

150例原发性血小板增多症患者CALR基因突变检测及临床观察

张修文 周民 晁红颖 卢绪章 岑岭

【摘要】 目的 研究原发性血小板增多症(ET)患者CALR基因突变情况,比较其与JAK2 V617F、MPL W515K突变及三种突变阴性患者部分临床参数的差异。**方法** 采用基因组DNA-PCR扩增产物直接测序法检测150例ET患者CALR基因9号外显子及MPL W515K突变;采用等位基因特异性PCR检测JAK2 V617F突变检出情况。**结果** ①150例ET患者中共检出CALR突变38例(25.3%), I型(c.1092_1143del52bp)17例, II型(c.1154_1155insTTGTC)16例, III型(c.1094_1139del46bp)4例, IV型(c.1103_1136del34bp)1例。②JAK2 V617F和MPL W515K的突变检出率分别为61.3%(92/150)和2.7%(4/150);54例JAK2 V617F及MPL W515K突变阴性患者中CALR突变检出率为70.4%(38/54),未检测到任何两种基因突变共存。③CALR突变组的外周血白细胞和血红蛋白水平低于JAK2 V617F突变组($P<0.05$),中位年龄为59(29~89)岁,高于三种突变阴性组的29.5(16~67)岁($P<0.01$);147例患者有染色体核型分析结果,其中4例存在核型异常,异常核型与正常核型患者中CALR基因突变检出率分别为75.0%(3/4)、24.5%(35/143),差异有统计学意义($P=0.019$)。**结论** CALR突变在JAK2 V617F及MPL W515K突变阴性的ET患者中有较高的检出率,并与异常核型相关;CALR突变组外周血白细胞和血红蛋白水平低于JAK2 V617F突变组。

【关键词】 血小板增多,原发性; 钙网蛋白; DNA突变分析

CALR gene mutation detection and clinical observation of 150 essential thrombocythemia patients
Zhang Xiuwen, Zhou Min, Chao Hongying, Lu Xuzhang, Cen Ling. Department of Hematology, the Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Changzhou No.2 People's Hospital, Changzhou 213003, China

Corresponding author: Chao Hongying, Email: chaohy2006@126.com

【Abstract】 Objective To explore the prevalence of CALR gene mutations and the mutation types in patients with essential thrombocythemia (ET), and to compare the patients clinical characteristics of CALR mutation with JAK2 V617F, MPL W515K mutation patients and triple negative group. **Methods** The mutations of CALR gene at exon 9 and MPL W515K in 150 ET patients were detected by PCR amplification followed by direct sequencing of genomic DNA, the JAK2 V617F mutation by using allele specific PCR. **Results** ①The CALR mutations were found in 38 patients (25.3%) of 150 ET patients. A total of 4 types of CALR mutations were identified (type I c.1092_1143del52bp, $n=17$; type II c.1154_1155insTTGTC, $n=16$; type III c.1094_1139del46bp, $n=4$; type IV c.1103_1136del34bp, $n=1$). ②The incidence of JAK2 V617F and MPL W515K was 61.3% (92/150) and 2.7% (4/150), respectively. The frequency of CALR mutation was 70.4% (38/54) in 54 ET patients without JAK2 V617F and MPL W515K mutations. The co-occurrence of any two kinds of gene mutations was not detected. ③The hemoglobin level and leukocyte counts of patients with CALR mutations were significantly lower than that in patients with JAK2 V617F mutations ($P<0.05$). The median age of patients with CALR mutation was significantly higher than that of triple negative patients (59 years vs 29.5 years, $P<0.01$). Cytogenetic analysis was performed in 147 patients, and there were 4 abnormal karyotype cases. CALR mutation incidence was significantly higher in abnormal karyotype cases than that in normal ones (75% vs 24.5%, $P=0.019$). **Conclusions** The incidence of CALR mutations is high in ET patients without JAK2 V617F and MPL W515K mutations, and is associated with abnormal karyotype. CALR-mutated cases showed a significantly lower leucocyte and hemoglobin levels compared with JAK2 V617F mutated cases.

【Key words】 Thrombocythemia, essential; Calreticulin; DNA mutational analysis

基因突变是原发性血小板增多症(ET)发病机制的重要一环,也是ET患者的重要诊断依据及预后评价指标之一^[1]。既往研究表明,50%~60%的ET患者存在 JAK2 V617F 突变^[2-5],3%~5%的ET患者存在 MPL W515K 突变^[6-7],但仍有40%~50%的ET患者未检测到以上突变,这提示可能存在其他的一些潜在的未知基因事件。最近,国外研究者发现在 JAK2 V617F 及 MPL W515K 突变阴性ET患者中,钙网蛋白(CALR)基因9号外显子突变检出率高达67%^[8]。在我国 JAK2 V617F 及 MPL W515K 突变阴性ET患者中,CALR 基因9号外显子突变检出率为52.1%~57.6%^[9-11],但临床意义尚未完全明确。本研究中,我们检测150例ET患者CALR 基因9号外显子突变,初步观察其临床意义,并与 JAK2 V617F、MPL W515K 突变及三种突变阴性患者的部分临床参数进行比较。

病例和方法

1. 病例:2006年12月至2014年7月于常州市第二人民医院门诊及住院治疗的ET患者150例,其中男69例,女81例,中位年龄56(16~89)岁。

2. 基因组DNA的制备:取患者骨髓或外周血,参照文献^[12]方法用DNA提取试剂盒(美国Gentra公司产品)抽取基因组DNA。根据260 nm处吸光度(A)确定DNA浓度。用DNA稀释液将基因组DNA样品稀释至50 ng/ μ l。所有患者均知情同意。

3. CALR 基因扩增:参照文献^[8]方法扩增 CALR 基因9号外显子。CALR 基因的正义引物序列:5'-CCTGCAGGCAGCAGAGAAAC-3',反义引物序列:5'-ACAGAGACATTATTTGGCGCG-3'。反应体系50 μ l:Tag PCR Master Mix 25 μ l[3 mmol/L MgCl₂、500 μ mol/L 脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)、0.1 U/ μ l DNA Tag 聚合酶、20 mmol/L Tris-HCl(pH 8.3)、100 mmol/L KCl],正义引物(10 μ mol/L)2 μ l,反义引物(10 μ mol/L)2 μ l,模板DNA 4 μ l,用去离子水补至50 μ l。PCR 条件:94 $^{\circ}$ C 预变性5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,62 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,36个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物经15 g/L 琼脂糖凝胶电泳后,用凝胶成像仪拍照。所有扩增产物在上海华津生物科技有限公司进行直接测序。

4. JAK2 V617F 及 MPL W515K 突变检测:参照

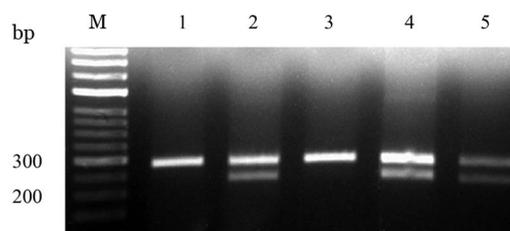
文献^[13]采用等位基因特异性PCR检测所有标本的 JAK2 V617F 突变;参照文献^[14]采用基因组DNA-PCR联合直接测序法检测 MPL W515K 突变(在上海华津生物科技有限公司完成)。

5. 染色体核型分析:采用常规R显带技术进行核型分析。

6. 统计学处理:结果均采用SPSS18.0软件分析。计数资料采用卡方检验或Fisher确切概率法,计量资料采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1. CALR 基因突变分析:CALR 基因9号外显子目标片段扩增长度为286 bp,扩增后凝胶电泳结果见图1。本组150例ET患者中38例(25.3%)检出 CALR 基因9号外显子突变,包括 I 型(c.1092_1143del52bp)(图2A)17例(44.7%)、II型(c.1154_1155insTTGTC)(图2B)16例(42.1%)、III型(c.1094_1139del46bp)(图2C)4例(10.5%)、IV型(c.1103_1136del134bp)(图2D)1例(2.7%)。



M:Marker;1:阴性对照;2-5:突变I~IV型

图1 CALR 基因PCR产物琼脂糖凝胶电泳图

2. CALR 基因不同突变类型ET患者的临床特征比较:I型与II、III型突变的患者在WBC、PLT、HGB、性别和年龄比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。II型患者的WBC低于III型($P = 0.012$),PLT、HGB、性别和年龄差异均无统计学意义($P > 0.05$)(表1)。IV型突变为1例49岁女性,未纳入统计分析。

3. CALR 基因突变与 JAK2 V617F、MPL W515K 突变及三种突变阴性患者的临床参数比较:本组150例ET患者中检出 JAK2 V617F 突变92例(61.3%)、MPL W515K 突变4例(2.7%)。JAK2 V617F 和 MPL W515K 突变均阴性的54例患者中38例(70.4%)检出 CALR 突变。未检测到任何两种

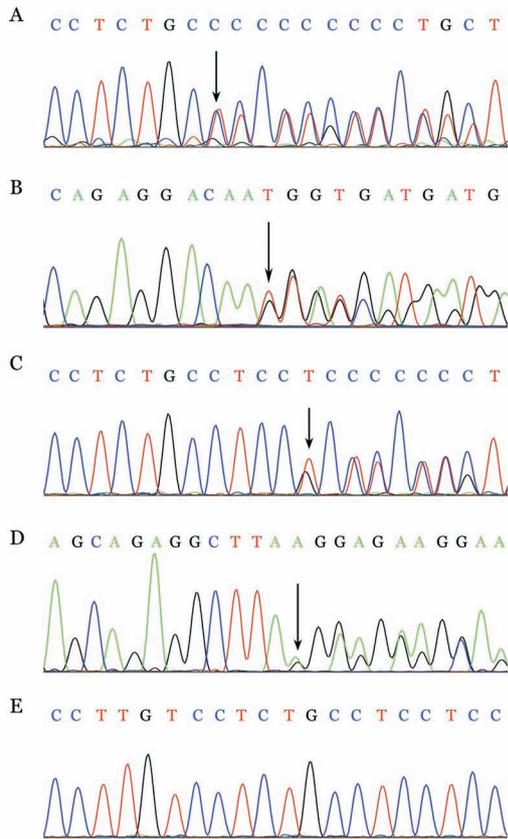
基因突变共存。CALR突变组的WBC和HGB低于JAK2 V617F突变组($P<0.05$),但两组患者PLT、性别和年龄差异无统计学意义($P>0.05$);与MPL W515K突变组相比,在WBC、PLT、HGB、性别和年

龄方面差异均无统计学意义($P>0.05$)。CALR突变组患者的中位年龄为59(48~61)岁,高于三种突变阴性患者的中位年龄29.5(16~67)岁($P<0.01$),但两组在WBC、PLT、HGB及性别方面差异无统计学意义($P>0.05$)(表2)。

4. CALR突变与染色体核型:147例患者进行了染色体核型分析,其中4例存在核型异常:45,XX,rob(13;14)[4];46,XX,t(4;6)(q26;q27)[10];46,XX,del(20)(q11)[10];46,XY,t(3;12)[10]。CALR突变在异常核型和正常核型患者中的检出率分别为75.0%(3/4)和24.5%(35/143),差异有统计学意义($P=0.019$)。

讨 论

ET是一种以巨核细胞系增生为主的多能造血干细胞克隆性疾病,主要表现为血小板持续性增多,伴有出血、血栓形成,肝脾轻至中度肿大。JAK2 V617F高频点突变及随后发现的MPL W515K、TET2等基因突变仅占ET患者的50%~60%^[6,15-16],并不能解释所有ET患者的致病原因。随着分子生物学的研究进展及二代测序技术的广泛应用,2013年12月,国外学者在JAK2 V617F及MPL W515K阴性的ET患者的CALR基因9号外显子区检测到高频突变,检出率达67%^[8]。CALR基因由8个内含子和9个外显子组成,定位于人类染色体19p13.2,编码的钙网蛋白为主要存在于真核细胞内质网中的Ca²⁺结合蛋白,对维持细胞内Ca²⁺稳态起主要作用,能与糖皮质激素蛋白受体、雄激素受体等核激素受体结合^[17-19],具有调节基因转录、协



A: I型(c.1092_1143del52bp); B: II型(c.1154_1155insTTGTC); C: III型(c.1094_1139del46bp); D: IV型(c.1103_1136del34bp); E:野生型

图2 原发性血小板增多症患者CALR基因9号外显子突变测序结果(箭头所示为突变位点)

表1 不同亚型CALR基因突变原发性血小板增多症患者的临床特征[M(范围)]

突变类型	例数(男/女)	年龄(岁)	WBC($\times 10^9/L$)	HGB(g/L)	PLT($\times 10^9/L$)
I型	7/10	56(30~89)	8.29(4.17~45.70)	125(73~163)	869(543~1 421)
II型	5/11	62.5(29~83)	7.90(3.41~17.60)	112(54~147)	841(330~2 053)
III型	3/1	56(47~71)	13.95(8.26~15.87) ^a	116(113~121)	966(752~1 037)

注:与II型比较,^a $P=0.012$

表2 CALR、JAK2、MPL基因突变组及三种突变阴性组原发性血小板增多症患者的临床特征[M(范围)]

组别	例数	年龄(岁)	WBC($\times 10^9/L$)	HGB(g/L)	PLT($\times 10^9/L$)
CALR突变	38	59(29~89)	8.46(3.41~45.70)	118(54~163)	898(330~2 053)
JAK2突变	92	57(17~86)	12.90(4.10~99.00) ^a	134.5(85~187) ^a	861.5(400~2 016)
MPL突变	4	59(48~61)	11.35(10.70~15.20)	136(124~141)	885(881~906)
三种突变阴性	16	29.5(16~67) ^a	8.96(4.39~37.28)	123.5(66~188)	969.5(561~1 683)

注:与CALR突变组比较,^a $P<0.05$

助蛋白质加工折叠、抑制肿瘤血管新生、参与抗原递呈及细胞凋亡等功能^[20-23]。CALR 基因的移码突变可导致其编码的氨基酸序列发生变化进而影响其与 Ca²⁺和核激素受体结合,影响 Ca²⁺信号通路及基因表达,导致细胞发生致瘤性转化,但 CALR 基因突变导致 ET 的具体发病机制仍未完全阐明。

国外大样本研究结果表明,CALR 突变在 ET 患者中的检出率为 15.5%~28%,在 JAK2 V617F 与 MPL W515K 突变阴性 ET 患者中检出率为 48.9%~70.0%^[8,24-25]。国内学者报道 CALR 突变在 ET 患者中总的检出率为 22.7%~31.1%,在 JAK2 V617F 与 MPL W515K 突变阴性的 ET 患者中检出率为 52.1%~57.6%^[9-11,26]。本研究中 CALR 突变在 ET 患者中的检出率为 25.3%,JAK2 和 MPL 突变阴性 ET 患者中 CALR 突变检出率为 70.4%,与国内外报道基本一致。目前检测到的 CALR 突变有 36 种,主要为 I 型突变(约占 CALR 突变总数的 53%)和 II 型突变(占 CALR 突变总数的 31.0%)^[8]。本组 ET 患者 CALR 突变检出率与国内外报道基本一致,但仅检测到 4 种突变类型,原因可能是标本量相对较少,且其他 30 余种突变类型检出率较低有关。

在多个研究中,CALR 基因突变不与 JAK2 V617F、MPL W515K 突变共存^[8-11,27],我们在本组病例中亦未检测到任何两种基因突变共存。然而最近有研究者在部分 ET 患者中检测到 CLAR 与 JAK2 V617F 双突变,但并未影响患者的诊断及治疗选择,其临床表型及预后意义尚不明确^[28]。国外对伴有 CALR 两种主要突变类型的 ET 患者的临床特征观察显示:I 型突变与 II 型突变比较,男性所占比例及年龄较高,血小板计数较低,但白细胞计数和血红蛋白水平差异无统计学意义^[24]。国外研究资料显示:与 JAK2 突变患者相比,CALR 突变的 ET 患者男性比例和血小板计数较高,年龄、白细胞计数、血红蛋白水平较低;CALR 突变组的男性比例高于 MPL 突变组,但两组在年龄、白细胞计数、血红蛋白水平和血小板计数方面差异无统计学意义^[25]。国内多个研究小组观察资料显示,与 JAK2 突变组相比,CALR 突变 ET 患者血小板计数较高,年龄、白细胞计数和血红蛋白水平较低^[9-11]。本研究中,CALR 突变组的白细胞计数和血红蛋白水平低于 JAK2 V617F 突变组,但血小板计数、年龄和性别差异无统计学意义。CALR 突变组与 MPL 突变组及三种突变阴性组在性别、年龄、白细胞计数、血红蛋白水平和血小板计数方面差异均无统计学意

义。I 型与 II 型突变患者在性别、年龄、白细胞计数、血小板计数和血红蛋白水平方面差异无统计学意义,可能与标本量较少有关,但也不排除存在其他未知基因事件。

目前,CALR 基因突变与染色体核型的相关性尚未见大宗资料报道。我们的结果显示,异常核型 ET 患者的 CALR 突变检出率显著高于正常核型,检出 CALR 突变的核型异常涉及 4、6、13、14、20 等多条染色体,未见特异染色体异常。其他研究未发现异常核型 ET 患者的 CALR 突变检出率与正常核型有显著差异^[25],可能与其标本量较少有关。

综上所述,CALR 基因突变是 ET 患者中继 JAK2、MPL 等基因突变后的又一重要基因事件,且在 JAK2 V617F 或 MPL W515K 突变阴性的 ET 患者中有较高的检出率,因此 CALR 基因突变有望作为 ET 患者的一个新的诊断指标,但仍需进一步研究来确定其可靠性及临床价值。

参考文献

- [1] Al Assaf C, Lierman E, Devos T, et al. Screening of JAK2 V617F and MPL W515 K/L negative essential thrombocythaemia patients for mutations in SESN2, DNAJC17, ST13, TOP1MT, and NTRK1 [J]. *Br J Haematol*, 2014, 165 (5):734-737.
- [2] Tefferi A. Mutational analysis in BCR-ABL- negative classic myeloproliferative neoplasms. impact on prognosis and therapeutic choices[J]. *Leuk Lymphoma*, 2010, 51 (4):576-582.
- [3] Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, et al. Clinical implications of the JAK2 V617F mutation in essential thrombocythemia [J]. *Leukemia*, 2005, 19 (10):1847-1849.
- [4] Campbell PJ, Scott LM, Buck G, et al. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study [J]. *Lancet*, 2005, 366 (9501): 1945-1953.
- [5] Wolanskyj AP, Lasho TL, Schwager SM, et al. JAK2 mutation in essential thrombocythaemia: clinical associations and long-term prognostic relevance[J]. *Br J Haematol*, 2005, 131 (2):208-213.
- [6] 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.
- [7] Guglielmelli P, Pancrazzi A, Bergamaschi G, et al. Anaemia characterises patients with myelofibrosis harbouring Mpl mutation [J]. *Br J Haematol*, 2007, 137 (3):244-247.
- [8] 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.
- [9] Qiao C, Sun C, Ouyang Y, et al. Clinical importance of different

- calreticulin gene mutation types in wild-type JAK2 essential thrombocythemia and myelofibrosis patients [J]. *Haematologica*, 2014, 99(10):e182-184.
- [10] Shen H, Chao H, Ding Z, et al. CALR and ASXL1 mutation analysis in 190 patients with essential thrombocythemia [J]. *Leuk Lymphoma*, 2015, 56(3):820-822.
- [11] Fu R, Xuan M, Zhou Y, et al. Analysis of calreticulin mutations in Chinese patients with essential thrombocythemia: clinical implications in diagnosis, prognosis and treatment [J]. *Leukemia*, 2014, 28(9):1912-1914.
- [12] 费海荣, 张日, 陈苏宁, 等. 骨髓增殖性疾病 137 例患者 JAK2 基因突变的研究[J]. *中华内科杂志*, 2007, 46(4): 271-273.
- [13] 姜乃可, 贾祝霞, 晁红颖, 等. 骨髓增生异常综合征患者 IDH、JAK2、FLT3 NPM1 和 c-KIT 基因突变的综合检测与分析[J]. *中华血液学杂志*, 2012, 33(7):578-581.
- [14] 傅建非, 薄兰君, 熊红, 等. 慢性骨髓增殖性肿瘤患者 MPL 基因突变研究[J]. *中华血液学杂志*, 2009, 30(9): 634-637.
- [15] 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.
- [16] Pronier E, Delhommeau F. Role of TET2 mutations in myeloproliferative neoplasms [J]. *Curr Hematol Malig Rep*, 2012, 7(1): 57-64.
- [17] Gold LI, Eggleton P, Sweetwyne MT, et al. Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease [J]. *FASEB J*, 2010, 24(3):665-683.
- [18] Wang WA, Groenendyk J, Michalak M. Calreticulin signaling in health and disease [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44(6): 842-846.
- [19] Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, et al. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum [J]. *Biochem J*, 2009, 417(3):651-666.
- [20] Chao MP, Majeti R, Weissman IL. Programmed cell removal: a new obstacle in the road to developing cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 12(1):58-67.
- [21] Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, et al. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(12):860-875.
- [22] Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, et al. Cancer genome landscapes [J]. *Science*, 2013, 339(6127): 1546-1558.
- [23] Pang WW, Pluvinaige JV, Price EA, et al. Hematopoietic stem cell and progenitor cell mechanisms in myelodysplastic syndromes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(8):3011-3016.
- [24] Tefferi A, Wassef EA, Guglielmelli P, et al. Type 1 versus Type 2 calreticulin mutations in essential thrombocythemia: a collaborative study of 1027 patients [J]. *Am J Hematol*, 2014, 89(8): E121-124.
- [25] 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.
- [26] Wu Z, Zhang X, Xu X, et al. The mutation profile of JAK2 and CALR in Chinese Han patients with Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms [J]. *J Hematol Oncol*, 2014, 7:48.
- [27] 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.
- [28] McGaffin G, Harper K, Stirling D, et al. JAK2 V617F and CALR mutations are not mutually exclusive; findings from retrospective analysis of a small patient cohort [J]. *Br J Haematol*, 2014, 167(2):276-278.

(收稿日期:2014-11-14)

(本文编辑:徐茂强)

·读者·作者·编者·

关于重视引用国内文献的意见

部分作者在撰写论文时,只引用国外文献(或非中文语种的文献)。诚然,在医学的许多领域,国内的研究水平确实有待提高,有引用国外文献的必要。但是,不引用国内相关文献,将存在以下问题:①作者没有阅读国内文献,这样作者阅读的文献就不全面,作者所撰写的论文、综述等的科学性、先进性就值得商榷。②不引用国内文献,就不能准确、全面地反映国内的研究水平和进展,毕竟本刊发表的文章主要的阅读对象是中国医师。③有的作者虽然阅读了国内文献,但未引用。不引用国内文献的想法可能更为复杂,如轻视或忽略国内同行,或暗示首创权。除非是专门的国外医学文摘或国外文献综述,均应有国内文献的复习、引用和注解。本刊倡导在论文的撰写中应维护参考文献的科学性,鼓励作者在引用国外文献的同时检索并引用国内相关的文献。

本刊编辑部