

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 (MPL L391-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

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.07.006

基金项目:国家自然科学基金(81241014);山西省自然科学基金(2011011038-2)

作者单位:030001 太原,山西医科大学第二医院血液病研究所

通信作者:王宏伟,Email: wanghw68@hotmail.com

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 μ l,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'-TCAAGGCTGCTGCCAATAGC-3'。②MPL L391-V392ins12 剪接体引物:正向引物 F1: 5'-CA-CAGTTCTCTCGCTGCCAC-3'、正向引物 F2: 5'-CTGGATCCACCAGGCTGAAG-3';反向引物 R: 5'-GCGGCTCCAGCACCTTC-3'。③ β -actin 引物:正向引物 β -F: 5'-GGACTCGTCATACTCCTGCTTG-3';反向引物 β -R: 5'-GGAAATCGTGCGTGACAT-TAAG-3'。

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

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

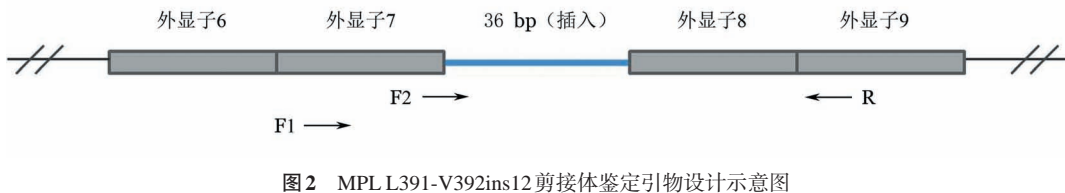
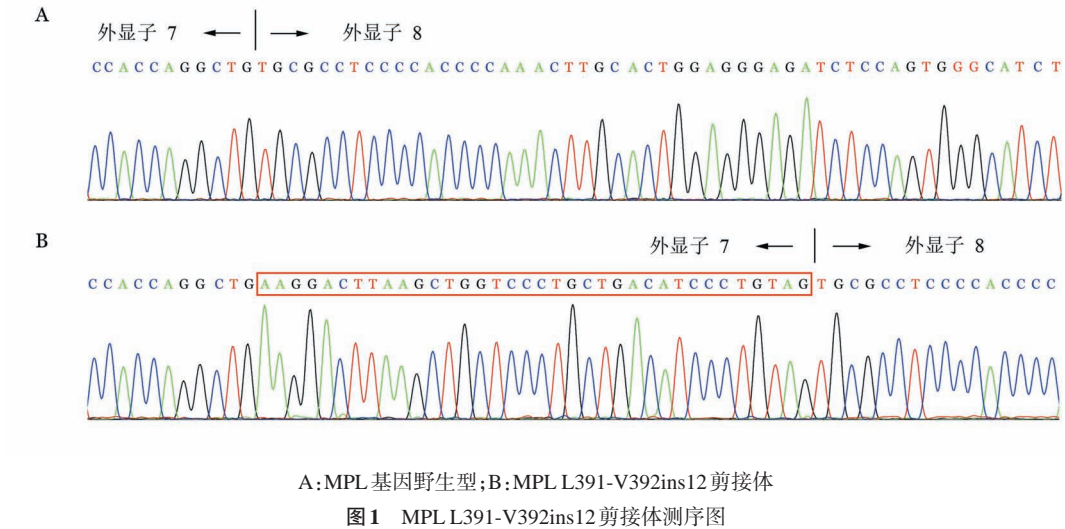
5. PCR:反应体系:10 \times Taq 缓冲液 2.5 μ l、dNTP (10 mmol/L) 0.5 μ l、正向引物(20 μ mol/L) 1 μ l、反向引物(20 μ mol/L) 1 μ l、 MgCl_2 (1.5 mmol/L) 1.5 μ l、cDNA 模板 2.0 μ l、Taq DNA 聚合酶(1 U/ μ l) 1.5 μ l、双蒸水补充至 25 μ l。反应条件: 94°C 3 min 预变性, 95°C 30 s、 60°C 30 s、 72°C 30 s(40 个循环), 72°C 总延伸 10 min。每次扩增均设立阳性、阴性与空白对照。PCR 产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 DH5 α 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。

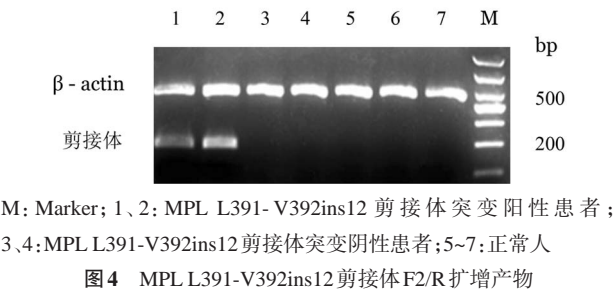
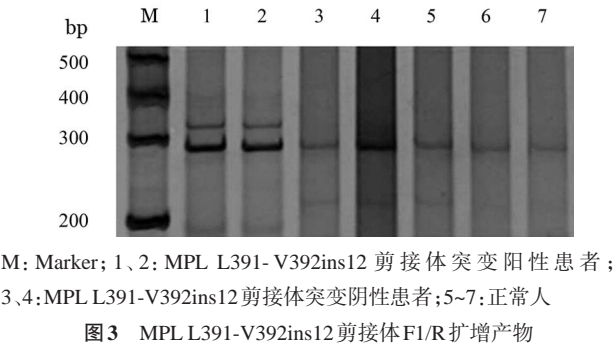
结 果

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



型转录本(211 bp),结果如图 4 所示。



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] Degrolard-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)