

·论著·

一个新的MPL基因异常剪接体 MPL L391-V392ins12的鉴定及其 在248例骨髓增殖性肿瘤患者中的筛查结果

田瑞媛 陈秀花 常建梅 张娜 覃艳红 徐智芳
任方刚 赵俊霞 潘杰 郭海秀 王晓娟 王宏伟

【摘要】目的 鉴定MPL L391-V392ins12异常剪接体,了解其在骨髓增殖性肿瘤(MPN)患者中突变发生情况。**方法** 采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)联合克隆测序方法对MPL基因异常剪接体进行鉴定,采用等位基因特异性聚合酶链反应(AS-PCR)在248例MPN患者及200名健康正常人中筛查其突变情况。**结果** 发现并确认了MPL基因的一个异常剪接体MPL L391-V392ins12,即MPL基因的外显子7和外显子8之间保留了36 bp的内含子序列,导致蛋白编码序列的氨基酸位点391与392之间插入12个氨基酸(谷氨酸、甘氨酸、亮氨酸、赖氨酸、亮氨酸、亮氨酸、脯氨酸、丙氨酸、天冬氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、缬氨酸)。248例MPN患者中19例(7.66%)检出MPL L391-V392ins12突变,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)患者的检出率分别为1.92%(1/52)、9.66%(14/145)、7.84%(4/51);200名正常人中未检测到MPL L391-V392ins12突变。**结论** MPL L391-V392ins12是存在于MPN中的一种病理性剪接体,在PV、ET、PMF中均可发生,但多见于ET、PMF,可能是MPN发病的潜在原因之一。

【关键词】 骨髓增殖性肿瘤; 基因,MPL; 异常剪接; MPL L391-V392ins12

Identification of a novel aberrant spliceosome of MPL gene (MPLL391-V392ins12) in patients with myeloproliferative neoplasms Tian Ruiyuan, Chen Xiuhua, Chang Jianmei, Zhang Na, Tan Yanhong,

Xu Zhifang, Ren Fanggang, Zhao Junxia, Pan Jie, Guo Haixiu, Wang Xiaojuan, Wang Hongwei.

Department of Hematology, the Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Corresponding author: Wang Hongwei, Email: wanghw68@hotmail.com

[Abstract] **Objective** To identify the MPL L391-V392ins12 spliceosome and analyze its frequencies in patients with myeloproliferative neoplasms (MPN). **Methods** MPL aberrant spliceosome was identified through reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) combined with cloning sequencing. The mutation of this spliceosome in 248 MPN patients and 200 normal people was determined by allele-specific polymerase chain reaction (AS-PCR). **Results** A novel aberrant spliceosome of MPL gene (MPL L391-V392ins12) was identified, i.e. 36 bp intron was retained between exon7 and exon8, and there were 12 amino acids (EGLKLLPADIPV) inserted. MPL L391-V392ins12 mutation was detected in 19 (7.66%) of the 248 patients with MPN, including 1 (1.92%) of 52 patients with PV, 14 (9.66%) of 145 with ET, and 4 (7.84%) of 51 with PMF. And the mutation was not detected in the group of 200 normal people. **Conclusion** MPL L391-V392ins12 spliceosome is an aberrant spliceosome present in the MPN. It can be detected in PV, ET and PMF, and more frequently in ET and PMF. This mutation may play an important role in the process of MPN.

【Key words】 Myeloproliferative neoplasms; Gene, MPL; Aberrant splicing; MPL L391-V392ins12

骨髓增殖性肿瘤(MPN)是一组起源于造血干细胞,以骨髓一系或多系过度增殖为特征的疾病。经典的MPN包括真性红细胞增多症(PV)、原发性血小板增多症(ET)和原发性骨髓纤维化(PMF)。研究证实,JAK2、MPL及CALR基因的DNA突变均与MPN的发生密切相关^[1-3],但仍有部分MPN患者不能检出上述3种基因突变。选择性剪接(alternative splicing)是真核细胞中普遍存在的转录后修饰机制,是导致蛋白组多样性的一个重要途径。异常剪接是肿瘤细胞的特性之一,肿瘤细胞中许多重要的癌基因及抑癌基因都可通过异常剪接调控肿瘤的发生、发展^[4]。我们在MPN患者中发现1个新的MPL基因剪接体MPL L391-V392ins12,并在248例MPN患者中进行筛查,报告如下。

对象和方法

1. 病例:收集2013年1月至2014年9月山西医科大学第二医院血液科就诊的初发MPN患者248例,其中男125例、女123例,中位年龄53(21~84)岁。参照WHO 2008标准进行诊断:PV 52例,ET 145例,PMF 51例。200名健康正常人外周血标本来自本院体检中心。本研究得到我院伦理委员会批准,所有患者均知情同意。

2. 总RNA的提取:取患者骨髓或外周血标本300 μl,按试剂盒TRIzol(日本TaKaRa公司产品)说明书提取白细胞总RNA,用蛋白核酸分析仪分别测定260、280 nm处吸光度值(A_{260} 、 A_{280}),将 $A_{260}/A_{280} \geq 1.7$ 的标本保存于-80 °C备用。

3. 引物设计:从GeneBank检索MPL cDNA序列(NM_005373),应用primer5.0软件进行引物设计:
①MPL基因cDNA克隆引物:正向引物 M-F: 5'-ATGCCCTCCTGGGCCCTC-3';反向引物 M-R: 5'-TCAAGGCTGCTGCCAACAGC-3'。
②MPL L391-V392ins12剪接体引物:正向引物 F1: 5'-CACAGTTCTCGCTGCCAC-3'、正向引物 F2: 5'-CTGGATCCACCAGGCTGAAG-3';反向引物 R: 5'-GCGGCTCCAGCACCTTC-3'。
③β-actin引物:正向引物 β-F: 5'-GGACTCGTCATACTCCTGCTTG-3';反向引物 β-R: 5'-GGAAATCGTGCCTGACATTAG-3'。

4. 逆转录反应:总反应体系20 μl。取样品总RNA 1 μg、随机引物250 ng,加DEPC水至11 μl,70 °C 5 min后立即冰浴,然后依次加入5×缓冲液

2.5 μl、脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP, 10 mmol/L)2 μl、核糖核酸酶0.5 μl,加DEPC水至19 μl,25 °C 5 min后立即冰浴,加M-MULV逆转录酶1 μl,25 °C 10 min,42 °C 60 min,70 °C 10 min。

5. PCR:反应体系:10×Taq缓冲液2.5 μl,dNTP(10 mmol/L)0.5 μl、正向引物(20 μmol/L)1 μl、反向引物(20 μmol/L)1 μl、MgCl₂(1.5 mmol/L)1.5 μl、cDNA模板2.0 μl、Taq DNA聚合酶(1 U/μl)1.5 μl、双蒸水补充至25 μl。反应条件:94 °C 3 min预变性,95 °C 30 s、60 °C 30 s、72 °C 30 s(40个循环),72 °C总延伸10 min。每次扩增均设立阳性、阴性与空白对照。PCR产物行聚丙烯酰胺凝胶或琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像仪对电泳结果进行扫描分析。

6. 克隆:用高保真酶扩增MPL基因CDS序列,产物酶切后连接到T载体中,转化DH5α感受态细胞,涂板,挑取菌落,碱性裂解法提取质粒,送北京六合华大基因科技公司测序鉴定。

结 果

1. MPL L391-V392ins12剪接体序列的发现:在对部分JAK2及MPL基因外显子10突变双阴性的MPN患者进行MPL基因cDNA全长测序分析中,我们发现2例患者在外显子8起始处出现套峰。为进一步明确其突变,我们将PCR产物进行克隆测序,发现野生型克隆和一种新的转录产物:MPL基因的外显子7和外显子8之间保留了36 bp的内含子序列(图1),导致蛋白编码序列氨基酸位点391与392之间插入12个氨基酸(谷、甘、亮、赖、亮、亮、脯、丙、天冬、异亮、脯、缬),故命名为MPL L391-V392ins12。

2. MPL L391-V392ins12剪接体的鉴定:根据MPL L391-V392ins12剪接体序列,我们在不同的位置设计了3条引物(图2)。其中F1/R引物扩增产物包含MPL基因野生型转录本(282 bp)及变异型转录本(318 bp),由于二者仅相差36 bp且变异型转录本丰度低于正常转录本,故采用灵敏度较高的聚丙烯酰胺凝胶电泳方法分析其扩增产物。结果发现MPL L391-V392ins12剪接体突变阳性患者有明显的野生带与突变带,MPL L391-V392ins12剪接体突变阴性患者与正常对照只有野生带(图3)。引物F2则针对MPL L391-V392ins12转录本跨外显子7末端设计引物上游,故F2/R引物只能特异性扩增变异

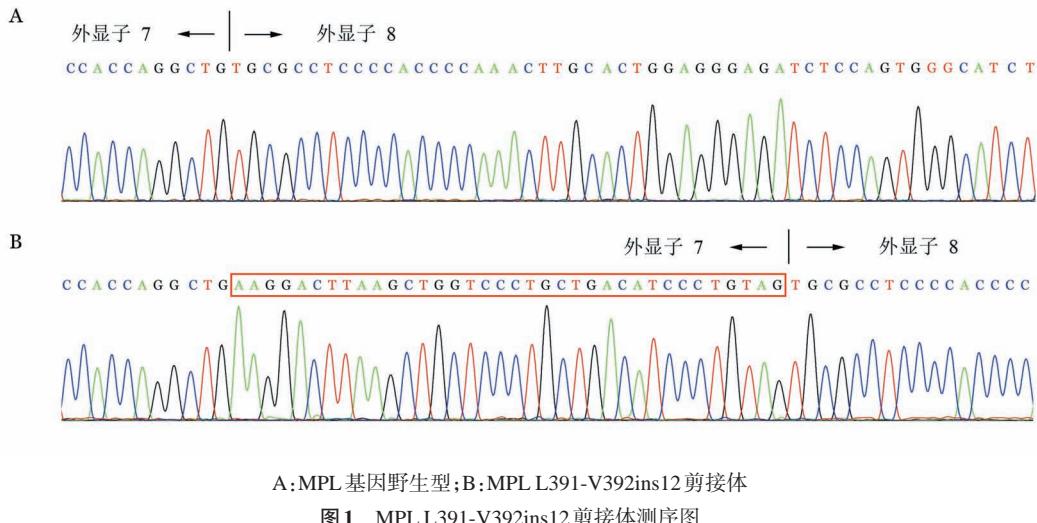


图1 MPL L391-V392ins12 剪接体测序图

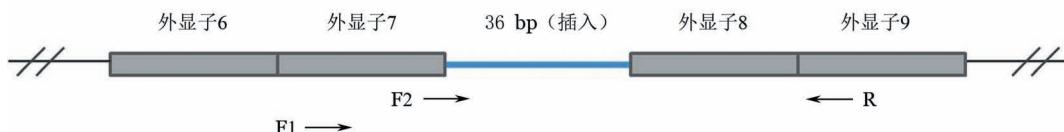
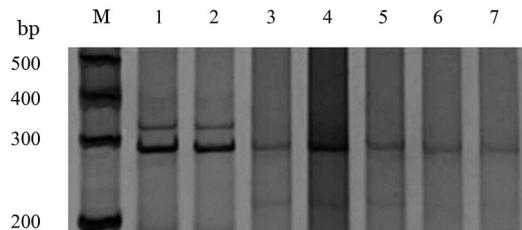


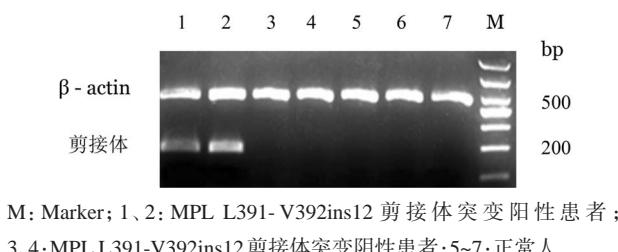
图2 MPL L391-V392ins12 剪接体鉴定引物设计示意图

型转录本(211 bp),结果如图4所示。



M: Marker; 1、2: MPL L391-V392ins12 剪接体突变阳性患者; 3、4:MPL L391-V392ins12 剪接体突变阴性患者;5~7:正常人

图3 MPL L391-V392ins12 剪接体F1/R扩增产物



M: Marker; 1、2: MPL L391-V392ins12 剪接体突变阳性患者; 3、4:MPL L391-V392ins12 剪接体突变阴性患者;5~7:正常人

图4 MPL L391-V392ins12 剪接体F2/R扩增产物

3. MPL L391-V392ins12在MPN患者中的发生情况:248例MPN患者中19例(7.66%)检出MPL L391-V392ins12突变:PV 1例(同时存在JAK2 V617F突变),突变检出率为1.92%(1/52);ET 14例(6例同时存在JAK2 V617F突变),突变检出率为

9.66% (14/145);PMF 4例(1例同时存在JAK2 V617F突变),突变检出率为7.84%(4/51)。200名健康正常人均未检测到MPL L391-V392ins12剪接体突变。

讨 论

以往MPN的诊断需要排除复杂的继发因素,主要依赖骨髓病理及细胞形态学方法,早期或临床表现不典型的患者容易漏诊。2005年,JAK2 V617F基因突变的发现使MPN的分子发病机制研究取得了突破性的进展,大量研究表明,JAK2 V617F突变存在于90%~95%的PV及50%的ET、PMF患者中^[5-6],随后发现在2%~3%的JAK2 V617F阴性PV患者中存在外显子12的异常^[7]。在ET与PMF患者中,MPL(TPO受体)基因外显子10突变的检出率为1%~10%,MPL W515K、MPL W515L为主要突变类型^[8-10]。2008年WHO已将JAK2 V617F突变列为MPN的诊断标准之一。2013年有研究组先后报道在JAK2和MPL基因突变阴性MPN患者中检出钙网蛋白编码基因CALR突变,该基因突变仅见于ET、PMF患者中,PV未见报道^[11-12]。

目前MPN的分子机制研究主要集中在DNA水平,而mRNA的选择性剪接异常也是肿瘤发生发展

的一个重要因素。研究证实,乳腺癌、甲状腺癌、结直肠癌、骨髓增生异常综合征以及急性白血病等恶性疾病都与基因的异常剪接有关^[13-16]。按此思路,我们发现并鉴定了一个新的MPL基因的异常剪接体MPL L391-V392ins12。在正常人群中未检测到MPL L391-V392ins12突变,说明该剪接体为一种病理性剪接体。在248例初发MPN患者中进行MPL L391-V392ins12突变检测,PV、ET、PMF患者中的突变检出率分别为1.92%(1/52)、9.66%(14/145)、7.84%(4/51),表明该剪接体在MPN中发生频率不高且主要见于ET与PMF。值得注意的是,本研究19例MPL L391-V392ins12突变阳性MPN患者中有8例(PV 1例、ET 6例、PMF 1例)同时存在JAK2 V617F突变,提示MPL L391-V392ins12在MPN发病过程中可能与JAK2突变有协同作用。目前在对MPN发病分子病因的研究中发现,单独的基因突变并不能完全解释疾病的病因及病程进展,两项回顾性的大样本研究均表明在MPN患者中JAK2 V617F与MPL突变可同时存在^[2,17],MPL突变的发生与PV向ET、PMF的转化密切相关^[10,18]。

本研究结果表明,MPN患者存在一个新的病理性剪接体MPL L391-V392ins12,该剪接体在三种经典MPN中均可检出,且多见于ET、PMF,可能是MPN发病的潜在原因之一。

参考文献

- [1] 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.
- [2] Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients[J]. Blood, 2006, 108(10): 3472-3476.
- [3] Levine RL. Another piece of the myeloproliferative neoplasms puzzle[J]. N Engl J Med, 2013, 369(25): 2451-2452.
- [4] Kelemen O, Convertini P, Zhang Z, et al. Function of alternative splicing[J]. Gene, 2013, 514(1): 1-30.
- [5] Spivak JL. Narrative review: Thrombocytosis, polycythemia vera, and JAK2 mutations: The phenotypic mimicry of chronic myeloproliferation[J]. Ann Intern Med, 2010, 152(5): 300-306.
- [6] 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.
- [7] Scott LM, Tong W, Levine RL, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis [J]. N Engl J Med, 2007, 356(5): 459-468.
- [8] Pikman Y, Lee BH, Mercher T, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia[J]. PLoS Med, 2006, 3(7): e270.
- [9] 陈秀花,王宏伟,齐喜玲,等. JAK2V617F阴性骨髓增殖性肿瘤患者MPLEXon10突变检测[J].白血病·淋巴瘤,2010,19(9): 552-554.
- [10] Teofili L, Giona F, Torti L, et al. Hereditary thrombocytosis caused by MPLSer505Asn is associated with a high thrombotic risk, splenomegaly and progression to bone marrow fibrosis [J]. Haematologica, 2010, 95(1): 65-70.
- [11] Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms [J]. N Engl J Med, 2013, 369(25): 2379-2390.
- [12] 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): 2391-2450.
- [13] Hahn MA, McDonnell J, Marsh DJ. The effect of disease-associated HRPT2 mutations on splicing [J]. J Endocrinol, 2009, 201(3): 387-396.
- [14] Lazzereschi D, Nardi F, Turco A, et al. A complex pattern of mutations and abnormal splicing of Smad4 is present in thyroid tumours[J]. Oncogene, 2005, 24(34): 5344-5354.
- [15] Degrold-Courcet E, Sokolowska J, Padeano MM, et al. Development of primary early-onset colorectal cancers due to biallelic mutations of the FANCD1/BRCA2 gene[J]. Eur J Hum Genet, 2014, 22(8): 979-987.
- [16] Wong JJ, Lau KA, Pinello N, et al. Epigenetic modifications of splicing factor genes in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia[J]. Cancer Sci, 2014, 105(11): 1457-1463.
- [17] Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, et al. MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort [J]. Blood, 2008, 112(1): 141-149.
- [18] Gibson SE, Schade AE, Szpurka H, et al. Phospho-STAT5 expression pattern with the MPL W515L mutation is similar to that seen in chronic myeloproliferative disorders with JAK2 V617F[J]. Hum Pathol, 2008, 39(7): 1111-1114.

(收稿日期:2015-02-02)

(本文编辑:徐茂强)