F	错义	2.1
11	男	58	PMF	低危	46,XY[17]	KRAS	Exon2	34G→C	G12R	错义	11.9
						NRAS	Exon2	35G→A	G12D	错义	14.5
12	男	66	PMF	高危	46,XY[20]	KRAS	Exon2	53C→A	A18D	错义	39.7
13	男	61	PMF		46,XY[4]	NRAS	Exon2	35G→A	G12D	错义	3.2
14	男	72	post-PV MF		46,XY[1]	KRAS	Exon2	34G→A	G12S	错义	6.6

注:VAF:等位基因突变频率;PMF:原发性骨髓纤维化;post-PV MF:真性红细胞增多症后骨髓纤维化;ND:无数据

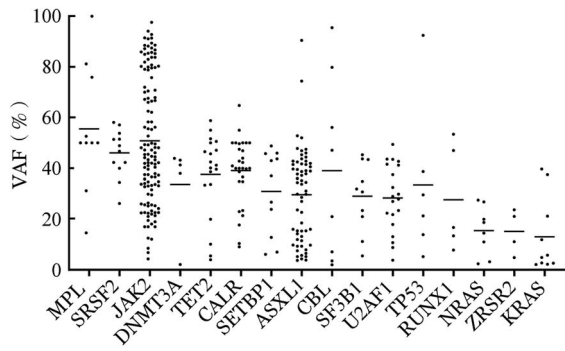


图1 骨髓纤维化患者各突变基因等位基因突变频率(VAF)比较

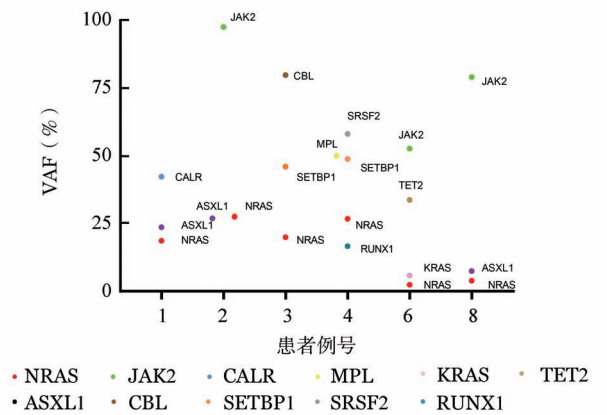


图2 除NRAS/KRAS以外突变个数大于2的部分患者各基因等位基因突变频率(VAF)分布

(10.1%)、U2AF1(8.8%)、SRSF2(5.7%)、SETBP1(5.3%)、MPL(4.4%)、CBL(4.4%)、SF3B1(4.4%)、TP53(3.1%)、RUNX1(3.1%)、DNMT3A(2.2%)和ZRSR2(2.2%)(图3)。141例(62.4%)患者至少伴有一个致病非驱动基因突变,PMF患者较常见(>5%)的非驱动基因突变有ASXL1(32.8%)、

U2AF1(11.1%)、TET2(9.4%)、SRSF2(7.2%)和SETBP1(6.7%);post-PV/ET MF患者较常见的非驱动基因突变为ASXL1(23.9%)和TET2(15.2%),未检出U2AF1基因突变。NRAS/KRAS基因突变与SETBP1($P=0.03$)、SRSF2($P=0.037$)、MPL($P=0.017$)共同发生。NRAS突变与SETBP1突变($P=0.008$)呈正相关。

二、RAS基因突变与临床和实验室参数相关性分析

NRAS/KRAS基因突变组与无突变组相比,外周血单核细胞水平升高($P=0.003$)、血小板水平减低($P=0.026$)、骨髓原始细胞比例升高($P=0.022$)、脾脏肋缘下 ≥ 10 cm患者比例更高($P=0.005$)和VHR染色体核型发生率升高($P=0.031$),差异均有统计学意义(表2)。

由于本队列中NRAS/KRAS突变的post-PV/ET MF患者仅有1例,故未能进行统计比较。NRAS/KRAS基因突变组与无突变组的PMF患者临床和实验室参数比较详见表3。NRAS/KRAS突变的PMF患者与无突变组相比,外周血单核细胞水平升高($P=0.001$)、骨髓原始细胞比例升高($P=0.014$)和脾脏肋缘下 ≥ 10 cm患者比例更高($P=0.002$)。按照年龄 ≤ 70 岁人群的基于突变和染色体核型改进的国际预后积分系统(MIPSS70-plus)^[11]对PMF患者进行预后分组,NRAS/KRAS突变组、无突变组高危及极高危患者比例分别为53.8%、31.1%($P=0.505$)。

三、RAS基因突变对OS的影响

截至2020年7月31日,随访患者中死亡65例

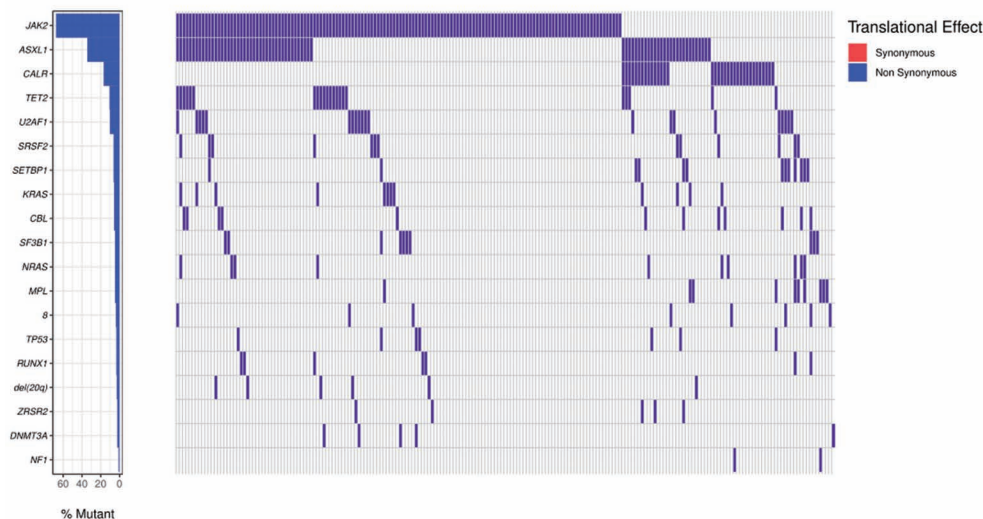


图3 226例骨髓纤维化患者基因突变谱系

(28.8%), NRAS/KRAS 突变患者死亡 6 例(42.9%), NRAS 突变组 5 例(55.6%), KRAS 突变组 1 例(12.5%), 无 RAS 突变组 59 例(27.8%)。NRAS/KRAS 突变组患者中位 OS 时间为 80.0(95% CI 0~188.5)个月, NRAS 突变组中位 OS 时间为 6(95% CI 3.4~8.5)个月, KRAS 突变组未达到, 无 NRAS/KRAS 突变组中位 OS 时间为 144.0(95% CI 48.8~239.1)个月。

伴 NRAS/KRAS 突变的 MF 患者及 PMF 患者 OS 时间较无突变患者缩短($P=0.026$, $P=0.018$), NRAS 突变的 MF 患者及 PMF 患者 OS 时间较无突变患者显著缩短($P=0.001$, $P=0.008$), KRAS 突变对 MF 患者及 PMF 患者预后无影响($P>0.05$)。对 PMF 患者中突变频率 $\geq 2\%$ 的基因分别进行 Log-rank 检验, 除 NRAS 突变外, 还有 ASXL1、DNMT3A、SRSF2 突变与更短的 OS 显著相关($P<0.05$), SF3B1 突变及 U2AF1 突变患者的 OS 时间有缩短的趋势($P=0.082$, $P=0.093$)。

单因素分析显示, HGB < 100 g/L、PLT $< 100 \times 10^9$ /L、外周血原始细胞比例 $\geq 1\%$ 、不良染色体核型是影响预后的不良因素。将单因素分析中 $P<0.1$ 的因素纳入 COX 回归进行多因素分析, 结果显示 NRAS 突变是独立的预后不良因素($HR=0.120$, 95% CI 0.010~0.286, $P<0.001$)。其他独立不良 OS 因素包括: DNMT3A 基因突变($HR=0.053$, 95% CI 0.001~0.101, $P=0.001$)、HGB < 100 g/L($HR=2.377$, 95% CI 1.012~5.583, $P=0.047$)。

讨 论

MF 患者 NRAS/KRAS 基因突变检出率约为 5%^[3, 12-14]。本研究中 MF 患者 NRAS/KRAS 基因突变检出率为 6.2%, NRAS 突变检出率为 4.0%, KRAS 检出率为 3.5%, NRAS/KRAS 突变位点均为错义突变, NRAS 突变位点为第 12 和第 13 号密码子, 最常见的为 NRAS G12D 和 NRAS G12V, 与文献[3, 12]报道基本一致。尽管有研究报道 NRAS/

表2 有、无 NRAS/KRAS 基因突变骨髓纤维化患者的临床及实验室特征比较

指标	NRAS/KRAS 基因突变 (14 例)	无 NRAS/KRAS 突变 (212 例)	统计量	P 值
年龄[岁, M(范围)]	59.5(31~72)	56(13~86)	-0.410	0.682
诊断[例(%)]			1.163	0.674
PMF	13(92.9)	167(78.4)		
post-ET MF	0(0)	22(10.4)		
post-PV MF	1(7.1)	23(10.8)		
性别[例(%)]			0.849	0.413
男	10(71.4)	125(59.0)		
女	4(28.6)	87(41.0)		
HGB[g/L, M(范围)]	91(57~208)	98(34~192)	-0.587	0.557
WBC[$\times 10^9$ /L, M(范围)]	7.47(3.12~39.93)	7.31(0.90~123.27)	-0.599	0.549
PLT[$\times 10^9$ /L, M(范围)]	80(9~715)	190(1~1921)	-2.224	0.026
ANC[$\times 10^9$ /L, M(范围)]	3.97(1.14~35.79)	4.43(0.17~57.20)	-0.937	0.349
单核细胞绝对计数[$\times 10^9$ /L, M(范围)]	0.99(0.12~8.93)	0.39(0.02~73.70)	-2.939	0.003
外周血原始细胞比例[% , M(范围)]	0(0~34)	0(0~30)	-1.412	0.158
骨髓原始细胞比例[% , M(范围)]	2.5(0~25)	0.5(0~70)	-2.298	0.022
脾脏左肋缘下 ≥ 10 cm[例(%)]	9(75.0)	66(32.8)	8.825	0.005
有体质性症状[例(%)]	2(14.3)	51(24.1)	0.698	0.529
输血依赖[例(%)]	2(15.4)	29(15.8)	0.001	1.000
LDH[U/L, M(范围)]	578.4(348.7~1912.2)	468.0(38.0~3362.0)	-1.745	0.081
染色体核型[例(%)]			6.071	0.031
良好核型	8(72.7)	96(72.2)		
不良核型	1(9.1)	34(25.6)		
非常高危	2(18.2)	3(2.3)		
JAK-STAT 驱动基因突变[例(%)]			8.864	0.036
JAK2	6(42.9)	135(63.7)		
CALR	3(21.4)	33(15.6)		
MPL	3(21.4)	7(3.3)		
三阴性	2(14.3)	37(17.5)		

注: PMF: 原发性骨髓纤维化; post-PV MF: 真性红细胞增多症后骨髓纤维化; post-ET MF: 原发性血小板增多症后骨髓纤维化。三阴性: 未检测到 JAK2、MPL 和 CALR 基因突变

表 3 有、无 NRAS/KRAS 基因突变原发性骨髓纤维化患者临床和实验室参数比较

指标	NRAS/KRAS 基因突变组 (13 例)	无 NRAS/KRAS 突变组 (167 例)	统计量	P 值
年龄[岁, M(范围)]	58(31 ~ 67)	55(21 ~ 86)	-0.100	0.921
性别[例(%)]			0.339	0.769
男	9(69.2)	102(61.1)		
女	4(30.8)	65(38.9)		
HGB[g/L, M(范围)]	88(57 ~ 129)	93(34 ~ 178)	-0.506	0.613
WBC[×10 ⁹ /L, M(范围)]	7.61(3.12 ~ 39.93)	6.97(0.90 ~ 123.27)	-1.050	0.294
PLT[×10 ⁹ /L, M(范围)]	70(9 ~ 715)	178(1 ~ 1921)	-1.790	0.073
ANC[×10 ⁹ /L, M(范围)]	4.39(1.14 ~ 35.79)	3.69(0.17 ~ 57.20)	-0.248	0.804
单核细胞绝对计数[×10 ⁹ /L, M(范围)]	1.02(0.36 ~ 8.93)	0.38(0.02 ~ 13.00)	-3.349	0.001
外周血原始细胞比例[% , M(范围)]	0(0 ~ 34)	0(0 ~ 30)	-1.338	0.181
骨髓原始细胞比例[% , M(范围)]	3(0 ~ 25)	1(0 ~ 70)	-2.462	0.014
脾脏左肋缘下≥10 cm[例(%)]	9(81.8)	53(34.0)	10.076	0.002
有体质性症状[例(%)]	2(15.4)	42(25.1)	0.623	0.738
输血依赖[例(%)]	2(16.7)	25(16.8)	0.000	1.000
LDH[U/L, M(范围)]	578.5(348.7 ~ 1912.2)	476.5(38.0 ~ 3362.0)	-1.618	0.106
染色体核型[例(%)]			5.168	0.055
良好	8(72.7)	76(71.7)		
不良	1(9.1)	27(25.5)		
非常高危	2(18.2)	3(2.8)		
JAK-STAT 驱动基因突变[例(%)]			9.537	0.027
JAK2	5(38.5)	99(59.3)		
CALR	3(23.1)	26(15.6)		
MPL	3(23.1)	5(3.0)		
三阴性	2(15.4)	37(22.2)		
MIPSS70-plus 分级[例(%)]			2.256	0.506
低危	2(18.2)	25(25.5)		
中危	2(18.2)	21(21.4)		
高危	4(36.4)	41(41.8)		
极高危	3(27.3)	11(11.2)		

注:三阴性:未检测到 JAK2、MPL 和 CALR 基因突变

KRAS 在 PMF 中较 post-PV/ET MF 更为常见^[12],但本研究未发现 NRAS/KRAS 检出率在两者中有统计学差异,可能与本研究样本量,特别是 post-PV/ET MF 患者数较少有关。

本研究中, NRAS/KRAS 基因突变的突变负荷远低于 JAK2、CALR、MPL、SRSF2、DNMT3A 及 TET2 等其他突变基因的突变负荷,突变时序结果提示 NRAS/KRAS 基因突变常为 MF 晚期发生的亚克隆突变。Santos 等^[3]及 Coltro 等^[12]发现在 MF 患者中, NRAS/KRAS 突变与 ASXL1、EZH2、SETBP1、SRSF2 等突变呈正相关,在本研究中, NRAS/KRAS 突变常与信号转导及转录因子相关基因突变同时发生,如 SETBP1、MPL 等,但未发现 NRAS/KRAS 突变与 ASXL1 突变呈正相关。此外,本研究中 NRAS/KRAS 突变患者无 TP53 突变者,这与先前的

研究结果类似^[3],揭示疾病的进展可能与多条通路相关。

既往研究显示 NRAS/KRAS 突变与血小板计数减低、骨髓原始细胞比例增高等高危临床实验室指标密切相关^[3],本研究验证了该结果。此外,我们发现 NRAS/KRAS 突变与 VHR 染色体核型、单核细胞水平升高及脾脏增大相关。生存分析显示 KRAS 突变对 PMF 患者预后无显著影响, NRAS 突变 PMF 患者中位 OS 时间明显短于非突变组,在纳入其他临床及实验室指标后, NRAS 突变仍为 PMF 患者独立的不良预后因素。因本研究病例数较少,无法评估 RAS 突变对 post-PV/ET MF 的预后价值。既往小鼠模型研究发现 NRAS 突变小鼠通过激活 ERK1/2 导致造血干细胞过度增殖及髓系分化偏倚,表现为白细胞及粒单核水平增高、脾大及发生髓系增殖性肿

瘤风险增高^[15-16],通过抑制MEK/ERK通路可抑制造血干细胞过度增殖及缩小脾脏体积^[16],为RAS突变PMF患者的治疗提供了新靶点。RAS通路突变患者对芦可替尼的治疗反应低于无突变患者^[12],未来可进一步探究在RAS突变的PMF患者中联合使用JAK2抑制剂及RAS/MEK/ERK通路抑制剂的可能性。

目前认为RAS通路突变为MF患者的不良预后因素^[3,12-13]。本研究结果表明,NRAS突变在单因素及多因素分析与更短的OS显著相关,KRAS突变对预后无影响。除NRAS突变外,多因素分析结果还表明DNMT3A突变是PMF患者独立的不良预后因素。作为表观遗传修饰相关基因,DNMT3A突变被认为可能与骨髓增殖性肿瘤患者白血病转化风险增高密切相关并提示预后不良^[17-19],其预后价值有待扩大样本量继续探索。

综上,本研究结果显示,MF患者NRAS突变主要类型为第12号密码子突变,NRAS/KRAS突变多为疾病晚期发生的分子事件。NRAS/KRAS突变患者外周血单核细胞水平升高、血小板计数减低、骨髓原始细胞比例升高、脾脏增大(≥肋缘下10cm)和VHR染色体核型发生率升高。NRAS突变在MF及PMF患者中提示预后不良。本组病例尚不能分析NRAS/KRAS异常对不同类型MF患者生存情况的影响以及对JAK2抑制剂治疗敏感性的影响,有待扩大病例数后进一步研究。

参考文献

- [1] 肖志坚. 我如何治疗原发性骨髓纤维化[J]. 中华血液学杂志, 2019, 40(3): 179-181. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.03.002.
- [2] 肖志坚. 骨髓增殖性肿瘤和骨髓增生异常综合征/骨髓增殖性肿瘤: 开启分子诊断新时代[J]. 中华血液学杂志, 2014, 35(5): 385-386. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2014.05.001.
- [3] Santos FPS, Getta B, Masarova L, et al. Prognostic impact of RAS-pathway mutations in patients with myelofibrosis [J]. Leukemia, 2020, 34(3): 799-810. DOI: 10.1038/s41375-019-0603-9.
- [4] 中华医学会血液学分会白血病淋巴瘤学组. 原发性骨髓纤维化诊断与治疗中国指南(2019年版)[J]. 中华血液学杂志, 2019, 40(1): 1-7. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.01.001.
- [5] Caramazza D, Begna KH, Gangat N, et al. Refined cytogenetic-risk categorization for overall and leukemia-free survival in primary myelofibrosis: a single center study of 433 patients [J]. Leukemia, 2011, 25(1): 82-88. DOI: 10.1038/leu.2010.234.
- [6] Tefferi A, Nicolosi M, Mudireddy M, et al. Revised cytogenetic risk stratification in primary myelofibrosis: analysis based on 1002 informative patients [J]. Leukemia, 2018, 32(5): 1189-1199. DOI: 10.1038/s41375-018-0018-z.
- [7] 李冰, 王静雅, 刘晋琴, 等. 靶向测序检测511例骨髓增生异常综合征患者基因突变[J]. 中华血液学杂志, 2017, 38(12): 1012-1016. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.12.002.
- [8] Li B, Liu J, Xu Z, et al. The usefulness of mutational data on prognosis of myelodysplastic syndromes: alone or incorporated into the IPSS-R? [J]. Br J Haematol, 2018, 183(5): 815-819. DOI: 10.1111/bjh.15036.
- [9] Li B, Liu J, Jia Y, et al. Clinical features and biological implications of different U2AF1 mutation types in myelodysplastic syndromes [J]. Genes Chromosomes Cancer, 2018, 57(2):80-88. DOI: 10.1002/gcc.22510.
- [10] Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes [J]. Blood, 2013, 122(22): 3616-3627. DOI: 10.1182/blood-2013-08-518886.
- [11] Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, et al. MIPSS70: Mutation-Enhanced International Prognostic Score System for Transplantation-Age Patients With Primary Myelofibrosis [J]. J Clin Oncol, 2018, 36(4):310-318. DOI: 10.1200/JCO.2017.76.4886.
- [12] Coltro G, Rotunno G, Mannelli L, et al. RAS/CBL mutations predict resistance to JAK inhibitors in myelofibrosis and are associated with poor prognostic features [J]. Blood Adv, 2020, 4(15):3677-3687. DOI: 10.1182/bloodadvances.2020002175.
- [13] Tenedini E, Bernardis I, Artusi V, et al. Targeted cancer exome sequencing reveals recurrent mutations in myeloproliferative neoplasms [J]. Leukemia, 2014, 28(5):1052-1059. DOI: 10.1038/leu.2013.302.
- [14] Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, et al. Targeted deep sequencing in primary myelofibrosis [J]. Blood Adv, 2016, 1(2): 105-111. DOI: 10.1182/bloodadvances.2016000208.
- [15] Wang JY, Liu YG, Tan LX, et al. Distinct requirements of hematopoietic stem cell activity and Nras G12D signaling in different cell types during leukemogenesis [J]. Cell Cycle, 2011, 10(17): 2836-2839. DOI: 10.4161/cc.10.17.17195.
- [16] Wang JY, Kong GY, Liu YG, et al. Nras^{G12D} promotes leukemogenesis by aberrantly regulating hematopoietic stem cell functions [J]. Blood, 2013, 121(26): 5203-5207. DOI: 10.1182/blood-2012-12-475863.
- [17] Grinfeld J, Nangalia J, Baxter EJ, et al. Classification and Personalized Prognosis in Myeloproliferative Neoplasms [J]. N Engl J Med, 2018, 379(15): 1416-1430. DOI: 10.1056/NEJMoa1716614.
- [18] Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms [J]. Blood, 2017, 129(6): 667-679. DOI: 10.1182/blood-2016-10-695940.
- [19] Tefferi A, Guglielmelli P, Nicolosi M, et al. GIPSS: genetically inspired prognostic scoring system for primary myelofibrosis [J]. Leukemia, 2018, 32(7): 1631-1642. DOI: 10.1038/s41375-018-0107-z.
- [20] Lasho TL, Finke CM, Hanson CA, et al. SF3B1 mutations in primary myelofibrosis: clinical, histopathology and genetic correlates among 155 patients [J]. Leukemia, 2012, 26(5): 1135-1137. DOI: 10.1038/leu.2011.320.

(收稿日期:2020-09-25)

(本文编辑:徐茂强)