

JAK1 抑制剂 SHR0302 和芦可替尼对骨髓增殖性肿瘤 SET2 细胞系和原代细胞增殖抑制和抗炎作用机制的研究

杨爱莹^{1,2} 刘晋琴¹ 蔡亚楠¹ 方美云² 杨琳¹ 陈猛¹ 李冰¹ 肖志坚¹

¹中国医学科学院、北京协和医学院血液病医院(血液学研究所),实验血液学国家重点实验室,国家血液病临床医学研究中心,天津 300020;²大连大学附属中山医院 116001
通信作者:肖志坚,Email:zjxiao@ihcams.ac.cn

【摘要】 目的 探究选择性 JAK1 抑制剂 SHR0302 和芦可替尼对骨髓增殖性肿瘤(MPN)细胞株 SET2 细胞和 MPN 患者原代细胞的影响以及分子作用机制。方法 CCK8 法检测不同浓度 SHR0302 和芦可替尼对 SET2 细胞增殖能力的影响;集落形成实验检测 SHR0302 和芦可替尼对 MPN 患者原代细胞红系爆式集落形成单位(BFU-E)的作用;多因子检测试剂盒 MSD 检测 SHR0302 和芦可替尼对 SET2 细胞 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、IL-2、IL-8、IL-12p70 蛋白表达水平的影响;以 Western blot 法检测 SHR0302 和芦可替尼对 SET2 细胞 JAK-STAT 信号通路分子磷酸化水平的影响。结果 0.1、1.0、2.5、5.0 $\mu\text{mol/L}$ SHR0302 作用 SET2 细胞 24、48、72 h,细胞增殖抑制率随药物浓度的增大而增高($P < 0.001$);0.01、0.05、0.10 $\mu\text{mol/L}$ 芦可替尼作用 SET2 细胞 48、72 h,细胞增殖抑制率亦随药物浓度的增大而增高($P < 0.001$),且均在 72 h 抑制作用最显著。2.5 $\mu\text{mol/L}$ SHR0302、0.1 $\mu\text{mol/L}$ 芦可替尼作用 SET2 细胞 72 h,细胞增殖抑制率分别为(59.94 \pm 0.60)%、(64.00 \pm 0.66)%,提示 SHR0302 的增殖抑制作用弱于芦可替尼。与对照组比较,0.1、1.0、5.0 $\mu\text{mol/L}$ SHR0302 和 0.1、0.2、0.4 $\mu\text{mol/L}$ 芦可替尼均浓度依赖性抑制 MPN 患者 BFU-E 形成,1.0 $\mu\text{mol/L}$ SHR0302 对 MPN 患者 BFU-E 集落形成抑制程度与 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 芦可替尼相当。除 IL-12 外,1.6 $\mu\text{mol/L}$ SHR0302 作用 SET2 细胞 24 h 可明显抑制炎症介质蛋白 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、IL-2、IL-8 表达($P < 0.01$),与 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 芦可替尼对炎症介质抑制作用相当。不同浓度 SHR0302 作用 SET2 细胞 3 h 后 JAK-STAT 信号通路显著抑制,在 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 时可显著抑制 p-STAT1 (Tyr701)、p-STAT3 (Tyr705) 蛋白磷酸化,在 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 时可使 p-JAK1 (Tyr1022/1023)、p-STAT5 (Tyr694) 蛋白磷酸化水平明显下调($P < 0.05$),而芦可替尼在 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 即可明显抑制下游 STAT 蛋白磷酸化水平。结论 SHR0302 能有效抑制 MPN 细胞株和患者原代细胞的增殖以及炎症因子表达,其机制可能与下调 p-JAK1 及其下游 p-STAT1、p-STAT3、p-STAT5 蛋白磷酸化水平相关,但其抗增殖、抗炎作用弱于芦可替尼。

【关键词】 选择性 JAK1 抑制剂 SHR0302; 芦可替尼; 细胞增殖; 炎症细胞因子; JAK-STAT 信号通路

基金项目:国家自然科学基金(81530008、81770129);中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2016-I2M-1-001);实验血液学国家重点实验室自主课题(Z17-03);天津市科技计划(15ZXLCYSY00010)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.12.006

The anti-proliferative and anti-inflammatory mechanisms of JAK1 inhibitor SHR0302 versus Ruxolitinib in SET2 cell line and primary cells

Yang Aiyang^{1,2}, Liu Jinqin¹, Cai Ya'nan¹, Fang Meiyun², Yang Lin¹, Chen Meng¹, Li Bing¹, Xiao Zhijian¹

¹Blood Disease Hospital and Institute of Hematology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China; ²Zhongshan Hospital, Dalian Medical University, Dalian 116001, China

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

【Abstract】 Objective To explore the effects and molecular mechanism of the selective

JAK1 inhibitor SHR0302 and Ruxolitinib on myeloproliferative neoplasms (MPN) cell line SET2 and primary cells in vitro. **Methods** Cell proliferation was detected by CCK8 kit. Colony forming experiment was conducted to evaluate erythroid burst colony formation unit (BFU-E) of primary cells from MPN patients. Multi-factor kits were used to detect six inflammatory cytokines. Phosphorylated proteins of Jak-Stat signaling pathway were tested by Western blot. Results At different time points after treated with SHR0302 and Ruxolitinib, the inhibition of cell proliferation was dose dependent by both drugs ($P < 0.01$). The inhibitory rates of 2.5 $\mu\text{mol/L}$ SHR0302 and 0.1 $\mu\text{mol/L}$ Ruxolitinib on SET2 cells for 72 h were comparable, i.e. $(59.94 \pm 0.60)\%$ and $(64.00 \pm 0.66)\%$, respectively, suggesting that the inhibitory effect of SHR0302 was weaker than that of Ruxolitinib. Similarly, both SHR0302 and Ruxolitinib inhibited BFU-E in primary marrow cells from MPN patients in a dose-dependent manner. SHR0302 1.0 $\mu\text{mol/L}$ produced similar degree of inhibition compared to Ruxolitinib 0.2 $\mu\text{mol/L}$. Except IL-12, the expression of other 5 cytokines (IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-8) was significantly inhibited by 1.6 $\mu\text{mol/L}$ SHR0302 in SET2 cells at 24 h ($P < 0.01$), while Ruxolitinib 1.0 $\mu\text{mol/L}$ had the same effect. Several phosphorylated molecules of Jak-Stat signaling pathway were significantly inhibited by SHR0302 in SET2 cells only for 3 h. P-stat1 (Tyr701), p-stat3 (Tyr705) were down-regulated when treated with SHR0302 1.0 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.05$), p-jak1 (tyr1022/1023) and p-stat5 (Tyr694) were inhibited at 5.0 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.05$). Ruxolitinib significantly inhibited the downstream STAT protein at 0.1 $\mu\text{mol/L}$. Again, the inhibitory effect of SHR0302 on protein expression was weaker than that of Ruxolitinib. **Conclusion** SHR0302 can effectively inhibit the proliferation of MPN cell line and patients' primary cells, as well as the expression of inflammatory factors. The molecular mechanism is possibly related to the down-regulation of phosphorylated proteins of Jak-Stat signaling pathway. Overall, the anti-proliferative and anti-inflammatory effects of SHR0302 are weaker than those of Ruxolitinib.

【Key words】 Selective JAK1 inhibitor SHR0302; Ruxolitinib; Cell proliferation; Inflammatory cytokine; JAK-STAT signaling pathway

Fund program: National Natural Science Funds (81530008, 81770129); CAMS Initiative Fund for Medical Sciences (2016-I2M-1-001); SKLEH-Pilot Research Grant (Z17-03); Science and technology project of Tianjin (15ZXLCYSY00010)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.12.006

JAK2V617F 基因突变异常活化 JAK-STAT 信号通路, 促使骨髓增殖性肿瘤 (MPN) 患者骨髓细胞过度增殖, 释放大量炎性细胞因子并发生相应的体质性症状, 从而生活质量下降, 预期寿命缩短^[1]。JAK1/2 激酶抑制剂芦可替尼治疗骨髓纤维化, 可显著减轻患者的体质症状, 但贫血和血小板减少等药物不良反应是早期治疗失败的主要原因^[2-3], 近期报道的几个 JAK2 激酶抑制剂 III 期临床试验结果也并不理想^[4]。SHR0302 是一种新的 JAK 小分子抑制剂, 主要作用于 JAK1 激酶^[5]。新近报道的 JAK1 选择性抑制剂 INCB039110 治疗骨髓纤维化的 II 期临床试验结果表明该药可有效降低患者症状负荷, 且有一定的缩脾效果, 而且骨髓抑制相对较轻^[6]。为了探讨 SHR0302 在 MPN 的潜在临床应用价值, 我们对 SHR0302 在 MPN 细胞系 SET2 和患者原代细胞的增殖和炎性细胞因子表达水平抑制作用进行了初步研究。

材料与方 法

1. 主要试剂: SHR0302 (江苏豪森药业股份有限公司药物研究院惠赠) 和芦可替尼 (购于德国 Selleck

公司) 溶于 DMSO, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。RPMI1640 培养基和胎牛血清购于美国 Gibco 公司, Cell Counting Kit8 (CCK8) 试剂购于日本同仁化学研究所, 甲基纤维素培养基 (Metho Cult H4435) 购于加拿大 Stem Cell 公司, GAPDH 多克隆抗体购于美国 Bioworld Technology 公司, p-JAK1 (Tyr1022/1023)、JAK1、p-STAT1 (Tyr701)、STAT1、p-STAT3 (Tyr705)、STAT3、p-STAT5 (Tyr694) 和 STAT5 单克隆抗体均购于美国 CST 公司, 羊抗兔 HRP 二抗购于美国 Cell Signaling 公司。多因子检测试剂盒 (MSD) 购于上海优宁维生物有限公司。

2. 细胞来源和细胞培养: SET2 细胞系 (JAK2V617F 杂合突变) 由美国辛辛那提儿童医院黄刚教授赠予。MPN 患者原代细胞取自我院 MDS 诊疗中心住院患者 (患者签署知情同意书)。SET2 细胞和 MPN 患者原代骨髓单个核细胞 (BM-MNC) 用含有 20% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基培养。细胞均置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。实验所用细胞均处于对数生长期。

3. CCK8 法检测药物对细胞增殖的影响: 取对数生长期的 SET2 细胞接种于 96 孔板, 加入

SHR0302,使其终浓度为0、0.1、1.0、2.5、5.0 $\mu\text{mol/L}$,芦可替尼终浓度为0、0.01、0.05、0.1 $\mu\text{mol/L}$,每组设5个平行复孔,在培养箱中培养24、48、72 h后,加入10 μl CCK-8溶液并继续孵育3 h,用酶标仪检测450 nm处各孔的吸光度(A)值,计算细胞增殖抑制率。

$$\text{细胞增殖抑制率}(\%) = \frac{A_{\text{空白对照组}} - A_{\text{实验组}}}{A_{\text{空白对照组}} - A_{\text{本底对照组}}} \times 100\%$$

4. 甲基纤维素细胞集落形成实验:甲基纤维素H4435提前分装至无菌西林瓶中,收集药物处理24 h后MPN患者原代细胞加入至无菌西林瓶中。SHR0302浓度为0、0.1、1.0、5.0 $\mu\text{mol/L}$,芦可替尼浓度为0、0.1、0.2、0.4 $\mu\text{mol/L}$,每组设3个平行复孔,每瓶加入两倍的双抗,振荡器充分振荡混匀,吸取混有细胞的半固体培养基接种于24孔板,MPN患者原代细胞每孔接种 1×10^5 个,7~14 d后观察红系爆式集落形成单位(BFU-E)形成能力并用倒置显微镜拍照。

$$\text{集落形成抑制率}(\%) = (1 - \frac{\text{实验组集落形成数目}}{\text{对照组集落形成数目}}) \times 100\%$$

5. 炎性细胞因子水平测定:6孔板接种细胞密度为 $1.5 \times 10^6/\text{ml}$,根据CCK8推算SHR0302对SET2细胞株的 IC_{50} 值,以此确定SHR0302对SET2细胞株的适宜作用浓度为1.611 $\mu\text{mol/L}$ 。分别为0、1.6 $\mu\text{mol/L}$ SHR0302作用于SET2细胞,选定的芦可替尼作用浓度分别为0、0.2、0.4、0.8、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 。培养24 h后吸取细胞上清至0.5 ml EP管,每种浓度分装2管(每管300 μl)送至上海优宁维公司进行检测。

6. Western blot法测定JAK-STAT信号通路相关蛋白表达:分别收集药物处理组及未处理组细胞,用含有蛋白酶及磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液裂解细胞,提取细胞总蛋白,测定蛋白浓度,每孔蛋白上样量为30 μg ,于8% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳2 h,湿转印至膜,50 g/L的脱脂奶粉室温封闭1 h后,加入相应的一抗孵育,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。PBST洗膜3次(每次10 min),用HRP标记的二抗室温孵育1 h,ECL发光液显色并进行图像采集,采用Image J分析软件进行灰度扫描。

7. 统计学处理:采用SPSS 23.0及Graphpad Prism 6.0软件进行数据分析,组间均数的比较用one-way ANOVA进行检验,多种因素组间的比较采用two-way ANOVA进行检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. SHR0302和芦可替尼对SET2细胞增殖的影响:药物对细胞的增殖抑制呈时间和剂量依赖性(表1、表2),以72 h抑制作用最显著,SHR0302、芦可替尼对SET2细胞的 IC_{50} 值分别为1.611 $\mu\text{mol/L}$ 、0.103 $\mu\text{mol/L}$ 。作用72 h后,2.5 $\mu\text{mol/L}$ SHR0302、0.1 $\mu\text{mol/L}$ 芦可替尼的增殖抑制率分别为(59.94 \pm 0.60)%、(64.00 \pm 0.66)%。

表1 不同浓度SHR0302作用SET2细胞不同时间的细胞增殖抑制率(% , $\bar{x} \pm s$,实验重复3次)

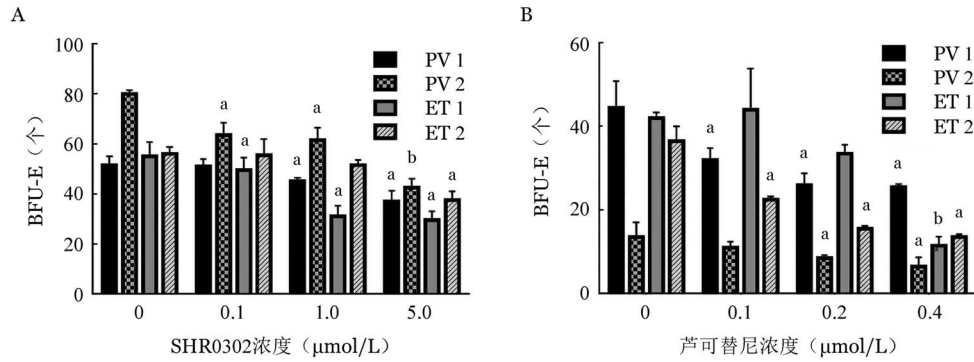
组别	24 h	48 h	72 h
0 $\mu\text{mol/L}$ 处理组	0.00 \pm 0.01	0.00 \pm 0.18	0.00 \pm 0.33
0.1 $\mu\text{mol/L}$ 处理组	1.25 \pm 0.03	9.86 \pm 0.03	7.83 \pm 1.27
1.0 $\mu\text{mol/L}$ 处理组	4.80 \pm 0.05	10.22 \pm 0.12	29.02 \pm 0.13
2.5 $\mu\text{mol/L}$ 处理组	4.98 \pm 0.01	22.22 \pm 0.14	59.94 \pm 0.60
5 $\mu\text{mol/L}$ 处理组	9.57 \pm 0.01	29.02 \pm 0.18	75.31 \pm 0.32
P值	<0.05	<0.05	<0.001

表2 不同浓度芦可替尼作用SET2细胞48、72 h的细胞增殖抑制率(% , $\bar{x} \pm s$,实验重复3次)

组别	48 h	72 h
0 $\mu\text{mol/L}$ 处理组	0.00 \pm 0.01	0.00 \pm 1.32
0.01 $\mu\text{mol/L}$ 处理组	13.58 \pm 0.02	11.91 \pm 2.67
0.05 $\mu\text{mol/L}$ 处理组	23.53 \pm 0.18	31.35 \pm 1.14
0.1 $\mu\text{mol/L}$ 处理组	27.06 \pm 0.13	64.00 \pm 0.66
P值	<0.001	<0.001

2. SHR0302和芦可替尼对MPN患者原代细胞BFU-E集落形成能力的影响:不同浓度SHR0302(0、0.1、1.0、5.0 $\mu\text{mol/L}$)和芦可替尼(0、0.1、0.2、0.4 $\mu\text{mol/L}$)处理真性红细胞增多症(PV,2例)和原发性血小板增多症(ET,2例)原代细胞24 h后,患者BFU-E集落数随药物浓度增加而递减(图1)。SHR0302和芦可替尼在0.1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下均能抑制PV、ET患者BFU-E集落形成,1.0 $\mu\text{mol/L}$ SHR0302对PV和ET患者BFU-E集落形成抑制程度与0.2 $\mu\text{mol/L}$ 芦可替尼相当。

3. SHR0302和芦可替尼对SET2细胞炎性细胞因子分泌水平的影响:1.6 $\mu\text{mol/L}$ SHR0302作用SET2细胞24 h后,促炎因子IL-6、TNF- α 、IL-1 β 表达水平较对照组均下降约50% ($P < 0.001$),而参比药物芦可替尼对促炎因子具有选择性抑制作用,1.0 $\mu\text{mol/L}$ 芦可替尼处理组对IL-6的抑制作用强于1.6 $\mu\text{mol/L}$ SHR0302,对TNF- α 、IL-1 β 的抑制作用稍



MPN:骨髓增殖性肿瘤;BFU-E:红系爆式集落形成单位。PV1、PV2分别为第1、2例真性红细胞增多症患者,ET1、ET2分别为第1、2例原发性血小板增多症患者。与对照组(0 μmol/L)相比,*P < 0.05, ^bP < 0.01

图1 不同浓度的SHR0302(A)和芦可替尼(B)与MPN患者原代细胞作用24 h后BFU-E集落形成数目(实验重复3次)

弱于SHR0302(表3、4)。1.6 μmol/L SHR0302对影响MPN患者生存和白血病转化的独立危险因素炎症因子IL-2、IL-8、IL-12p70的抑制作用与1.0 μmol/L芦可替尼相当,除IL-12p70以外,与对照组(0 μmol/L)相比均具有统计学意义(P < 0.01)(表5、6)。

表3 不同浓度SHR0302作用SET2细胞24 h后IL-6、TNF-α、IL-1β的表达(pg/ml, $\bar{x} \pm s$, 实验重复3次)

组别	IL-6	TNF-α	IL-1β
0 μmol/L处理组	1.32±0.01	9.16±0.25	2.19±0.01
1.6 μmol/L处理组	0.60±0.03	4.04±0.31	1.17±0.04
P值	<0.001	<0.001	<0.001

表4 不同浓度芦可替尼作用SET2细胞24 h后IL-6、TNF-α、IL-1β的表达(pg/ml, $\bar{x} \pm s$, 实验重复3次)

组别	IL-6	TNF-α	IL-1β
0 μmol/L处理组	18.83±0.08	27.53±0.70	13.75±1.00
0.2 μmol/L处理组	10.85±0.13	20.98±4.44	10.68±0.62
0.4 μmol/L处理组	9.30±0.47	17.69±3.05	9.93±0.38
0.8 μmol/L处理组	7.90±0.13	13.24±0.22	8.58±0.17
1.0 μmol/L处理组	7.24±0.40	7.97±0.45	12.65±0.37
P值	<0.001	0.008	0.001

表5 不同浓度SHR0302作用SET2细胞24 h后IL-2、IL-8、IL-12p70表达水平(pg/ml, $\bar{x} \pm s$, 实验重复3次)

组别	IL-2	IL-8	IL-12p70
0 μmol/L处理组	1.04±0.03	332.92±6.40	0.34±0.04
1.6 μmol/L处理组	0.71±0.01	161.98±6.17	0.22±0.02
P值	0.004	0.001	0.069

4. SHR0302和芦可替尼对SET2细胞JAK-STAT信号通路及相应蛋白的影响:以不同浓度(0、0.1、1.0、5 μmol/L)SHR0302和芦可替尼处理SET2细胞3 h后,p-JAK1(Tyr1022/1023)、p-STAT1

(Tyr701)、p-STAT3(Tyr705)、p-STAT5(Tyr694)蛋白磷酸化水平随药物浓度增加而下调(P < 0.05)(图2),SHR0302抑制JAK-STAT通路的起效浓度为1.0 μmol/L,芦可替尼起效浓度为0.1 μmol/L。

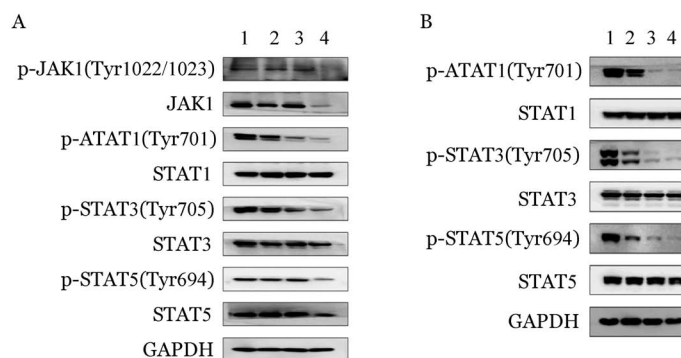
表6 不同浓度芦可替尼作用SET2细胞24 h后IL-2、IL-8、IL-12p70表达水平(pg/ml, $\bar{x} \pm s$, 实验重复3次)

组别	IL-2	IL-8	IL-12p70
0 μmol/L处理组	13.75±0.46	2 450.56±8.41	4.19±1.00
0.2 μmol/L处理组	9.50±1.45	2 312.48±29.29	3.32±0.88
0.4 μmol/L处理组	8.84±0.66	2 291.04±31.72	2.54±0.28
0.8 μmol/L处理组	7.31±0.52	2 286.00±18.46	2.52±0.05
1.0 μmol/L处理组	6.83±1.18	2 303.06±12.36	2.09±0.38
P值	0.002	0.003	0.104

讨论

JAK2V617F基因突变使JAK-STAT信号通路异常激活,不仅导致恶性克隆扩增,还可促进炎症细胞因子释放^[7-8]。Tefferi等^[9]的研究表明MPN患者血清中高水平的炎症细胞因子与患者症状负荷相关,可影响患者的临床病程和生存预后。其他研究亦证实IL-8、IL-2受体、IL-12和IL-15水平是影响MPN患者生存和白血病转化的独立危险因素^[1,10]。因此,抑制异常活化的炎症反应也是MPN的治疗策略之一。

选择性JAK1抑制剂SHR0302是一种酪氨酸激酶小分子抑制剂,体外实验证实SHR0302对JAK1激酶的选择性明显优于JAK2、JAK3和Tyk2^[5]。在佐剂诱导的小鼠胶原性关节炎(adjvant-induced arthritis, AA)模型中,SHR0302可通过抑制JAK1-STAT3通路抑制Th17和B淋巴细胞的增殖,下调炎症性细胞因子TNF-α、IL-1和IL-17,AA小鼠服用



1、2、3、4分别为0、0.1、1.0、5.0 μmol/L处理组

图2 Western blot法检测不同浓度SHR0302(A)和芦可替尼(B)对SET2细胞JAK-STAT信号通路蛋白表达的影响

SHR0302药物后关节及鼠爪肿胀程度减轻,脾脏及关节的组织病理学改变有所缓解^[10]。在肝纤维化体外实验中,Wu等^[5]证实SHR0302可通过抑制JAK1-STAT3及AKT信号通路而诱导肝星状细胞的凋亡,进而抑制肝星状细胞增殖和胶原纤维的产生。本研究我们发现SHR0302作用于SET2细胞可显著抑制细胞增殖且呈明显的时间和剂量依赖性,并且SHR0302作用24 h即可明显抑制MPN患者BFU-E集落形成,但其抑制细胞增殖的作用浓度显著高于芦可替尼。此外,对炎性细胞因子表达水平抑制率达50%的SHR0302作用浓度亦高于芦可替尼。

MPN中STAT1和STAT3的激活可促进炎性细胞因子分泌,活化的STAT5激活则主要调控与细胞增殖、生存和凋亡相关基因的表达^[1]。本研究发现芦可替尼可同时抑制磷酸化STAT1、STAT3和STAT5,而SHR0302对磷酸化STAT5的抑制作用弱于磷酸化STAT1和STAT3,提示该药主要发挥抗炎作用。

本研究结果显示,SHR0302可能通过抑制MPN肿瘤细胞磷酸化STAT5发挥抗增殖作用,其抗炎作用可能与抑制JAK1-STAT1/3信号通路有关。虽然SHR0302的抗增殖和抗炎作用弱于芦可替尼,但芦可替尼主要通过抑制磷酸化STAT5发挥抗增殖作用,SHR0302则以JAK1-STAT1/3为主要作用靶点,二者作用靶点的区别提示临床联合用药的可能性值得进一步研究。

参考文献

[1] Mendez Luque LF, Blackmon AL, Ramanathan G, et al. Key role of inflammation in myeloproliferative neoplasms: instigator of disease initiation, progression, and symptoms [J]. *Curr Hematol Malig Rep*, 2019, 14 (3): 145-153. DOI: 10.1007/s11899-019-00508-w.

[2] 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.

[3] 金洁,杜欣,周道斌,等. JAK抑制剂芦可替尼治疗中国骨髓纤维化患者的疗效和安全性: A2202随访一年结果[J]. *中华血液学杂志*, 2016, 37(10): 858-863. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2016.10.007.

[4] Pardanan A, Tefferi A. How I treat myelofibrosis after failure of JAK inhibitors [J]. *Blood*, 2018, 132 (5): 492-500. DOI: 10.1182/blood-2018-02-785923.

[5] Wu H, Yan S, Chen J, et al. JAK1-STAT3 blockade by JAK inhibitor SHR0302 attenuates inflammatory responses of adjuvant-induced arthritis rats and decreases Th17 and total B cells [J]. *J Joint Bone Spine*, 2016, 83 (5): 525-532. DOI: 10.1016/j.jbspin.2015.09.002.

[6] Mascarenhas JO, Talpaz M, Gupta V, et al. Primary analysis of a phase II open-label trial of INCB039110, a selective JAK1 inhibitor, in patients with myelofibrosis [J]. *Haematologica*, 2017, 102(2): 327-335. DOI: 10.3324/haematol.2016.151126.

[7] Lussana F, Rambaldi A. Inflammation and myeloproliferative neoplasms [J]. *J Autoimmun*, 2017, 85: 58-63. DOI: 10.1016/j.jaut.2017.06.010.

[8] Kleppe M, Kwak M, Koppikar P, et al. JAK-STAT pathway activation in malignant and nonmalignant cells contributes to MPN pathogenesis and therapeutic response [J]. *Cancer Discov*, 2015, 5(3): 316-331. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-14-0736.

[9] Tefferi A, Vaidya R, Caramazza D, et al. Circulating interleukin (IL) - 8, IL- 2R, IL- 12, and IL- 15 levels are independently prognostic in primary myelofibrosis: a comprehensive cytokine profiling study [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29 (10): 1356-1363. DOI: 10.1200/JCO.2010.32.9490.

[10] Gu YJ, Sun WY, Zhang S, et al. Targeted blockade of JAK/STAT3 signaling inhibits proliferation, migration and collagen production as well as inducing the apoptosis of hepatic stellate cells [J]. *Int J Mol Med*, 2016, 38 (3): 903-911. DOI: 10.3892/ijmm.2016.2692.

(收稿日期:2019-07-23)

(本文编辑:徐茂强)