

MGB Taqman 探针法定量检测 415 例骨髓增殖性肿瘤患者 JAK2 V617F 突变负荷及其临床相关性研究

刘玉泉 刘传芳 何娜 王敏 张新秀 唐东一 纪春岩 马道新

【摘要】 目的 探讨 JAK2 V617F 突变负荷与骨髓增殖性肿瘤(MPN)的关系。方法 对 415 例 MPN 患者的临床资料进行回顾性研究,应用 MGB Taqman 探针 PCR 方法定量检测 JAK2 V617F 突变负荷,分析突变负荷与患者临床及实验室特征之间的相关性。**结果** 415 例 MPN 患者中共检出 236 例(56.9%)JAK2 V617F 突变阳性,其中 109 例真性红细胞增多症(PV)检出 91 例(83.5%),143 例原发性血小板增多症(ET)检出 80 例(55.9%),74 例原发性骨髓纤维化(PMF)检出 31 例(41.9%),51 例 MPN 不能分类(MPN-U)检出 33 例(64.7%),1 例慢性中性粒细胞白血病(CNL)为纯合突变,4 例高嗜酸粒细胞增多症(HES)和 33 例慢性髓性白血病(CML)未发现突变。236 例 JAK2 V617F 突变阳性患者中 12 例为纯合突变(其中 PV、MPN-U 各 4 例,PMF 2 例,ET、CNL 各 1 例)。JAK2 V617F 突变以低突变负荷(突变负荷<50%)为主(68.8%)。突变负荷以 PV 组最大,PMF 次之,ET 最小。PV 患者年龄、WBC 与突变负荷呈正相关;ET 患者 WBC 与突变负荷呈正相关;PMF 患者 WBC、HGB、PLT 与 JAK2 V617F 突变负荷均呈正相关。突变负荷与 MPN 其他临床参数无明显相关性。**结论** JAK2 V617F 突变负荷从高到低依次为 PV、PMF 和 ET,突变状态以杂合突变为主,突变负荷随患者年龄、血红蛋白水平、白细胞及血小板计数升高而增加。

【关键词】 基因,JAK2; 突变; 骨髓增殖性肿瘤

JAK2 V617F mutation burden and its clinical implications in 415 patients with myeloproliferative neoplasm Liu Yuquan, Liu Chuanfang, He Na, Wang Min, Zhang Xinxiu, Tang Dongyi, Ji Chunyan, Ma Daoxin*. *Department of Hematology, Qilu Hospital, Shandong University, Ji'nan 250012, China*
Corresponding author: Ma Daoxin, Email: daoxinma@sdu.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To detect JAK2 V617F mutation burden and its clinical implications in patients with myeloproliferative neoplasm (MPN). **Methods** JAK2 V617F mutation burden were detected by using MGB Taqman probes and its clinical significance were retrospectively studied in 415 MPN patients. **Results** JAK2 V617F was found in 56.9% of all patients [83.5% in polycythemia vera (PV), 55.9% in essential thrombocythemia (ET), 41.9% in primary myelofibrosis (PMF) and 64.7% in MPN- unclassifiable]. The majority of patients carried heterozygous JAK2 V617F mutation and homozygote was found only in 12 cases (4 in PV, 4 in MPN-U, 2 in PMF, 1 in ET, and 1 in chronic neutrophilic leukemia). Most patients (68.8%) were lower mutation burden (mutation burden<50%), but PV had the highest burden, the moderate burden in PMF and the least in ET. The patient's age and WBC count were significantly correlated with higher mutation burden in PV. WBC count was significantly related to higher mutation burden in ET. WBC count, Hb level and the platelet count were significantly related to higher mutation burden in PMF. **Conclusion** The mutation burden of JAK2 V617F from high to low was PV, ET and PMF. The majority of JAK2 V617F mutation was heterozygous. JAK2 V617F mutation burden was positively correlated with age, WBC, Hb and platelet counts.

【Key words】 Gene, JAK2; Mutation; Myeloproliferative neoplasm

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.03.004

基金项目:国家自然科学基金(81470319)

作者单位:250012 济南,山东大学齐鲁医院血液科(刘玉泉、刘传芳、何娜、王敏、纪春岩、马道新);山东临邑县人民医院(张新秀);山东临邑县中医院(唐东一)

通信作者:马道新,Email:daoxinma@sdu.edu.cn

骨髓增殖性肿瘤(MPN)根据分子生物学特性分为BCR-ABL阳性和BCR-ABL阴性两类疾病。BCR-ABL阳性MPN主要为慢性髓性白血病(CML),经典BCR-ABL阴性MPN主要包括真性红细胞增多症(PV)、原发性血小板增多症(ET)、原发性骨髓纤维化(PMF)等。JAK2 V617F突变在MPN的诊断及鉴别诊断中具有重要意义。自2005年至今,国内外已有不少JAK2 V617F突变相关研究,但多数为定性研究。少数研究组对转录本水平、突变负荷、突变比例进行了相关研究,但大都病种单一、样本量偏少、定量方法敏感性不高,因而结果差异较大^[1-3]。我们采用MGB(minor groove binder) Taqman双荧光探针技术对415例MPN患者JAK2 V617F突变进行定量检测,旨在更好地揭示JAK2 V617F突变的内在机制及其与MPN患者实验室及临床特征之间的关系。

病例和方法

1. 病例:2011年9月至2014年5月山东大学齐鲁医院415例门诊及住院MPN患者纳入本研究,男225例,女190例,中位年龄57(12~86)岁。按照WHO 2008诊断标准^[4]分型,病种分布及一般资料见表1。以50名健康体检者作为正常对照,其中男28名,女22名,中位年龄56(15~82)岁。本研究获山东大学齐鲁医院伦理委员会批准,所有患者均签署知情同意书。

表1 415例骨髓增殖性肿瘤患者一般资料

病种	例数(男/女)	年龄[岁, M(范围)]
CML慢性期	18/15	49(12~75)
PV	65/44	60(17~81)
ET	66/77	58(19~81)
PMF	42/32	60(22~86)
MPN-U	32/19	58(34~83)
HES	2/2	40(21~51)
CNL	0/1	68

注:CML:慢性髓性白血病;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;MPN-U:骨髓增殖性肿瘤不能分类;HES:高嗜酸粒细胞增多症;CNL:慢性中性粒细胞白血病

2. 评价指标:①年龄、性别、种族;②起病症状,是否存在脑梗死、血栓形成、高血压等反映高黏滞

状态病史;③出血事件;④皮肤瘙痒;⑤是否伴有低热、盗汗、体重下降等全身症状;⑥肝、脾肿大;⑦血常规:包括WBC、HGB、PLT、红细胞比容(HCT)、血小板压积;⑧骨髓检查:包括增生程度、巨核细胞数、骨髓纤维化程度、造血面积、染色体核型分析;⑨生化指标:乳酸脱氢酶、胱抑素等。

3. JAK2 V617F突变负荷检测:取患者骨髓(或外周血)及正常对照外周血2 ml,采用北京天根生化科技有限公司的血液基因组DNA提取试剂盒提取基因组DNA,具体操作参照说明书。JAK2 V617F定量PCR检测所需引物序列:JAK2-PCR-Primer-F: AAGCTTTCTCACAAGCATTGGTTT;JAK2-PCR-Primer-R: AGAAAGGCATTAGAAAGCCTGTAGT-T。MGB探针序列:JAK2-Probe-WT: VIC-TCTC-CACAGACACATAC; JAK2-Probe-V617F: FAM-TCCACAGAAACATAC。上述引物和探针序列均由美国Invitrogen公司合成。PCR体系:1 ml基因组DNA,5 ml Universal PCR MasterMix(北京天根生化科技有限公司产品),0.4 ml Primer-F,0.4 ml Primer-R,0.2 ml Probe-WT,0.2 ml Probe-V617F,加双蒸水补足10 ml。PCR在ABI 7500荧光定量PCR仪上进行,反应条件:50℃ 2 min,95℃ 15 min,95℃ 30 s,62℃ 1 min,45个循环,62℃时收集荧光信号。JAK2 V617F探针引物包括VIC探针和FAM探针,扩增得到的Ct值分别反映标本中野生型和突变型JAK2 V617F基因DNA的数量,记为Ct_{VIC}和Ct_{FAM}。

4. JAK2 V617F突变负荷的计算:取培养的1×10⁶个HEL细胞(JAK2 V617F突变100%,来自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库)及K562细胞(JAK2 V617F突变0,来自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库),离心5 min(1 500×g),去上清,加PBS洗涤2遍,分别提取两种细胞基因组DNA,按比例混合,使JAK2 V617F突变负荷分别为10%、25%、50%、75%、95%,各组经定量PCR扩增后,以Ct_{VIC}/Ct_{FAM}比值为横坐标、突变负荷为纵坐标制作标准曲线。将患者的Ct比值代入标准曲线即可得到突变负荷检测值。

参照文献[5-7],我们将BCR-ABL阴性MPN患者分为高突变组(JAK2 V617F突变负荷50%~100%)和低突变组(JAK2 V617F突变负荷<50%)。

5. 统计学处理:所有数据采用SPSS 17.0软件包进行统计学处理,计量资料的比较采用t检验和方差分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。计数资料比较采用列联表卡方检验。相关性分析采用Person相关系

数。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. JAK2 V617F 发生率与突变负荷定量检测结果:415例MPN患者中JAK2 V617F突变阳性236例(56.9%),高突变组63例(31.2%,63/202),低突变组139例(68.8%,139/202)。109例PV患者中检出91例(83.5%),143例ET患者中检出80例(55.9%),74例PMF患者中检出31例(41.9%),51例MPN不能分类(MPN-U)检出33例(64.7%),1例慢性中性粒细胞白血病(CNL)为纯合突变,4例高嗜酸粒细胞增多症(HES)和33例CML未发现突变。236例JAK2 V617F突变阳性患者中224例为杂合突变(94.9%),12例为纯合突变(PV、MPN-U各4例,PMF 2例,ET、CNL各1例)。定量检测结果显示,PV患者JAK2 V617F突变负荷 $[(47.45\pm 18.85)\%]$ 高于ET $[(11.13\pm 21.04)\%]$ 和PMF患者 $[(27.81\pm 30.98)\%]$,组间比较差异有统计学意义($P=0$)。正常对照中JAK2 V617F突变负荷均为0。

2. JAK2 V617F 突变负荷与BCR-ABL阴性MPN患者临床参数间相关性分析:JAK2 V617F定量突变负荷与年龄呈正相关($r=0.218, P=0.013$),高突变组与低突变组年龄差异无统计学意义($P=0.095$);突变负荷与WBC呈正相关($r=0.460, P=0$),高突变组WBC高于低突变组($P=0.001$);突变负荷与HGB水平无明显相关性,高突变组与低突变组间HGB差异无统计学意义($P=0.094$),但均高于阴性组($P=0.004, P<0.001$);突变负荷与PLT无明显相关性,高突变组与低突变组PLT差异无统计学意义

($P=0.678$);突变负荷与HCT无明显相关性,高突变组与低突变组间HCT差异无统计学意义($P=0.235$),均高于阴性组($P<0.001$)。详见表2。

PV患者JAK2 V617F定量突变负荷与年龄呈正相关($r=0.435, P=0.013$),高突变组、低突变组年龄均高于阴性组(P 值分别为0.001、0.002),高突变组与低突变组年龄差异无统计学意义($P=0.139$)。ET及PMF患者年龄与突变负荷均无明显相关性,高突变组、低突变组两组间差异亦无统计学意义(P 值分别为0.321、0.879)。

3. JAK2 V617F突变负荷与PV患者血常规指标的关系:PV患者JAK2 V617F突变负荷与WBC呈正相关($r=0.393, P=0.026$),高突变组患者WBC亦高于低突变组患者($P=0.008$);HGB、PLT与突变负荷无明显相关性(P 值分别为0.204、0.981),高突变组、低突变组两组间差异无统计学意义(P 值分别为0.253、0.716),但高突变组、低突变组两组PLT均高于阴性组(P 值分别为0.005、0.001)。详见表3。

4. JAK2 V617F突变负荷与ET患者血常规指标的关系:ET患者WBC与突变负荷呈正相关($r=0.584, P=0$);高突变组与低突变组WBC差异无统计学意义($P=0.084$),高突变组、低突变组WBC均高于阴性组(P 值分别为0.041、0.001)。详见表4。

5. JAK2 V617F突变负荷与PMF患者血常规指标的关系:PMF患者WBC、PLT与突变负荷呈正相关($r=0.525, P=0.010; r=0.587, P=0.004$),但高突变组、低突变组之间差异无统计学意义(P 值分别为0.213、0.067);PMF患者HGB、HCT与JAK2 V617F突变负荷呈正相关($r=0.496, P=0.016; r=0.500, P=$

表2 JAK2 V617F定量突变负荷与骨髓增殖性肿瘤患者临床参数间相关性分析($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	年龄(岁)	WBC($\times 10^9/L$)	HGB(g/L)	PLT($\times 10^9/L$)	HCT(%)
阴性组	124	50.3 \pm 15.3	8.4 \pm 7.6	113.2 \pm 48.3	547.7 \pm 530.1	34.0 \pm 14.1
低突变组	139	56.9 \pm 13.4 ^a	11.1 \pm 5.9	137.9 \pm 48.4 ^a	567.8 \pm 385.8	41.7 \pm 14.3 ^a
高突变组	63	61.5 \pm 9.7 ^a	18.6 \pm 12.1 ^{ab}	147.8 \pm 48.5 ^a	605.5 \pm 622.7	46.7 \pm 15.7 ^a

注:阴性组:JAK2 V617F突变负荷为0;低突变组:JAK2 V617F突变负荷为<50%;高突变组:JAK2 V617F突变负荷为50%~100%;HCT:红细胞比容;与阴性组比较,^a $P<0.05$;与低突变组比较,^b $P<0.05$

表3 109例真性红细胞增多症患者血常规指标与JAK2 V617F突变负荷的关系($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	WBC($\times 10^9/L$)	HGB(g/L)	PLT($\times 10^9/L$)	HCT(%)
阴性组	18	7.8 \pm 2.3	205.6 \pm 32.0	172.1 \pm 70.6	59.3 \pm 10.6
低突变组	48	9.7 \pm 4.2	195.5 \pm 17.9	364.9 \pm 187.9 ^a	56.4 \pm 14.2
高突变组	43	17.3 \pm 10.9 ^{ab}	183.7 \pm 39.5	391.0 \pm 196.2 ^a	58.6 \pm 11.9

注:阴性组:JAK2 V617F突变负荷为0;低突变组:JAK2 V617F突变负荷<50%;高突变组:JAK2 V617F突变负荷50%~100%;HCT:红细胞比容;与阴性组比较,^a $P<0.05$;与低突变组比较,^b $P<0.05$

0.015),高突变组HGB、HCT均高于低突变组(*P*值分别为0.014、0.008)。详见表5。

6. JAK2 V617F 突变负荷与其他临床特征的关系:PMF患者中,脾肿大及肿大程度与突变负荷无明显相关性,高突变组、低突变组患者脾脏分别为肋缘下(13.0±11.3)、(10.5±9.0)cm,差异无统计学意义(*P*=0.586)。其余临床相关参数与JAK2 V617F 突变负荷差异均无明显相关性,高突变组、低突变组两组间差异亦无统计学意义(*P*>0.05)。

7. 染色体异常与MPN的关系:本研究中63例BCR-ABL 阴性MPN患者进行了染色体核型分析,共检出异常者3例,未发现特异染色体异常。PMF患者1例,染色体核型为46,XY,-3,+mar [10],JAK2 V617F 突变负荷为10.16%;MPN-U患者1例:47,XY,+8 [10],JAK2 V617F 突变阴性;ET患者1例:45,X [8%]/46,XY [92%],JAK2 V617F 突变阴性。

讨 论

MPN是以一系或多系髓系细胞增殖为主要特征的克隆性造血干细胞肿瘤,各亚型几乎都伴有白细胞、血小板及巨核细胞增多,后期出现骨髓纤维化和骨髓衰竭,临床表现颇为相似。2005年以来,国外研究组发现由于具有活性调节抑制作用的JH2抑制区617位氨基酸的错义突变,导致JH2区对JH1区的抑制作用减弱,使JAK2分子得到自发性活化,通过JAK-STAT通路传导到细胞核内,促进相关基因的活化,导致血细胞大量生长,从而出现临床上的MPN症状^[8-10]。JAK2 V617F是BCR-ABL 阴性

MPN的主要分子致病机制和诊断标志,其检出率不尽相同,其中PV患者75%~99%,ET患者50%~70%,PMF患者50%左右^[1];国内虽有报道,但大多病种单一、样本量少或检测方法敏感性差^[1-3]。

为更好地研究JAK2 V617F 定量突变负荷与MPN的关系,我们对415例MPN患者按WHO 2008标准进行回顾性诊断,采用灵敏性和特异性更高的MGB Taqman 双荧光探针法定量检测了这些患者骨髓或外周血JAK2 V617F 突变情况,检出率由高到低依次为PV(83.5%)、MPN-U(64.7%)、ET(55.9%)、PMF(41.9%),4例HES和33例CML患者未检出JAK2 V617F 突变,与国外报道^[8-10]基本一致。同时发现94.9%的患者为杂合突变,纯合突变多见于PV、MPN-U患者,这与其他研究结果^[1-3]不同,Levine等^[11]报道纯合突变在PV中的发生率为25%~60%。本组结果显示PV患者突变负荷最高,与国内外同类研究结果不同^[12-13],这可能是本研究中的PV患者更多地携带有纯合突变细胞所致。JAK2 V617F 纯合子的产生源于9pLOH有丝分裂时染色体重组,导致突变等位基因复制,而丢失一个正常的等位基因。与杂合子及正常细胞相比,纯合子突变的细胞更具有克隆优势^[10]。PV患者突变负荷越高,转化为PMF的风险也越高。具体来说,PV患者等位基因负荷≥50%(即纯合子细胞数目)者,具有进展为PMF的更高风险^[5,14]。纯合子状态意味着患者携带≥50%的突变等位基因。这些观察结果说明等位基因通过直接增强JAK-STAT信号的活化促成疾病的表型,因此,精确量化的V617F 等位基因水平是一个非常有意义的预后指标。实际上,有

表4 143例原发性血小板增多症患者血常规指标与JAK2 V617F 突变负荷的关系($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	WBC($\times 10^9/L$)	HGB(g/L)	PLT($\times 10^9/L$)	HCT(%)
阴性组	63	8.3±5.3	119.2±20.4	1 025.7±383.3	33.3±11.4
低突变组	74	12.9±5.6 ^a	134.0±30.1 ^a	835.8±336.7 ^a	38.4±11.8
高突变组	6	28.6±15.3 ^a	124.1±24.9	1 055.8±590.3	36.3±10.1

注:阴性组:JAK2 V617F 突变负荷为0;低突变组:JAK2 V617F 突变负荷<50%;高突变组:JAK2 V617F 突变负荷50%~100%;HCT:红细胞比容;与阴性组比较,^a*P*<0.05

表5 74例原发性骨髓纤维化患者血常规指标与JAK2 V617F 突变负荷的关系($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	WBC($\times 10^9/L$)	HGB(g/L)	PLT($\times 10^9/L$)	HCT(%)
阴性组	43	8.7±10.7	75.4±27.1	103.9±104.8	23.2±8.6
低突变组	17	8.3±7.1	76.3±20.6 ^a	127.9±63.9	24.2±6.7
高突变组	14	12.6±6.5	101.5±17.0 ^{ab}	260.0±138.2 ^a	33.7±6.8 ^{ab}

注:阴性组:JAK2 V617F 突变负荷为0;低突变组:JAK2 V617F 突变负荷<50%;高突变组:JAK2 V617F 突变负荷50%~100%;HCT:红细胞比容;与阴性组比较,^a*P*<0.05;与低突变组比较,^b*P*<0.05

研究报道,初诊时等位基因负荷 $\geq 75\%$ 的患者预后更差,心血管事件的发生率明显增加^[15]。因此,PV患者JAK2 V617F突变负荷可靠的量化将有助于决定是否应用新型药物来降低突变负荷,以降低转化为PMF的风险^[12]。本组PMF患者中有2例纯合突变者,不排除由PV转化而来的可能。

我们的研究结果显示,年龄与突变负荷呈明显正相关。Carobbio等^[16]的研究资料显示,高龄是影响患者存活时间的不利因素,并认为年龄 >60 岁可作为预测血管并发症的独立因素。JAK2 V617F突变对血常规指标的影响,目前国内外已有多个研究组对此进行了观察。Kittur等^[17]研究发现,JAK2突变型患者的WBC及HGB水平高于野生型,且基因负荷的增加与WBC及PLT水平呈明显相关性。本研究结果亦显示,PV、ET、PMF三组患者中JAK2 V617F阳性组的HGB及WBC高于阴性组,WBC与突变负荷呈正相关。

本组病例中,3例患者染色体核型异常涉及多条染色体,未发现染色体核型与JAK2 V617F突变之间的相关性,也未发现特异性染色体异常。以往研究显示,初诊时染色体异常检出率在PV患者中为30%~40%,在ET患者中往往 $<5\%$,且随着疾病持续时间的延长,出现染色体核型异常的比例增加;核型异常的PV患者易出现骨髓纤维化和白血病转化,预后不良,其中-7、5q-以及复杂染色体异常常提示疾病处于晚期^[18]。染色体改变对不同亚型MPN相互转化以及预后有一定的指导意义,随着样本量的不断扩大以及研究的逐步深入,可能会发现与MPN相关的染色体核型异常。

参考文献

- [1] 张悦,李璘,聂玲,等. JAK2 V617F突变与慢性骨髓增殖性疾病关系的临床研究[J]. 中华血液学杂志, 2008, 29(2):105-109.
- [2] 刘红星,童春容,蔡鹏,等. 真性红细胞增多症和原发性血小板增多症患者中JAK2V617F突变负荷与临床特征相关性[J]. 中国实验血液学杂志, 2009, 17(3):742-745.
- [3] 晁红颖,沈益民,张日,等. 135例骨髓增殖性肿瘤患者JAK2基因突变的定量研究[J]. 中华血液学杂志, 2009, 30(5):321-325.
- [4] 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.
- [5] Passamonti F, Rumi E, Pietra D, et al. A prospective study of 338 patients with polycythemia vera: the impact of JAK2 (V617F) allele burden and leukocytosis on fibrotic or leukemic disease transformation and vascular complications [J]. *Leukemia*, 2010, 24(9): 1574-1579.
- [6] Guglielmelli P, Barosi G, Specchia G, et al. Identification of patients with poorer survival in primary myelofibrosis based on the burden of JAK2V617F mutated allele [J]. *Blood*, 2009, 114(8): 1477-1483.
- [7] Scott LM, Scott MA, Campbell PJ, et al. Progenitors homozygous for the V617F mutation occur in most patients with polycythemia vera, but not essential thrombocythemia [J]. *Blood*, 2006, 108(7): 2435-2437.
- [8] Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders [J]. *Lancet*, 2005, 365(9464):1054-1061.
- [9] James C, Ugo V, Le Couédic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythemia vera [J]. *Nature*, 2005, 434(7037):1144-1148.
- [10] 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.
- [11] Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis [J]. *Cancer Cell*, 2005, 7(4):387-397.
- [12] Kaeda J, Bonamino M, Ayres-Silva J, et al. JAK2 V617F allele burden quantified by real time quantitative polymerase chain reaction and competitive polymerase chain reaction in patients with chronic myeloproliferative neoplasia [J]. *Leuk Lymphoma*, 2014, 55(1):128-135.
- [13] Wang J, Xu Z, Liu L, et al. JAK2V617F allele burden, JAK2 46/1 haplotype and clinical features of Chinese with myeloproliferative neoplasms [J]. *Leukemia*, 2013, 27(8):1763-1767.
- [14] Koren-Michowitz M, Landman J, Cohen Y, et al. JAK2V617F allele burden is associated with transformation to myelofibrosis [J]. *Leuk Lymphoma*, 2012, 53(11):2210-2213.
- [15] Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, et al. Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on JAK2(V617F) allele burden [J]. *Leukemia*, 2007, 21(9):1952-1959.
- [16] Carobbio A, Finazzi G, Guerini V, et al. Leukocytosis is a risk factor for thrombosis in essential thrombocythemia: interaction with treatment, standard risk factors, and Jak2 mutation status [J]. *Blood*, 2007, 109(6): 2310-2313.
- [17] Kittur J, Knudson RA, Lasho TL, et al. Clinical correlates of JAK2V617F allele burden in essential thrombocythemia [J]. *Cancer*, 2007, 109(11):2279-2284.
- [18] Panani AD. Cytogenetic and molecular aspects of Philadelphia negative chronic myeloproliferative disorders: clinical implications [J]. *Cancer Lett*, 2007, 255(1):12-25.

(收稿日期:2014-09-10)

(本文编辑:徐茂强)