

# 骨髓增殖性肿瘤患者巨核细胞病理特征及其与起始基因突变的相关性

史仲珣 张培红 李冰 方丽华 徐泽锋 秦铁军 刘晋琴 胡耐博 潘丽娟  
曲士强 刘丹 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 探讨骨髓增殖性肿瘤(MPN)巨核细胞病理特征及其与起始基因突变的相关性。方法 收集2012年2月至2017年10月于中国医学科学院血液病医院就诊的160例初诊MPN患者,根据世界卫生组织(WHO)2016年MPN诊断标准对患者骨髓活检组织切片进行重新评估。结果 160例患者中男72例(45.0%),女88例(55.0%),中位年龄59(13~87)岁。重新评估后真性红细胞增多症(PV)39例,原发性血小板增多症(ET)33例,纤维化前/早期原发性骨髓纤维化(pre-PMF)37例,明显期原发性骨髓纤维化(overt PMF)37例,真性红细胞增多症后骨髓纤维化(post-PV MF)2例,原发性血小板增多症后骨髓纤维化(post-ET MF)1例,MPN-未分类(MPN-U)11例。按PV、ET、pre-PMF及overt PMF疾病亚型顺序,密集成簇分布、少分叶核及裸核巨核细胞逐渐增加,红系增生程度正常及增高的比例逐渐降低,1级及以上网状纤维、胶原及骨硬化的比例逐渐升高。相关性分析示密集成簇分布、少分叶核及裸核巨核细胞占比与红系增生程度呈负相关,与粒系增生程度及纤维化程度呈正相关。对pre-PMF及overt PMF患者病理特征的相关性分析示密集成簇分布及裸核巨核细胞占比与纤维化程度呈正相关。JAK2V617F突变MPN患者红系增生程度明显增高( $P=0.022$ ),CALR突变MPN患者疏松成簇、密集成簇、骨小梁旁分布及裸核巨核细胞明显增多( $P=0.055$ ,  $P=0.002$ ,  $P=0.018$ ,  $P=0.008$ ),1级及以上网状纤维、胶原及骨硬化比例增高( $P=0.003$ ,  $P<0.001$ ,  $P=0.001$ )。伴JAK2V617F突变pre-PMF及overt PMF患者骨髓增生程度较高( $P=0.037$ ),伴CALR突变患者巨大体积及密集成簇分布巨核细胞明显增多( $P=0.059$ ,  $P=0.055$ ),1级及以上胶原及骨硬化的比例明显增高( $P=0.011$ ,  $P=0.046$ )。结论 不同亚型MPN患者骨髓巨核细胞病理改变特征各异,其病理异常特征与纤维化水平相关。CALR突变可能与巨核细胞病理异常特征及骨髓纤维化水平相关。

**【关键词】** 骨髓增殖性肿瘤; 巨核细胞; 组织病理学; 起始基因突变

**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);天津市科技计划项目(15ZXLCSY00010)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2020.10.002

## Pathological characteristics of megakaryocytes in myeloproliferative neoplasms and their correlation with driver gene mutations

Shi Zhongxun, Zhang Peihong, Li Bing, Fang Lihua, Xu Zefeng, Qin Tiejun, Liu Jinqin, Hu Naibo, Pan Lijuan, Qu Shiqiang, Liu Dan, 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 investigate the pathological characteristics of megakaryocytes in myeloproliferative neoplasms (MPN) and their correlations with driver gene mutations. **Methods** Trepchine specimens administered for 160 patients with MPN from February 2012 to October 2017 were reevaluated according to the World Health Organization (WHO)'s (2016) diagnostic criteria. **Results**

This cohort of patients included 72 (45.0%) men, with the median age of 59 (range, 13 – 87) years, comprising 39 with polycythemia vera (PV), 33 with essential thrombocythemia (ET), 37 with prefibrotic/early-primary myelofibrosis (pre-PMF), 37 with overt PMF, 1 with post-ET MF, 2 with post-PV MF, and 11 with MPN-unclassifiable (MPN-U) after the re-diagnosis. With PV, ET, pre-PMF, and overt PMF changes, proportions of dense clusters, hypolobulated nuclei, and naked nuclei of megakaryocytes gradually increased, whereas erythropoiesis gradually decreased. Proportions of reticulin, collagen, and osteosclerosis grades of  $\geq 1$  also increased. Dense clusters, hypolobulated nuclei, and naked nuclei of megakaryocytes were negatively correlated with erythropoiesis and positively correlated with granulopoiesis and fibrosis. In patients with pre- and overt PMF, dense clusters and naked nuclei of megakaryocytes were positively correlated with fibrosis. Patients with JAK2V617F MPN had significantly increased erythropoiesis ( $P = 0.022$ ). Patients with CALR-mutated MPN were characterized by increased loose and dense clusters; paratrabecular distribution and naked nuclei of megakaryocytes ( $P = 0.055$ ,  $P = 0.002$ ,  $P = 0.018$ ,  $P = 0.008$ ); and increased reticulin, collagen, and osteosclerosis ( $P = 0.003$ ,  $P < 0.001$ ,  $P = 0.001$ ). In patients with pre- and overt PMF, patients with JAK2V617F had increased cellularity ( $P = 0.037$ ). CALR-mutated patients had increased dense clusters and giant sizes of megakaryocytes, collagen, and osteosclerosis ( $P = 0.055$ ,  $P = 0.059$ ,  $P = 0.011$ ,  $P = 0.046$ ). **Conclusion** Megakaryocytes showed abnormal MPN morphology and distribution, which were related to fibrosis. CALR mutation was probably associated with abnormal morphology and distribution of megakaryocytes and fibrosis.

**【Key words】** Myeloproliferative neoplasms; Megakaryocyte; Histopathology; Driver gene mutations

**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 Science and Technology Project (15ZXLSY00010)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2020.10.002

骨髓增殖性肿瘤(MPN)是一组起源于造血干细胞的恶性克隆性疾病,其特征为一系或多系成熟髓系细胞过度增殖伴向急性髓系白血病转化风险增高<sup>[1]</sup>。世界卫生组织(WHO)2016年MPN诊断标准中经典的费城染色体阴性MPN包括真性红细胞增多症(PV)、原发性血小板增多症(ET)、纤维化前/早期原发性骨髓纤维化(pre-PMF)和明显期(overt)PMF。骨髓活检病理组织学在MPN诊断标准中从此前的次要诊断标准上升为主要诊断标准<sup>[2]</sup>,其中巨核细胞病理改变在各亚型的诊断与鉴别诊断中尤显重要<sup>[3-5]</sup>。本研究中,我们按照WHO(2016)MPN诊断标准中的病理特征描述并参考既往研究中MPN病理诊断的鉴别要点<sup>[5-7]</sup>,探讨我中心诊治的符合WHO(2008)标准的160例MPN患者的骨髓活检组织切片重新进行形态学评估,对不同亚型MPN的巨核细胞病理特征及其与起始基因JAK2、CALR、MPL突变的关系进行分析。

### 病例与方法

1. 病例:收集2012年2月至2017年10月在中国医学科学院血液病医院就诊的160例初诊MPN患者,其中男72例(45.0%),女88例(55.0%),中位年龄59(13~87)岁。纳入标准:①按照WHO

(2008)MPN诊断标准诊断为费城染色体阴性MPN;②有骨髓活检标本留存且取材满意(长度 $\geq 15$  mm,直径 $\geq 2$  mm)。所有骨髓组织取材于髂后上棘。

2. 病理制片与染色:使用石蜡包埋制片。具体方法:中性甲醛固定,2%硝酸脱钙,石蜡包埋切片,切片厚度3~4  $\mu\text{m}$ 。除行常规苏木精-伊红(HE)染色、Glemlsa及网状纤维(嗜银)染色外,另有核红细胞糖原(PAS)染色、氯乙酸AS-D萘酚酯酶染色(NCE)和普鲁士蓝染色(铁染色)等组织细胞化学染色,并用CD34和CD61单克隆抗体进行免疫组织细胞化学染色。

3. 骨髓活检组织切片形态学再分析及重新分型诊断:根据WHO(2016)诊断标准并参考既往研究<sup>[5-7]</sup>MPN的病理诊断鉴别要点制订组织病理形态学分析参数,包括以下7项:①年龄校正的造血细胞增生程度;②粒系增生情况:增生程度、是否有核左移;③红系增生情况:增生程度、是否有核左移;④粒/红(结合PAS和NCE染色)比值;⑤巨核系增生情况(增生程度、胞体大小、分布状况、细胞核形态);⑥WHO(2016)标准纤维分级(网状纤维分级,胶原分级和骨硬化分级);⑦是否有窦内造血细胞增生。综合各项组织病理形态学特征,结合其他临

床和实验室参数,按WHO(2016)标准<sup>[2]</sup>对患者进行重新分型诊断,其中PV 39例,ET 33例,pre-PMF 37例,overt PMF 37例,post-PV MF 2例,post-ET MF 1例,MPN-未分类(MPN-U)11例。重新评估后诊断较入组时的变化情况见表1。

4. JAK2、CALR及MPL基因突变检测:提取骨髓单个核细胞基因组DNA,应用PCR方法检测JAK2V617F基因突变,Sanger测序法检测CALR及MPL基因突变,具体方法参见文献[8-10]。

5. 统计学处理:非正态分布的连续性变量资料以“中位数(范围)”表示,组间比较采用Kruskal-Wallis检验或Mann-Whitney U检验;分类变量资料组间比较采用卡方检验或Fisher精确概率法;使用spearman相关分析对有序分类变量及非正态分布连续性变量进行相关性分析并采用Benjamini-Hochberg法对P值进行多重校正,双侧检验Q < 0.05为差异有统计学意义。其余检验方法双侧检验P < 0.05为差异有统计学意义。统计分析及绘图利用SPSS 25.0及R软件完成。

## 结 果

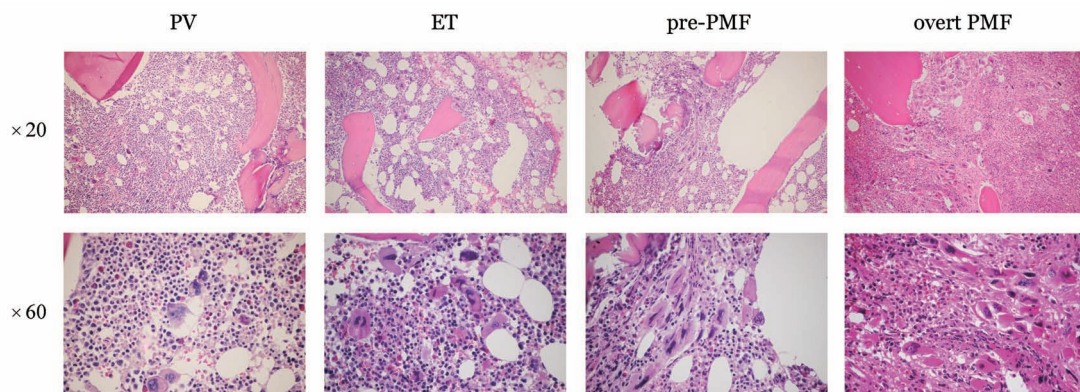
### 一、不同亚型MPN患者巨核细胞组织病理形态学特征及相关性分析

1. 不同亚型MPN患者巨核细胞组织病理形态学特征:不同亚型MPN患者组织病理形态学特征见图1、表2。按PV、ET、pre-PMF及overt PMF疾病亚型顺序,密集成簇分布、少分叶核及裸核巨核细胞占所有巨核细胞的百分比逐渐增加[密集成簇分布巨核细胞:0(0~20%)、0(0~30%)、10%(0~30%)、20%(0~50%),*P* < 0.001;少分叶核巨核细胞:10%(0~40%)、10%(0~40%)、30%(0~50%)、30%(10%~50%),*P* < 0.001;裸核巨核细胞:0(0~20%)、0(0~20%)、10%(0~20%)、10%(0~40%),*P* < 0.001];随机分布及正常核巨核细胞逐渐减少[随机分布巨核细胞:70%(30%~90%)、80%(30%~90%)、50%(20%~90%)、40%(10%~85%),*P* < 0.001;正常核巨核细胞:70%(20%~80%)、40%(20%~80%)、40%(20%~

表1 160例骨髓增殖性肿瘤(MPN)患者WHO(2008)诊断分型及WHO(2016)诊断分型的比较

WHO(2008)诊断	WHO(2016)诊断[例(%)]						
	PV	ET	Pre-PMF	PMF	MPN-U	post-PV MF	post-ET MF
PV	20(100.0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
ET	17(26.2)	33(50.8)	14(21.5)	1(1.5)	0(0)	0(0)	0(0)
Pre-PMF	1(11.1)	0(0)	8(88.9)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
overt PMF	1(2.0)	0(0)	14(27.5)	36(70.6)	0(0)	0(0)	0(0)
MPN-U	0(0)	0(0)	1(8.3)	0(0)	11(91.7)	0(0)	0(0)
post-PV MF	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	2(100.0)	0(0)
post-ET MF	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(100.0)

注:MPN-U:MPN-未分类;PV:真性红细胞增多症;ET:原发性血小板增多症;PMF:原发性骨髓纤维化;pre-PMF:纤维化前/早期原发性骨髓纤维化;overt PMF:明显期原发性骨髓纤维化;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



PV:真性红细胞增多症;ET:原发性血小板增多症;pre-PMF:纤维化前/早期原发性骨髓纤维化;overt PMF:明显期原发性骨髓纤维化

图1 骨髓增殖性肿瘤(MPN)患者典型骨髓活检组织病理形态学特征(HE染色)

表2 146例PV、ET、pre-PMF及overt PMF患者组织病理形态学特征比较

特征	PV(39例)	ET(33例)	pre-PMF(37例)	overt PMF(37例)	P值
骨髓增生程度[例(%)]					<0.001
<20%	0(0)	2(6.9)	1(2.7)	3(8.1)	
20%~39%	5(12.8)	10(30.3)	4(10.8)	6(16.2)	
40%~59%	9(23.1)	18(54.5)	17(45.9)	11(29.7)	
≥60%	25(64.1)	3(9.1)	15(40.5)	17(45.9)	
粒系增生程度[例(%)]					0.002
减低	3(7.7)	1(3.0)	0(0)	3(8.1)	
正常	14(35.9)	22(66.7)	7(18.9)	7(18.9)	
增高	22(56.4)	10(30.3)	30(81.1)	27(73.0)	
粒系核左移[例(%)]	17(43.6)	5(15.2)	13(35.1)	15(41.7)	0.052
红系增生程度[例(%)]					<0.001
减低	0(0)	0(0)	9(24.3)	15(40.5)	
正常	9(23.1)	27(81.8)	22(59.5)	16(43.2)	
增高	30(76.9)	6(18.2)	6(16.2)	6(16.2)	
红系核左移[例(%)]	16(41.0)	3(9.1)	9(24.3)	7(19.4)	0.014
粒红比[例(%)]					0.007
下降	20(51.3)	6(18.2)	4(10.8)	5(13.9)	
正常	12(30.8)	19(57.6)	6(16.2)	5(13.9)	
升高	7(17.9)	8(24.2)	27(73.0)	26(72.2)	
窦内造血细胞增生[例(%)]	28(73.7)	18(54.5)	30(83.3)	32(86.5)	0.010
巨核系增生程度[例(%)]					1.000
减低	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	
正常	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	
增高	39(100.0)	33(100.0)	37(100.0)	37(100.0)	
小体积巨核细胞[%,M(范围)]	50(20~60)	40(20~70)	50(40~60)	50(20~70)	<0.001
巨大体积巨核细胞[%,M(范围)]	50(40~80)	60(30~80)	50(40~60)	50(5~80)	<0.001
巨核细胞分布[%,M(范围)]					
随机分布	70(30~90)	80(30~90)	50(20~90)	40(10~85)	<0.001
疏松成簇分布	20(0~40)	10(0~40)	30(0~40)	30(5~50)	<0.001
密集成簇分布	0(0~20)	0(0~30)	10(0~30)	20(0~50)	<0.001
骨小梁旁分布	10(0~20)	10(0~20)	10(0~20)	10(0~40)	0.009
巨核细胞细胞核形态[%,M(范围)]					
正常核	70(20~80)	40(20~80)	40(20~80)	30(0~50)	<0.001
多分叶核	20(0~60)	40(20~60)	20(10~50)	30(0~70)	<0.001
少分叶核	10(0~40)	10(0~40)	30(0~50)	30(10~50)	<0.001
裸核	0(0~20)	0(0~20)	10(0~20)	10(0~40)	<0.001
网状纤维组织增生[例(%)]					<0.001
0级	23(59.0)	25(75.8)	6(16.2)	0(0)	
1级	16(41.0)	8(24.2)	31(83.8)	0(0)	
2级	0(0)	0(0)	0(0)	32(86.5)	
3级	0(0)	0(0)	0(0)	5(13.5)	
胶原纤维组织增生[例(%)]					<0.001
0级	39(100.0)	33(100.0)	34(91.9)	10(27.0)	
1级	0(0)	0(0)	3(8.1)	17(45.9)	
2级	0(0)	0(0)	0(0)	6(16.2)	
3级	0(0)	0(0)	0(0)	4(10.8)	
骨硬化[例(%)]					<0.001
0级	39(100.0)	33(100.0)	37(100.0)	19(51.4)	
1级	0(0)	0(0)	0(0)	9(24.3)	
2级	0(0)	0(0)	0(0)	3(8.1)	
3级	0(0)	0(0)	0(0)	6(16.2)	

注:PV:真性红细胞增多症;ET:原发性血小板增多症;pre-PMF:纤维化前/早期原发性骨髓纤维化;overt PMF:明显期原发性骨髓纤维化

80%)、30%(0~50%), $P<0.001$ ],同时伴有1级及以上网状纤维、胶原及骨硬化的比例逐渐升高(网状纤维:41.0%、24.2%、83.8%、100.0%, $P<0.001$ ;

胶原:0、0、8.1%、73.0%, $P<0.001$ ;骨硬化:0、0、0、48.6%, $P<0.001$ )以及红系增生程度正常及增高的比例逐渐降低(100%、100%、75.7%、59.5%,



网状纤维、胶原及骨硬化的比例明显增高( $P=0.003$ ,  $P<0.001$ ,  $P=0.001$ )(表3)。

3. 不同起始基因突变的pre-PMF及overt PMF患者组织病理形态学特征比较:74例pre-PMF及overt PMF患者中JAK2V617F突变37例(50.0%), CALR突变10例(13.5%),不同起始基因突变的pre-PMF及overt PMF患者的组织病理形态学特征见表4。JAK2V617F突变患者骨髓增生程度明显增高( $P=0.037$ )。CALR突变患者小体积巨核细胞明显减少( $P=0.018$ )而巨大体积巨核细胞明显增多( $P=0.059$ ),巨核细胞随机分布明显减少( $P=0.002$ )而密集成簇分布明显增多( $P=0.055$ ),1级及以上胶原及骨硬化的比例明显增高( $P=0.011$ ,  $P=0.046$ )。

## 讨 论

费城染色体阴性MPN的诊断需综合临床指标、分子学检测和组织病理形态学<sup>[2]</sup>。WHO(2016)MPN诊断标准对4种经典的费城染色体阴性MPN的病理诊断标准进行了修订<sup>[2]</sup>,其中巨核细胞病理改变是MPN重要的组织病理特征性异常及鉴别要点<sup>[4-6,11]</sup>。

各亚型MPN均存在不同特征的巨核细胞病理改变。PV患者表现为巨核系增生伴多形性成熟巨核细胞(细胞大小不等);ET患者表现为巨核细胞随机或疏松成簇分布、胞体大或巨大、核分叶过多(鹿角状);overt PMF及pre-PMF患者表现为巨核细胞成簇分布,特别是密集成簇分布增多,同时伴有核

表3 102例不同起始基因突变的PV、ET、pre-PMF及overt PMF患者组织病理形态学特征比较

特征	JAK2V617F突变(91例)	CALR突变(11例)	统计量	P值
骨髓增生程度[例(%)]			$z=306.0$	0.024
<20%	3(3.3)	2(18.2)		
20%~39%	14(15.4)	1(9.1)		
40%~59%	30(33.0)	7(63.6)		
≥60%	44(48.4)	1(9.1)		
粒系增生程度[例(%)]			$z=388.0$	0.156
减低	4(4.8)	2(18.2)		
正常	29(31.9)	4(36.4)		
增高	58(63.7)	5(45.5)		
红系增生程度[例(%)]			$z=305.5$	0.022
减低	11(13.1)	5(45.5)		
正常	44(48.4)	4(36.4)		
增高	36(39.6)	2(18.2)		
粒红比[例(%)]			$z=515.0$	0.814
下降	26(28.9)	3(27.3)		
正常	24(26.4)	2(18.2)		
升高	41(45.6)	6(54.5)		
窦内造血细胞增生[例(%)]	68(76.4)	11(100.0)	$\chi^2=3.285$	0.114
小体积巨核细胞[%,M(范围)]	50(20~70)	40(20~50)	$z=327.0$	0.039
巨大体积巨核细胞[%,M(范围)]	50(30~80)	60(5~80)	$z=647.0$	0.081
巨核细胞分布[%,M(范围)]				
随机分布	60(10~90)	30(10~90)	$z=178.5$	<0.001
疏松成簇分布	20(0~50)	30(10~50)	$z=673.0$	0.055
密集成簇分布	0(0~40)	20(0~50)	$z=761.5$	0.002
骨小梁旁分布	10(0~20)	10(0~40)	$z=663.5$	0.018
细胞核形态[%,M(范围)]				
正常核	40(0~80)	30(10~50)	$z=663.5$	0.035
多分叶核	25(10~60)	30(0~70)	$z=590.0$	0.314
少分叶核	20(0~50)	30(0~40)	$z=590.0$	0.595
裸核	0(0~40)	10(0~30)	$z=726.5$	0.008
纤维组织增生[例(%)]				
网状纤维≥1级	51(56.0)	11(100.0)	$\chi^2=13.260$	0.003
胶原≥1级	12(13.2)	8(72.7)	$\chi^2=19.498$	<0.001
骨硬化≥1级	8(8.8)	6(54.5)	$\chi^2=20.205$	0.001

注:PV:真性红细胞增多症;ET:原发性血小板增多症;pre-PMF:纤维化前/早期原发性骨髓纤维化;overt PMF:明显期原发性骨髓纤维化

表4 47例不同起始基因突变的纤维化前/早期原发性骨髓纤维化(pre-PMF)及明显期原发性骨髓纤维化(overt PMF)患者组织病理形态学特征比较

特征	JAK2V617F突变(37例)	CALR突变(10例)	P值
骨髓增生程度[例(%)]			0.037
<20%	2(5.4)	2(20.0)	
20%~39%	4(10.8)	1(10.0)	
40%~59%	12(32.4)	6(60.0)	
≥60%	19(51.4)	1(10.0)	
粒系增生程度[例(%)]			0.089
减低	1(2.7)	2(20.0)	
正常	5(13.5)	3(30.0)	
增高	31(83.8)	5(50.0)	
红系增生程度[例(%)]			0.310
减低	11(29.7)	5(50.0)	
正常	20(54.1)	4(40.0)	
增高	6(16.2)	1(10.0)	
粒红比[例(%)]			0.844
下降	5(13.5)	2(20.0)	
正常	4(10.8)	2(20.0)	
升高	28(75.7)	6(60.0)	
窦内造血细胞增生[例(%)]	29(78.4)	10(100.0)	0.315
小体积巨核细胞[%,M(范围)]	50(30~70)	40(20~50)	0.018
巨大体积巨核细胞[%,M(范围)]	50(30~70)	60(5~80)	0.059
巨核细胞分[%,M(范围)]			
随机分布	50(10~90)	25(10~50)	0.002
疏松成簇分布	30(0~40)	30(20~50)	0.221
密集成簇分布	10(0~40)	20(0~50)	0.055
骨小梁旁分布	10(0~20)	10(10~40)	0.231
巨核细胞细胞核形态[%,M(范围)]			
正常核	30(0~80)	30(10~50)	0.335
多分叶核	20(10~50)	30(0~70)	0.252
少分叶核	30(10~50)	30(10~40)	0.322
裸核	10(0~40)	10(0~30)	0.481
纤维组织增生[例(%)]			
网状纤维≥1级	33(89.2)	10(100.0)	0.562
胶原≥1级	12(32.4)	8(80.0)	0.011
骨硬化≥1级	8(21.6)	6(60.0)	0.046

分叶减少(云朵状)及裸核巨核细胞增多<sup>[2,5,12]</sup>。本研究中,pre-PMF及overt PMF患者巨核细胞密集成簇分布、少分叶核及裸核巨核细胞较PV及ET患者明显增多,符合文献<sup>[2,5,12]</sup>报道的MPN巨核细胞病理特征。同时,我们通过相关性分析发现巨核细胞异常病理特征与红系增生程度呈负相关,与粒系增生程度及纤维化水平呈正相关,对pre-PMF及overt PMF患者组织病理形态学特征的相关性分析进一步证实了密集成簇分布及裸核巨核细胞与纤维化程度相关。巨核细胞可通过分泌TGF-β等细胞因子参与骨髓纤维化的发生<sup>[13]</sup>,本研究从病理学角度证实了两者的相关性。目前关于引起巨核细胞异常病理特征的分子机制尚不清楚,通过探索引起巨核细胞异常病理特征的分子机制可能会为我们

寻找骨髓纤维化的发病机制提供线索。

JAK2、CALR及MPL突变作为起始基因突变参与了MPN的发生<sup>[14-16]</sup>,是MPN的主要诊断标准<sup>[2]</sup>。既往研究显示JAK2V617F阳性ET患者骨髓整体增生程度、红系及粒系增生程度较高<sup>[3,17]</sup>,CALR突变ET患者骨髓纤维化、巨核细胞密集成簇分布及核异常更常见<sup>[3]</sup>。本研究中,JAK2V617F突变MPN患者骨髓增生程度特别是红系增生程度较高,CALR突变MPN患者疏松及密集成簇分布、骨小梁旁分布及裸核巨核细胞增多,同时骨髓纤维化程度较高,与在ET患者中的报道<sup>[3,17]</sup>基本一致。此外,pre-PMF及overt PMF患者的组织病理形态学特征分析结果显示,在发生纤维化的患者中JAK2V617F及CALR突变患者病理特征依旧存在差异,CALR突变患者

巨核细胞病理异常更为明显并伴有更明显的胶原增生及骨硬化。既往小鼠模型研究发现CALR突变小鼠血小板水平增高,同时伴有巨核细胞异型性、成簇分布及骨髓纤维化<sup>[18]</sup>,因此,我们推测CALR基因突变可能参与了巨核细胞的异常发育及骨髓纤维化演进。

综上所述,本研究报道了不同亚型及分子学异常的费城染色体阴性MPN的巨核细胞病理改变特征。结果证实不同亚型MPN患者骨髓巨核细胞病理改变各异,密集成簇分布及裸核巨核细胞与纤维化水平升高相关。不同起始基因突变患者的组织病理形态学改变不同,CALR突变可能与巨核细胞异常病理特征及纤维化相关。探索引起巨核细胞异常病理特征的分子机制可能会为我们寻找骨髓纤维化的发病机制提供线索。

本研究也存在一定局限性:①本研究仅由一位血液病理学家进行了相关病理特征分析,由于组织病理形态学分析存在主观性,可重复性可能存在争议;②部分亚组病例数较少,如CALR突变患者仅纳入11例。因此,本研究结论尚需今后研究来加以进一步验证。

#### 参考文献

- [1] Spivak JL. Myeloproliferative Neoplasms [J]. N Engl J Med, 2017, 376(22): 2168-2181. DOI: 10.1056/NEJMra1406186.
- [2] Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia [J]. Blood, 2016, 127 (20): 2391-2405. DOI: 10.1182/blood-2016-03-643544.
- [3] Alvarez-Larrán A, Ancochea A, García M, et al. WHO-histological criteria for myeloproliferative neoplasms: reproducibility, diagnostic accuracy and correlation with gene mutations and clinical outcomes [J]. Br J Haematol, 2014, 166 (6): 911-919. DOI: 10.1111/bjh.12990.
- [4] Wilkins B, Erber WN, Bareford, D, et al. Bone marrow pathology in essential thrombocythemia: interobserver reliability and utility for identifying disease subtypes [J]. Blood, 2008, 111 (1): 60-70. DOI: 10.1182/blood-2007-05-091850.
- [5] Gianelli U, Bossi A, Cortinovis I, et al. Reproducibility of the WHO histological criteria for the diagnosis of Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms [J]. Mod Pathol, 2014, 27 (6): 814-822. DOI: 10.1038/modpathol.2013.196.
- [6] Thiele J, Kvasnicka HM, Müllauer L, et al. Essential thrombocythemia versus early primary myelofibrosis: a multicenter study to validate the WHO classification [J]. Blood, 2011, 117 (21): 5710-5718. DOI: 10.1182/blood-2010-07-293761.
- [7] Barbui T, Thiele J, Gisslinger H, et al. Masked polycythemia vera (mPV): results of an international study [J]. Am J Hematol, 2014, 89 (1): 52-54. DOI: 10.1002/ajh.23585.
- [8] Xiao ZJ, Zhang Y, Li Y, et al. The Janus kinase 2 (JAK2) V617F mutation in Chinese patients with chronic myeloproliferative disorders [J]. Haematologica, 2008, 93 (5): 787-788. DOI: 10.3324/haematol.12337.
- [9] Li B, Xu JQ, Wang JY, et al. Calreticulin mutations in Chinese with primary myelofibrosis [J]. Haematologica, 2014, 99 (11): 1697-1700. DOI: 10.3324/haematol.2014.109249.
- [10] 徐泽锋, 李冰, 刘晋琴, 等. JAK2、MPL和CALR基因突变在中国原发性骨髓纤维化患者中的预后意义 [J]. 中华血液学杂志, 2016, 37 (7): 576-580. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2016.07.007.
- [11] Kvasnicka HM, Orazi A, Thiele J, et al. European LeukemiaNet study on the reproducibility of bone marrow features in masked polycythemia vera and differentiation from essential thrombocythemia [J]. Am J Hematol, 2017, 92 (10): 1062-1067. DOI: 10.1002/ajh.24837.
- [12] Thiele J, Kvasnicka HM, Müllauer L, et al. Essential thrombocythemia versus early primary myelofibrosis: a multicenter study to validate the WHO classification [J]. Blood, 2011, 117 (21): 5710-5718. DOI: 10.1182/blood-2010-07-293761.
- [13] Ciurea SO, Merchant D, Mahmud N, et al. Pivotal contributions of megakaryocytes to the biology of idiopathic myelofibrosis [J]. Blood, 2007, 110 (3): 986-993. DOI: 10.1182/blood-2006-12-064626.
- [14] 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. DOI: 10.1056/NEJMoa051113.
- [15] Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2 [J]. N Engl J Med, 2013, 369 (25): 2391-2405. DOI: 10.1056/NEJMoa1312542.
- [16] Pikman Y, Lee BH, Mercher T, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia [J]. PLoS medicine, 2006, 3 (7): e270. DOI: 10.1371/journal.pmed.0030270.
- [17] Campbell PJ, Scott LM, Buck G, et al. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study [J]. Lancet, 2005, 366 (9501): 1945-1953. DOI: 10.1016/s0140-6736(05)67785-9.
- [18] Juan Li, Prins D, Park HJ, et al. Mutant calreticulin knockin mice develop thrombocytosis and myelofibrosis without a stem cell self-renewal advantage [J]. Blood, 2018, 131 (6): 649-661. DOI: 10.1182/blood-2017-09-806356.

(收稿日期:2020-05-06)

(本文编辑:徐茂强)