

大小修剪贴膜,待酒精干后按伤口形状大小将修剪好的贴膜粘贴,暴露伤口,按创面形状深浅修剪海绵或海绵条,盖于创面。将引流管有侧孔的一端插入海绵,另一端由创面旁皮肤引出,将有引流管的海绵敷料与创面完全接触,深创面多块重叠覆盖,不留空隙,将生物透性贴膜封闭整个创面。将引流管通过连接管、引流瓶、过滤器连于智能负压泵,设定负压值为 80 ~ 120 mmHg。工作模式设定为启动 5 min,间歇 2 min 的周期性间断负压。打开负压吸引器开关,观察医用海绵及外层贴膜有否塌陷,判断封闭装置有否漏气,以保证负压吸引效果。如果有多处伤口,可用三通接头连接引流管至负压吸引仪。

**1.4 疗效评定标准** 我们根据以往的治疗经验并参考相关文献,将治疗效果拟定为:(1)痊愈(溃疡愈合)。治疗 12 周内创面 100% 愈合。(2)显效。治疗 12 周后溃疡愈合面积 > 80%。(3)有效。治疗 12 周后溃疡愈合面积 > 40%。(4)无效。治疗 12 周后溃疡愈合面积 < 40%。愈合 + 显效 + 有效为总有效率。

## 2 结果

应用 NPWT 治疗患者 104 例,治疗周期最长 15 ~ 120 (28.3 ± 20.1) d。其中(1)痊愈(愈合)31 例(29.81%);(2)显效 55 例(52.88%);(3)有效 13 例(12.5%);(4)无效 5 例(4.8%),总有效率达 95.19%。

## 3 讨论

**3.1 应用 NPWT 治疗糖尿病皮肤慢性溃疡创面代替了传统的反复清创和换药,可以增加创面局部的血液循环,刺激局部肉芽组织增生,封闭负压可以清除创面的坏死组织、渗液和细菌,使创面获得清洁的环境。组织学检查证实,负压封闭引流的创面淋巴细胞浸润消退较快,增生期胶原合成较早,修复期可见收缩性纤维合成增强<sup>[1]</sup>。同时将创面与外界隔离,减少了感染的机会,促进了创面愈合,减少了并发症的**

发生。

**3.2 我们经过临床应用及观察体会到 NPWT 比传统的负压引流方法具有以下优点:**(1)负压作用均匀、广泛、高效。(2)海绵可以与整个创面充分的接触,引流管完全被海绵包埋,引流物首先被医用海绵微孔分割后再吸入引流管,克服了传统创面引流中引流管与创面直接接触导致的引流不充分极易堵管的缺点。本组治疗中由于我们巡视观察到位,极少发生引流管堵塞、负压失效的情况。(3)创面用生物透性膜封闭,使创面与外界隔开,构成一道防止细菌入侵的屏障,有效地预防了常规换药和引流导致的污染与感染<sup>[2]</sup>。(4)一次负压封闭引流可以保持 3 ~ 7 d 的引流效果,不需每天换药,既减轻了频繁换药给患者带来的痛苦,也减轻了医务人员的工作量。(5)有效地缩短了住院时间,减少了换药次数,降低了治疗总费用<sup>[3]</sup>。(6)操作简单易行,不需麻醉,可在床旁进行。

**3.3 NPWT 是一种处理糖尿病皮肤慢性溃疡创面的全新方法。其操作简便、安全,易于掌握,疗效远优于常规治疗。应该指出,这种治疗方法是一种纯物理方法,完全避免了各种化学治疗(例如抗生素治疗)可能引致的副作用,较常规开放式换药,具有创面愈合快、感染率低、更换敷料次数少等优点。**

## 参考文献

- 1 裘华德. 负压封闭引流技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2003:85-242.
  - 2 姚元章,黄显凯,麻晓林,等. 负压封闭技术治疗创伤后软组织缺损[J]. 创伤外科杂志,2002,4(1):9-12.
  - 3 崔泽龙,丁爱国. 负压封闭引流并吸附材料治疗难治性创面 40 例[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2008,12(41):8115-8118.
- [收稿日期 2011-08-11][本文编辑 黄晓红 韦颖]

## 新进展综述

# JAK2V617F 基因突变与骨髓增殖性肿瘤关系

桑宝华(综述), 杨跃煌, 温柏平(审校)

作者单位: 671000 云南,大理学院临床医学院(桑宝华); 651000 云南,昆明医学院附属儿童医院(杨跃煌,温柏平)

作者简介: 桑宝华(1985-),男,在读硕士研究生,住院医师,研究方向:小儿血液。E-mail:sangbaohua@126.com

通讯作者: 杨跃煌(1956-),男,医学硕士,教授,研究生导师,主任医师,研究方向:小儿血液。E-mail:yangyuhu416@tom.com

**[摘要]** 长期以来,除慢性髓系白血病的发病与 BCR-ABL 融合基因有关外,其他骨髓增殖性肿瘤(MPNs)的发病机制仍不清楚,近年来大量研究证实,在多种 MPNs 中存在较高的 JAK2 基因突变率,并认为该突变可能是 BCR-ABL 阴性 MPNs 所特有的分子标志。该文就近年来对 JAK2 基因突变、MPNs 的最新诊断和靶向治疗等方面的研究进展进行综述。

万方数据

[关键词] JAK2; JAK2V617F; 突变; 骨髓增殖性肿瘤; JAK2 抑制剂; 靶向治疗  
[中图分类号] R 551.3 [文献标识码] A [文章编号] 1674-3806(2011)12-1195-04  
doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2011.12.41

**JAK2V617F mutations and myeloproliferative neoplasms** SANG Bao-hua, YANG Yue-huang, WEN Bo-ping.  
Clinical Medical College of Dali University, Yunnan 671000, China

[Abstract] Over the years, with the exception of chronic myeloid leukemia where pathogenesis was found to be related with BCR-ABL fusion genes, the other MPNs' pathogenesis remains unclear. In recent years, numerous studies confirm that high rates of mutation of JAK2 gene exists in multiple MPNs, and that the mutation may be the characteristic molecular markers of BCR-ABL negative MPNs. In this paper, the research progress on JAK2 mutations, latest diagnosis and targeted therapy of MPNs and so on in recent years are reviewed.

[Key words] JAK2; JAK2V617F; Mutation; Myeloproliferative neoplasms; JAK2 Inhibitors; Targeted therapy

骨髓增殖性肿瘤(MPNs)是一类起源于多能造血干细胞,以一系或多系分化相对成熟的骨髓细胞克隆性增生异常为特点的一组异质性疾病的统称<sup>[1]</sup>。正由于其具有肿瘤性疾病的特征,在2008年新修订的WHO慢性髓系肿瘤分类中将既往沿用多年的“慢性骨髓增殖性疾病(CMPD)”旧称更名为“骨髓增殖性肿瘤”。近年来,越来越多的研究与论述已将JAK2V617F在BCR-ABL阴性MPNs中的发病机制阐述得相当完整。下面就JAK2V617F基因突变与骨髓增殖性肿瘤的关系综述如下。

## 1 JAK2蛋白与JAK2V617F基因突变

**1.1 JAK2蛋白** JAK2基因位于染色体9p24,于1989年首次被克隆<sup>[2]</sup>。JAK2蛋白属于JAK家族酪氨酸激酶(JAKs),是一类胞质内可溶性(非受体型)酪氨酸蛋白激酶。在哺乳动物细胞中,JAKs至少有4个成员:JAK1、JAK2、JAK3和TYK2,它们在进化中保持着高度的保守性,除JAK3的表达主要局限于髓样组织及淋巴样组织<sup>[3]</sup>外,JAK1、JAK2、TYK2几乎在所有组织中表达。同其他成员一样,JAK2蛋白含有1个有活性的酪氨酸激酶结构域-JAK同源区1(JH1),1个无催化活性的结构域-JAK同源区2(JH2),1个SRC同源区2结构域(SH2)和一个可以结合1型细胞因子受体的氨基末端FERM区结构域。JAK2蛋白在激素样细胞因子(EPO, GH, PRL, TPO)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(CM-CSF)及白细胞介素3(IL-3)受体信号转导通路中,对促进或调节细胞的增殖发挥重要作用<sup>[4]</sup>。正常生理情况下,在无配体时,受体与野生型JAK2蛋白结合,形成无活性的二聚体,不产生信号,造血祖细胞不发生增生;当配体与受体结合时,就会诱导构象发生变化,JAK2蛋白就和可催化酪氨酸磷酸化的受体胞浆区结合,导致由Janus激酶、信号转导子和转录激活子(STAT)、磷脂酰肌醇3激酶(PII3K)以及RAS与丝裂原活化蛋白激酶(RAS-MAPK)组成的分子通路的激活(即磷酸化),同源二聚体化并转移到核内,在那里它们起转录因子的作用。Nakamura等认为在造血细胞中,JAK2蛋白的酪氨酸激酶功能结构域具有转导有丝分裂信号的能力,这种转导是通过STAT5完成的<sup>[5]</sup>,STAT5被激活的主要作用表现为

刺激髓系细胞的增殖和分化<sup>[6]</sup>。因此JAK2蛋白极有可能在造血细胞抗凋亡信号的转导中起着重要作用。

**1.2 JAK2V617F基因突变** 自2005年起,多个研究小组先后报道了在许多MPNs患者中存在特定的JAK2V617F点突变—JAK2基因1849位核苷酸G→T突变,这种突变发生在JH2结构域,导致JH2 617位的缬氨酸错义编码为苯丙氨酸。此结构域在正常情况下起到抑制JAK2蛋白激酶活性的作用,发生突变后其抑制作用减弱,从而使JAK2蛋白激酶活性明显增强<sup>[7]</sup>。Levine等<sup>[8]</sup>的研究表明真性红细胞增多症(PV)患者JAK2V617F突变起源于造血干/祖细胞水平,疾病累及髓系、红系和巨核系,但原发性血小板增多症(ET)和原发性骨髓纤维化(PMF)患者中JAK2V617F是否同时存在于造血干细胞和祖细胞,尚未阐明<sup>[9]</sup>。对种系DNA进行分析的结果也表明,JAK2V617F基因突变是发生在造血祖细胞水平上的获得性体细胞突变<sup>[10]</sup>。但随着研究的深入,Larsen等<sup>[11]</sup>应用实时定量PCR技术,Toyama等<sup>[12]</sup>应用直接测序法对MPNs患者检测表明T、B淋巴细胞也存在JAK2V617F突变。

## 2 JAK2V617F与MPNs

MPNs是一类起源于多能造血干细胞,以一系或多系分化相对成熟的骨髓细胞克隆性增生异常为特点的一组异质性疾病的统称。增生的细胞可以红细胞、粒细胞或巨核细胞为主,也可以原纤维细胞及原骨细胞为主。在2008年新修订的WHO慢性髓系肿瘤<sup>[1]</sup>分类中将既往沿用多年的“慢性骨髓增殖性疾病”旧称更名为“骨髓增殖性肿瘤”,此修订强调了(1)CMPD的肿瘤本质,因此从疾病改称肿瘤;(2)肥大细胞疾病代表了另外一类干细胞疾病,它与MPNs其他成员同类;(3)原发性嗜酸性细胞增多症患者分子上明确分类的出现。MPNs包括4种经典的MPNs以及非典型的MPNs,前者包括慢性髓性白血病(CML)、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),后者包括慢性中性粒细胞白血病(CNL)、肥大细胞疾病(MCD)、慢性嗜酸粒细胞白血病(CEL)和不能分类的MPNs。JAK2V617F基因突变,可诱发红细胞生成素受体(EPOR)、血

小板生成素受体(TPOR)、粒细胞集落刺激因子受体(G-CSF)等异常活化及信号传导,造成红系、巨核系及粒系祖细胞异常增生,所以即使无配体存在,信号传导也呈持续性增强而发生 MPNs。一系列对 JAK2V617F 研究结果表明:经典的 MPNs 患者中多存在 JAK2V617F 的突变,而在骨髓发育不良症候群、嗜酸细胞过多综合征、慢性骨髓单核细胞性白血病、慢性中性粒细胞性白血病及系统性肥大细胞增多症等疾病中也发现 JAK2V617F,但突变频率较低。

### 3 JAK2V617F 基因突变的检测方法

多种方法均可检测 JAK2V617F 基因突变,但所得阳性率有所不同,导致这种差异的可能原因有:(1)DNA 来源不同;(2)检测方法的敏感性不一;(3)诊断标准不同等。在各种检测方法中,大部分研究应用直接测序法检测 JAK2V617F 基因,但其敏感性不如 PCR 技术,但过于敏感(敏感度 0.01%)的试验方法会导致假阳性结果,致使在健康人也会检测出非常低水平的 JAK2V617F 基因突变。目前来讲,首选等位基因特异性实时定量 PCR 方法。现将各种检测方法归纳如下<sup>[13]</sup>。

**3.1 常规 DNA 测序** 依据 SangerDNA 测序原理,用 PCR 方法扩增 JAK2 基因突变的 DNA 区域后用自动测序仪进行测序。因为该突变是获得性的,且仅限于髓系,所以方法的敏感性在 20%~30%。

**3.2 焦磷酸测序** 原理是体外用 ATP 进行 DNA 合成时,应用在 DNA 聚合酶作用下合成核苷酸时释放的焦磷酸,在荧光素酶反映体系中检测焦磷酸所转化成的光信号。

**3.3 解离曲线分析** 在标准 PCR 反应体系中加入野生型或突变序列的荧光标记引物,利用 2 种引物解离温度的差异来区分 2 种 DNA 片段,即在更低的温度下,错配结合者发生解离,为半定量检测,敏感度在 1%~10%。

**3.4 BsaXI 限制性酶切分析** 在 JAK2V617F 基因突变区域内存在一个 BsaXI 限制性酶切位点,用 BsaXI 酶切方法可以区分出纯合子突变。

**3.5 扩增受阻突变 PCR (ARMS-PCR)** 在理想 PCR 条件下可以检测到单碱基突变,这是检测 JAK2 单碱基 G→T 突变的理想方法。稀释法表明,ARMS-PCR 的敏感度为 1%~2%。该方法可区分 JAK2V617F 突变个体是纯合子还是杂合子,而且是检测 MPNs 病人有无突变的可靠方法,但它并没量化野生型与突变型等位基因的比值,需要 PCR 直接测序。

**3.6 等位基因特异性 PCR** 应用等位基因特异引物(AS)进行定量和半定量检测有几种不同的方法,其中一种非常敏感,是应用突变特异的前向导引物扩增出突变 DNA 片段,再用毛细管电泳进行检测,其灵敏度为 0.01%~0.1%。另一种按照 ARM 系统在同一体系中加入野生型和突变型两种引物对两种 DNA 片段进行扩增,灵敏度为 1%~2%。总之,等位基因特异引物适用于实时定量 PCR 检测,基因组 DNA 和 cDNA 均可用作模板。该方法特异性、敏感性均较高,是目前 JAK2V617F 临床应用研究中的主要检测方法。

### 4 MPNs 的诊断与治疗

2008 年 WHO 最新修订的 PV、ET 和 PMF 诊断标准。

**4.1 PV 诊断的主要标准** (1)HB > 18.5 g/dl(男), > 16.5 g/dl(女),或 HB 或 Hct > 年龄、性别居住海拔高度调整后参考范围的第 99 位百分数;Or HB > 17 g/dl(男),或 > 15 g/dl(女),如果与从基线水平持续性升高 > 2 g/dl,不是由于铁缺乏的原因;Or 红细胞容积升高较平均正常预测值 > 25%。(2)JAK2V617F 的出现或类似突变的出现。次要标准:(1)骨髓三系髓性增生;(2)血浆 EPO 水平低于正常;(3)贫血。PV 的诊断需要满足主要标准和一个次要标准或第一个主要标准和两个次要标准。

**4.2 ET 诊断的主要标准** (1)血小板 > 450 × 10<sup>9</sup>/L。(2)大的或成熟形态的巨核细胞增生,没有或很少有粒细胞或红细胞的增生。(3)不能满足 WHO CML、PV、PMF MDS 或其他髓性肿瘤的标准。(4)JAK2V617F 或其他克隆性标志的出现或没有反应性血小板增多的证据。ET 的诊断需要满足所有 4 个主要标准。

**4.3 PMF 诊断的主要标准** (1)巨核细胞增生伴有网硬蛋白和/或胶原纤维 or 无网硬纤维,但巨核细胞改变必须具有不断增加的骨髓细胞,粒细胞增生和通常红细胞的下降。(2)不能满足 WHO CML、PV、MDS 或其他髓性肿瘤。(3)JAK2V617F 或其他克隆性标志的出现或没有反应性骨髓纤维化的证据。次要标准:(1)幼白成红细胞增多。(2)不断增加的血清 LDH。(3)EEC 生长。(4)可触及的脾脏肿大。PMF 的诊断需要满足所有 3 个主要标准和两个次要标准。

**4.4 目前 PV 诊断中 JAK2 基因突变的检测不是强制性的**,因为在常规临床标本中某些患者也许并不表现为 12 号外显子或 14 号外显子的突变。类似的,在 ET 或 PMF 患者中 JAK2V617F 的缺乏有较少的诊断价值,因为大约一半的患者 JAK2 基因突变是阴性的,且目前 JAK2 基因突变检测分析系统是不标准的,出现假阳性或假阴性试验结果的可能性不应被忽略,尤其是在等位基因特异性分析的高敏感性和外周血低突变等位基因负荷的情况下。

### 4.5 MPNs 的治疗

**4.5.1 非特异性治疗** PV、ET、PMF 等目前的治疗主要是非特异性抑制造血干细胞,比如用羟基脲(Hu)、干扰素及多种化疗药物尽量减少肿瘤负荷,但临床疗效不佳。目前推荐所有 PV 的治疗包括静脉放血和小剂量阿斯匹林,高危患者加 Hu。该种治疗策略除了静脉放血,亦用于 ET(所有患者应用小剂量阿斯匹林),高危患者加 Hu<sup>[14]</sup>。

**4.5.2 靶向治疗** JAK2V617F 的发现为 MPNs 治疗提供了新的方向,大多数 PV、ET 或 PMF 患者 JAK2V617F 突变可增强异常的 JAK-STAT 信号的致癌作用<sup>[15]</sup>。Pardanani 等<sup>[16]</sup>发现应用 JAK2 激酶选择性抑制剂 TG101209 可抑制与 JAK2V617F 相关 MPNs 细胞的酪氨酸激酶活性,引起 JAK2V617F、STAT3、STAT5 的磷酸化受抑制。Tyler 等<sup>[17]</sup>、Geron 等<sup>[18]</sup>的研究显示,JAK2 激酶选择性抑制剂 TG101209 和 TG101348 可分别在纳摩尔水平抑制携带 JAK2V617F 细

胞的生长,纳摩尔浓度的抑制剂对含有突变基因的内源性红系集落(EEC)具有生长抑制作用。根据 CML 特有的 BCR-ABL 融合基因设计的靶向药物伊马替尼(imatinib)已用于临床应用,其原理是通过 SET-PP2A-SHP1 通路导致酪氨酸激酶失活,引起对伊马替尼耐药的细胞凋亡<sup>[19]</sup>。STI571 是一种 2-苯胺嘧啶衍生物,能选择性地抑制部分 PTK,是近年开发的用于治疗慢性髓细胞性白血病(CML)的酪氨酸激酶抑制剂,对 bcr-abl 激酶有高度特异性的抑制作用,对治疗 JAK2V617F 阳性的 PV、FE、PMF 已取得疗效。近来,一些 JAK2 非选择性抑制剂,如 MK-0457 也已投入 I 期临床试验中,用于治疗难治或白血病转化的 JAK2V617F 阳性 MPNs 患者<sup>[20]</sup>。

## 5 JAK2 基因突变对于 MPNs 的临床意义

JAK2V617F 点突变的发现,进一步支持骨髓增殖性肿瘤是一组起源于造血干细胞克隆异常的相关性疾病,让我们对 MPNs 的发病机理的研究有了很大的突破,对其明确诊断和治疗也有很大的帮助,但是对于突变阴性的 MPNs 病人的潜在发病机理仍不清楚,还有待于今后进一步的深入研究。

## 参考文献

- Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms[J]. *Leukemia*, 2008, 22(1): 14-22.
- Wilks AF. Two putative protein-tyrosine kinases identified by application of the polymerase chain reaction[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, 86(5): 1603-1607.
- Yamaoka K, Saharinen P, Pesu M, et al. The Janus kinases (Jaks) [J]. *Genome Biology*, 2004, 5(12): 253.
- Ingle E, Klinken SP. Cross-regulation of JAK and Src kinases[J]. *Growth Factor*, 2006, 24(1): 89-95.
- 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.
- Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, et al. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin[J]. *Cell*, 1993, 74(2): 227-236.
- Zhao RX, Xing S, Li Z, et al. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(24): 22788-22792.
- Levine RL, Wernig G. Role of JAK-STAT Signaling in the Pathogenesis of Myeloproliferative Disorders[M]. *American Society of Hematology Education Program Book*, 2006: 233-289.
- 顾树程, 常春康. JAK2 V617F 在骨髓增殖性肿瘤中的研究进展[J]. *现代中西医结合杂志*, 2010, 19(6): 769-771.
- Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis[J]. *Cancer Cell*, 2005, 7(4): 387-397.
- Larsen TS, Christensen JH, Hasselbalch HC, et al. The JAK2 V617F mutation involves B- and T-lymphocyte lineages in a subgroup of patients with Philadelphia-chromosome negative chronic myeloproliferative disorders[J]. *Br J Haematol*, 2007, 136(5): 745-751.
- Toyama K, Karasawa M, Yamane A, et al. JAK2-V617F mutation analysis of granulocytes and platelets from patients with chronic myeloproliferative disorders: advantage of studying platelets [J]. *Br J Haematol*, 2007, 139(1): 64-69.
- 徐媛媛, 李惠民. 骨髓增殖性疾病 JAK2 V617F 研究进展[J]. *中国实验血液学杂志*, 2009, 17(1): 238-242.
- 王学文. 原发性血小板增多症、真性红细胞增多症和骨髓纤维化: 目前的处理和靶向治疗 [J]. *现代肿瘤医学*, 2009, 17(10): 2008-2011.
- Levine RL, Pardanani A, Tefferi A, et al. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders [J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(9): 673-683.
- Pardanani A, Hood J, Lasho T, et al. TG101209, a small molecule JAK2-selective kinase inhibitor potently inhibits myeloproliferative disorder-associated JAK2V617F and MPLW515L/K mutation [J]. *Leukemia*, 2007, 21(8): 1658-1668.
- Tyler RK, Shpiro N, Marquez R, et al. VX-680 inhibits Aurora A and Aurora B kinase activity in human cells [J]. *Cell Cycle*, 2007, 6(22): 2846-2854.
- Geron I, Abrahamsson AE, Barroga CF, et al. Selective inhibition of JAK2-driven erythroid differentiation of polycythemia vera progenitors [J]. *Cancer Cell*, 2008, 13(4): 321-330.
- Samanta AK, Chakraborty SN, Wang Y, et al. Jak2 inhibition deactivates Lyn kinase through the SET-PP2A-SHP1 pathway, causing apoptosis in drug-resistant cells from chronic myelogenous leukemia patients [J]. *Oncogene*, 2009, 28(14): 1669-1681.
- Giles FJ, Cortes J, Jones D, et al. MK-0457, a novel kinase inhibitor, is active in patients with chronic myeloid leukemia or acute lymphocytic leukemia with the T3151 BCR-ABL mutation [J]. *Blood*, 2007, 109(2): 500-502.

[收稿日期 2011-05-31][本文编辑 谭毅 黄晓红]