

## 原发性血小板增多症研究的新进展

王兆钺

**Advances in research of essential thrombocythemia**  
*Wang Zhaoyue*

Corresponding author: WANG Zhao-yue, Key Lab of Thrombosis and Hemostasis of Ministry of Health, Jiangsu Institute of Hematology, The First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China. Email: zwang11@sina.com

原发性血小板增多症(ET)与真性红细胞增多症(PV)、原发性骨髓纤维化(PMF)同属于骨髓增殖性肿瘤(MPN)。2004年发现JAK2基因V617F突变与多数MPN患者的发病有关,成为MPN研究的一个里程碑。近10年来对MPN的研究又取得了一系列重要的成果。本文主要介绍有关ET分子生物学与临床研究的新进展。

### 一、ET的分子生物学研究进展

JAK2基因14号外显子617位缬氨酸突变为苯丙氨酸(JAK2 V617F)导致了JAK2不依赖细胞因子的持续活化,通过STAT信号途径与其他途径引起骨髓增殖性改变。JAK2 V617F突变见于95%的PV患者以及50%~60%的ET与MF患者<sup>[1]</sup>。为何同一基因突变引起不同临床表型尚不完全清楚。有人发现,JAK基因所位于的染色体9p24区域(9pLOH)易失去杂合性,转变成父或母一方的单亲二体性(disomy),呈“纯合子”状态。如果突变的细胞克隆比例<25%并主要呈现杂合状态,临床表型为ET;而在“纯合子”克隆>50%时则表现为PV<sup>[2-3]</sup>。此外,在JAK2下游的各种信号分子中,STAT1促进巨核细胞生长而抑制红系前体细胞的生成。JAK2 V617F突变ET患者骨髓细胞的STAT1活性比PV患者的骨髓细胞高。Chen等<sup>[4]</sup>在实验中发现,JAK2 V617F突变ET患者的前体细胞STAT1活性明显增高,PV患者前体细胞STAT1活性并无改变;如用基因工程的方法抑制ET前体细胞的STAT1活性,就抑制了巨核细胞的分化并转变为红细胞表型。这项研究有力地证明了STAT1活性对ET与PV不同表型的意义。

近年来对JAK2 V617F阴性ET患者的基因研究获得了显著的进展。3%~5%的JAK2 V617F突变阴性ET患者由血

小板生成素受体(MPL)基因纯合突变引起,导致JAK-STAT信号系统活化以及巨核细胞不依赖细胞因子的增殖<sup>[5]</sup>。与获得性JAK2 V617F突变不同,MPL突变可为遗传性,患者有终身的小血小板增多,并可能有家族史。随着基因研究技术的迅速发展,全外显子测序已成为基因研究一个新的重要方法。利用这一新技术,在60%~88%的JAK2 V617F突变阴性ET和MF患者中检出钙网蛋白(calreticulin, CALR)基因突变,主要为最后一个外显子(9号外显子)的插入和缺失突变<sup>[6-7]</sup>。在正常情况下,CALR抑制巨核细胞生长,但突变的CALR使JAK-STAT信号系统活化,促进了巨核细胞生成<sup>[8]</sup>。此外,个别患者的基因异常可能与DNA甲基化(TET2、DNMT3A、IDH1/2)或染色质结构(EZH2、ASXL)有关。迄今为止,大多数ET患者的基因突变已基本阐明,但仍有10%~15%患者的基因异常尚不清楚。

### 二、ET的临床表现

ET的发病过程缓慢,患者可能仅在体检或因其他疾病行血常规检查时偶然被发现。初始的临床症状常缺乏特异性,表现为乏力、盗汗、皮肤瘙痒、骨痛与体重减轻等。血栓栓塞是最重要的并发症,见于10%~29%的患者,可发生在动脉(脑卒中、一过性缺血发作、心肌梗死、心绞痛等)或静脉(静脉血栓栓塞、视网膜静脉闭塞、脑静脉血栓等)。微血管病往往以红斑性肢痛症为特征。与JAK2 V617F突变比较,CALR基因突变患者发生血栓性事件的概率较低<sup>[9]</sup>。另一方面,ET患者较少发生出血(仅占0.3%),多发生于PLT>1 500×10<sup>9</sup>/L时。ET引起出血的机制尚不清楚,目前认为主要与血管性血友病因子(VWF)相对缺乏或大分子VWF多聚体减少有关。临床表现为皮肤黏膜瘀点或瘀斑、软组织血肿与脏器出血,严重者亦可发生中枢神经系统出血<sup>[9]</sup>。

### 三、实验室检查

ET患者血小板计数明显增高,多数在600×10<sup>9</sup>/L以上。血涂片可见成堆的血小板。骨髓巨核细胞增多,体积增大并呈丛集分布。与JAK2 V617F突变阳性患者比较,CALR基因突变患者的血小板水平较高,而血红蛋白水平与白细胞计数较低<sup>[10]</sup>。MPL基因突变ET患者的血小板计数也较高、血红蛋白水平较低、骨髓增生程度较低,这主要是由于红系增生受抑<sup>[11]</sup>和骨髓纤维化倾向更明显<sup>[12]</sup>所致。JAK2 V617F基因突变检测已成为诊断ET的常规实验室项目,CALR与MPL基因突变检测也正在逐渐推广。

### 四、诊断

随着对ET认识的深入与分子发病机制研究的进展,ET的诊断标准已经过多次修改与补充。目前国内外普遍采用2008年WHO修订的诊断标准,主要内容为:①血小板计数

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.09.020

基金项目:江苏省科教兴卫工程-临床医学中心(ZX201102);江苏省血液病临床医学研究中心(江苏省科技厅生命健康专项-BL2012005)

作者单位:215006 苏州大学附属第一医院、江苏省血液研究所;卫生部血栓与止血重点实验室,血液学协同创新中心

通信作者:王兆钺,Email: zwang11@sina.com

持续 $>450 \times 10^9/L$ ;②骨髓检查示巨核系增生,以成熟的大巨核细胞数量增加为主,无明显粒系或红系增生;③不符合慢性髓性白血病(CML)、PV、MF、骨髓增生异常综合征或其他骨髓增殖性疾病的 WHO 诊断标准;④有 JAK2 V617F 基因或其他克隆标志的表达或无反应性血小板增多的证据。诊断要求符合上述所有 4 项标准<sup>[13]</sup>。WHO 修订的 MPN 诊断标准包括了 JAK2 基因第 12 号外显子与 MPL 基因突变。目前已有许多中心将 CALR 基因突变列为 ET 与 MF 诊断新的分子学指标。有理由相信,在未来 WHO 新的修订的诊断标准过程中也会将 CALR 补充列入。

血小板计数在很多病理状态下都可能明显增高,有时与 ET 难以鉴别。CML 呈特异的 Ph 染色体与 BCR-ABL 融合基因阳性。ET 患者很少有血红蛋白水平增高,男性患者 HGB $>165 g/L$ 、女性患者 HGB $>160 g/L$  时可基本排除 ET,而应诊断为 PV<sup>[14]</sup>。ET 仅有轻度骨髓网状纤维组织增生,在有明显纤维化时应诊断为 MF。此外,反应性血小板增多可见于缺铁性贫血与失血、慢性感染、组织损伤、慢性炎症、肿瘤、溶血与脾切除后等。ET 在儿童相当少见。最近 Randi 等<sup>[15]</sup>报告,在 89 例血小板增多的儿童中,仅 1/4 确定有相关的基因突变,因此对儿童要首先考虑反应性血小板增多。

#### 五、ET 治疗的进展

ET 是一个进展缓慢的造血细胞克隆性疾病,发病后的平均生存期望值可达 14.7 年,因此对患者寿命并无太大的影响<sup>[16]</sup>。治疗的主要目的是预防血栓与出血并发症、减少向 MF 或白血病转化的危险。

低剂量(100 mg/d)阿司匹林可明显减少 PV 患者的血管事件且不增加出血危险,对低血栓危险并且无微血管症状的 ET 患者的疗效不确定。但最近有人报告,阿司匹林可降低 ET 与 PV 患者主要血管病变的风险<sup>[17]</sup>。二磷酸腺苷受体拮抗剂氯吡格雷在 ET 患者的效果不优于阿司匹林,只用于阿司匹林不适用的患者。

羟基脲与干扰素 $\alpha$ 为最常用于控制 PV 与 ET 患者血细胞计数的药物。羟基脲降低血小板效果显著、血栓并发症少、急性不良反应小,是有血栓合并症危险 ET 患者的首选治疗药物。普通干扰素在血液中的半衰期较短,现主张应用长效的聚乙二醇(PEG)-干扰素 2 $\alpha$ 。多数患者在用药 2 个月后缓解,治疗 PV、ET 患者的完全血液学缓解率分别达 76%、77%,并减少 JAK2 V617F 基因突变负荷;部分患者可达分子水平缓解(用 PCR 法不能检出 JAK2 V617F 突变);停用干扰素后仍能维持较长时间的效果,提示大部分有突变的造血干细胞已被清除<sup>[18]</sup>,但最终仍将复发。干扰素对于孕妇是安全的,也无证据显示有促进白血病转化的风险,但少数患者对干扰素反应较大,不能耐受治疗。

白消安亦能有效降低患者血小板计数,但该药有致白血病的危险,故仅适用于老年 ET 患者。

阿那格雷(Anagrelide)为环磷腺苷磷酸二酯酶 III 抑制剂,抑制巨核细胞细胞有丝分裂后的分化与成熟,减少血小板生成,使血小板计数降低。大规模临床研究结果显示,阿

那格雷并不比羟基脲的治疗效果好;阿那格雷可减少静脉血栓栓塞,但仍可能发生动脉血栓、严重出血以及向 MF 转化。

近年来 JAK2 抑制剂 Ruxolitinib 已被美国与欧盟批准为首个治疗 MF 的药物,该药可减轻患者的症状,缩小脾脏,并使寿命延长<sup>[19]</sup>。Ruxolitinib 在对 ET 与 PV 的试验治疗中,也有缓解血液学异常与缩小脾脏的作用。其他 JAK2 抑制剂与组蛋白去乙酰化药物正在研发中。

目前对 ET 尚无标准的治疗方案。国际骨髓纤维化研究与治疗小组根据病情的危险性,推荐用 ET 预后积分(IP-SET)指导治疗:年龄 $\geq 60$  岁为 2 分, WBC $\geq 11 \times 10^9/L$  为 1 分,有血管事件既往史为 1 分,3~4 分为高危,1~2 分为中危,0 分为低危<sup>[20]</sup>。对低危患者,特别是有症状或血栓危险时,应给予低剂量阿司匹林治疗。中-高危患者可选用干扰素或羟基脲,阿那格雷为二线药物。如患者症状恶化或发生血管事件,可联合应用干扰素与羟基脲。对干扰素与羟基脲等降低血小板药物有抵抗或不耐受的 ET 患者,可考虑给予 JAK2 抑制剂 Ruxolitinib<sup>[9]</sup>。

最近 Rampal 等<sup>[21]</sup>用全基因组分析发现,有 JAK2 V617F 突变的 MPN 患者在向白血病转化时常同时有肿瘤蛋白 53(TP53)基因突变,后者不存在于稳定的 JAK2 V617F 突变患者。在小鼠 JAK2 V617F 突变实验中证实,敲除 TP53 基因可导致白血病转化,去甲基化药物地西他宾或 Ruxolitinib 可延长小鼠的生存期,提示这些药物可用于 MPN 白血病转化的治疗。

#### 六、预后

ET 虽属造血系统恶性克隆性疾病,但只要控制外周血小板水平并预防血栓和出血性并发症,患者的寿命可基本不受影响。PV 与 MF 患者的预期寿命相对较短。有症状的 ET 患者的生活质量与生存期较无症状者差。血细胞计数对判断 ET 的预后有重要的参考意义, WBC $>11 \times 10^9/L$  或治疗前 WBC $>16 \times 10^9/L$  时发生出血与血栓的可能性明显增加。Abdulkarim 等<sup>[22]</sup>发现,如患者在就诊时血红蛋白水平较低或白细胞计数增高,转化为 MF 与白血病的危险明显增加,骨髓增生明显活跃或网硬蛋白增多也是独立的危险因素。ET 转变为 MF 的概率为 9.9%,发生白血病转化的概率为 3.8%<sup>[23]</sup>。ET 转化为急性白血病后,对化疗反应极差,中位生存期仅 2.6~5.0 个月;有 CALR 突变的 ET 患者平均生存期可达 20.2 年,但如合并有 ASXL1 突变则预后不良;无 JAK2 V617F、CALR、MLP 基因突变的“三阴性”ET 患者生存期反而较短<sup>[9]</sup>。

#### 参考文献

- [1] Chen E, Mullally A. How does JAK2V617F contribute to the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms? [J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2014, 2014(1):268-276.
- [2] 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.

- [3] Vainchenker W, Constantinescu SN. JAK/STAT signaling in hematological malignancies [J]. *Oncogene*, 2013, 32(21):2601-2613.
- [4] Chen E, Beer PA, Godfrey AL, et al. Distinct clinical phenotypes associated with JAK2V617F reflect differential STAT1 signaling [J]. *Cancer Cell*, 2010, 18(5):524-535.
- [5] Chaligné R, Tonetti C, Besancenot R, et al. New mutations of MPL in primitive myelofibrosis: only the MPL W515 mutations promote a G1/S-phase transition [J]. *Leukemia*, 2008, 22(8):1557-1566.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] Vannucchi AM, Rotunno G, Bartalucci N, et al. Calreticulin mutationspecific immunostaining in myeloproliferative neoplasms: pathogenetic insight and diagnostic value [J]. *Leukemia*, 2014, 28(9):1811-1818.
- [9] Geyer HL, Mesa RA. Therapy for myeloproliferative neoplasms: when, which agent, and how? [J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2014, 2014(1):277-286.
- [10] Rumi E, Pietra D, Ferretti V, et al. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes [J]. *Blood*, 2014, 123(10):1544-1551.
- [11] 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.
- [12] Rumi E, Pietra D, Guglielmelli P, et al. Acquired copy-neutral loss of heterozygosity of chromosome 1p as a molecular event associated with marrow fibrosis in MPL-mutated myeloproliferative neoplasms [J]. *Blood*, 2013, 121(21):4388-4395.
- [13] Spivak JL, Silver RT. The revised World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocytosis, and primary myelofibrosis: an alternative proposal [J]. *Blood*, 2008, 112(2):231-239.
- [14] Barbui T, Thiele J, Carobbio A, et al. Discriminating between essential thrombocythemia and masked polycythemia vera in JAK2 mutated patients [J]. *Am J Hematol*, 2014, 89(6):588-590.
- [15] Randi ML, Geranio G, Bertozzi I, et al. Are all cases of paediatric essential thrombocythemia really myeloproliferative neoplasms? Analysis of a large cohort [J]. *Br J Haematol*, 2015, 169(4):584-589.
- [16] Barbui T, Thiele J, Passamonti F, et al. Survival and disease progression in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: an international study [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(23):3179-3184.
- [17] Michiels JJ, Berneman Z, Gadisseur A, et al. Aspirin-responsive, migraine-like transient cerebral and ocular ischemic attacks and erythromelalgia in JAK2-positive essential thrombocythemia and polycythemia vera [J]. *Acta Haematol*, 2015, 133(1):56-63.
- [18] Larsen TS, Møller MB, de Stricker K, et al. Minimal residual disease and normalization of the bone marrow after long-term treatment with alpha-interferon2b in polycythemia vera. A report on molecular response patterns in seven patients in sustained complete hematological remission [J]. *Hematology*, 2009, 14(6):331-334.
- [19] Harrison C, Kiladjian JJ, Al-Ali HK, et al. JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis [J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(9):787-798.
- [20] Passamonti F, Thiele J, Girodon F, et al. A prognostic model to predict survival in 867 World Health Organization-defined essential thrombocythemia at diagnosis: a study by the International Working Group on Myelofibrosis Research and Treatment [J]. *Blood*, 2012, 120(6):1197-1201.
- [21] Rampal R, Ahn J, Abdel-Wahab O, et al. Genomic and functional analysis of leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(50):e5401-e5410.
- [22] Abdulkarim K, Ridell B, Johansson P, et al. The impact of peripheral blood values and bone marrow findings on prognosis for patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera [J]. *Eur J Haematol*, 2011, 86(2):148-155.
- [23] Tefferi A, Guglielmelli P, Larson DR, et al. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis [J]. *Blood*, 2014, 124(16):2507-2513.

(收稿日期:2015-03-13)

(本文编辑:徐茂强)