



[DOI]10.3969/j.issn.1001-9057.2023.07.013

http://www.lenkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2023.07.013

· 论著 ·

JAK2 V617F 及 exon12 突变阴性的红细胞增多患者遗传性红细胞增多症相关基因变异分析

马强 胡蓉华 赵弘 兰晓曦 常晓丽 孙婉玲 苏力 惠吴函

[摘要] 目的 分析 JAK2 V617F 及 exon12 突变阴性的红细胞增多患者遗传性红细胞增多症相关基因变异情况。方法 回顾性纳入 2021 年 6 月~2022 年 11 月于我院就诊、JAK2 V617F 及 exon12 突变筛查结果为阴性且无继发性红细胞增多原因的红细胞增多症患者 31 例,收集其一般资料、实验室检查结果,分析遗传性红细胞增多症相关基因变异情况。结果 在 31 例红细胞增多症患者中,2 例(6.45%)检测到 EPO 基因变异,分别为 NM_000799.4:c.401C>T p. Thr134Ile 和 NM_000799.4:c.-36C>A。在受检患者中,检测到 PHD2 和 SH2B3 基因共 4 个单核苷酸多态性(SNP)位点,按发生率由高至低依次为 SH2B3 基因 rs3184504、rs78894077、PHD2 基因 rs186996510 及 SH2B3 基因 rs140649197,其中 rs78894077 在本研究中的检出率显著高于数据库中人群变异频率,且 Mutation Taster 及 PolyPhen-2 软件预测该变异可能有害。结论 在 JAK2 V617F 及 exon12 突变阴性的红细胞增多症患者中发现两个新的 EPO 基因变异,同时 SH2B3 基因 rs78894077 检出率更高,测序结果可能有助于疾病鉴别诊断,为病因学研究提供理论基础。

[关键词] 遗传性红细胞增多症; EPO 基因突变; 基因测序; JAK2 基因突变; SH2B3 基因 rs78894077

[中图分类号] R555+.1;R394.3 **[文献标识码]** A

红细胞增多症相对少见,主要表现为外周血血红蛋白(Hb)/红细胞压积(HCT)增高^[1],分为原发性和继发性两类,获得或遗传性因素均可导致红细胞增多^[2]。原发性红细胞增多以真性红细胞增多症(PV)最为常见,95%以上 PV 患者可检测到 JAK2 V617F 或 exon12 驱动突变,因此伴 JAK2 突变的红细胞增多症患者诊断为 PV 相对更容易^[2]。然而,对于 JAK2 未突变的红细胞增多症患者,如何进行精准诊疗却是临床面临的重要挑战。尽管临床已开展促红细胞生成素(EPO)水平和 Hb 饱和度为 50% 时的氧分压(P₅₀)测定,但有研究结果发现,EPO 和 P₅₀ 检测有时并不能从根本上识别红细胞增多的原因^[3]。对于这类患者,在临床实践过程中首先要除外可能造成继发性红细胞增多症的常见原因,如缺氧、可导致 EPO 过度生成的恶性肿瘤等^[4];其次,要除外驱动基因突变阴性的 PV^[3];最后,要考虑罕见的先天性/遗传性红细胞增多

症可能,如 EPOR 基因突变或与 EPO 生成相关的多种基因变异所致的红细胞增多等^[5]。特别是,对于 JAK2 V617F 和 exon12 突变阴性的持续性红细胞增多的年轻患者或有家族史患者或原因不明患者,更推荐通过基因测序检测遗传性红细胞增多症相关基因以寻找红细胞增多原因^[3]。本研究回顾性收集了 31 例 JAK2 V617F 及 exon12 突变阴性的红细胞增多症患者,通过基因测序方法分析遗传性红细胞增多症相关基因变异情况。

对象与方法

1. 对象:纳入 2021 年 6 月~2022 年 11 月于我院就诊、JAK2 V617F 及 exon12 突变筛查结果为阴性且无继发性红细胞增多原因的红细胞增多症患者 31 例,其中男 30 例、女 1 例,年龄 24~71 岁,平均年龄(48.03±12.91)岁。纳入标准:(1)参照 WHO 2016 版红细胞增多症诊断标准,Hb>165 g/L(男)/160 g/L(女)或 HCT>49%(男)/48%(女);(2)JAK2 V617F 及 exon12 突变检测结果均为阴性。排除标准:(1)已明确诊断

基金项目:首都医科大学宣武医院院内基金项目(XWJL-2019023)

作者单位:100053 北京,首都医科大学宣武医院血液内科

通讯作者:惠吴函,E-mail:wuhanhui@xwhosp.org

为 PV; (2) 具有其他继发获得性红细胞增多原因。本研究已通过我院伦理委员会审核批准。

2. 方法:

(1) 一般资料及实验室检查结果收集: 包括年龄、性别、首诊日期、红细胞计数、Hb、HCT。

(2) DNA 提取、扩增与 Sanger 测序: 使用 EDTA 抗凝管采集患者外周静脉血, 参照全血基因组 DNA 提取试剂盒说明书对 EDTA 抗凝血进行基因组 DNA 提取, Qubit 3.0 用于提取后 DNA 浓度测定。高成功率 PCR 酶 KOD FX (Code No. KFX-101) 及 T100™ Thermal Cycler PCR 仪 (BIO-RAD) 用于目的片段扩增, 扩增产物经纯化后, 使用 Applied Biosystems™ 3730xl DNA 分析仪进行测序。9 个基因包括 HIF2A、VHL、EPO、EPOR、PHD2、BPGM、HBB、HBA1/HBA2 和 SH2B3。

(3) 变异识别与分析: 应用 Geneious 软件将测序结果与基因组参考序列进行比对, 识别变异。采用 PolyPhen-2^[6]、Mutation Assessor、FATHMM、Mutation Taster 及 SIFT 等软件预测非同义突变的有害性。采用 Exom Aggregation Consortium (ExAC)、1000 Genomes Project、dbSNP 及 ClinVar 等数据库分析变异在人群中分布频率及临床意义。

3. 统计学处理: 应用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计数资料以例数和百分比表示。

结 果

1. 患者血常规结果及基因检测信息: 31 例患者血常规中 WBC 计数及 PLT 计数大致正常, 平均红细胞计数 $(6.01 \pm 0.44) \times 10^{12}/L$, 平均 HCT $(54.26 \pm 3.87)\%$ 。20 例患者接受全部 9 个基因检测, 11 例患者接受 5 个基因检测 (VHL、EPO、HIF2A、PHD2、EPOR)。见表 1。

2. 2 例基因变异患者资料: 通过与基因组参考序列比对, 过滤同义突变及 SNP 位点后, 2 例患者检测到 EPO 基因变异, 分别为 NM_000799.4:c.401C>T p. Thr134Ile 和 NM_000799.4:c.-36C>A, 相关临床信息如下: (1) 编号 6 患者, 男, 53 岁, 自诉 2017 年 9 月发现红细胞增多, 波动于 175 g/L 左右, 其母亲患有红细胞增多症。2021 年 9 月于我院门诊行红细胞增多症相关基因检测 (5 个基因), 结果示患者携带 NM_000799.4:c.401C>T p. Thr134Ile 变异 (杂合, 图 1)。该变异经 SIFT 软件预测提示 Damaging, 但 Mutation Assessor 软件预测提示 Neutral, PolyPhen-2 软件预测提示 Benign, Mutation Taster 软件预测提示 Polymorphism, FATHMM 软件预测提示 Tolerated。人群数据库中该

表 1 31 例患者基本信息及血常规部分结果

患者编号	性别	年龄 (岁)	首诊日期	红细胞计数 ($\times 10^{12}/L$)	Hb (g/L)	HCT (%)
1	男	36	2021/9/1	6.01	181	51.3
2	男	59	2021/10/19	6.20	216	63.1
3	女	70	2021/8/26	5.91	179	54.6
4	男	35	2021/6/28	5.56	171	47.1
5	男	69	2022/7/6	5.93	164	50.5
6	男	53	2021/9/17	6.16	179	50.7
7	男	52	2022/9/1	6.48	205	59.9
8	男	43	2022/8/26	6.76	190	53.3
9	男	53	2021/9/1	5.98	207	58.9
10	男	51	2021/9/9	6.29	185	57.6
11	男	43	2021/8/9	6.29	179	55.8
12	男	41	2021/7/20	5.73	179	51.2
13	男	51	2021/7/20	6.44	202	57.2
14	男	32	2022/7/13	5.75	179	53.1
15	男	35	2022/1/4	6.23	193	57.3
16	男	37	2022/1/10	5.26	173	48.7
17	男	40	2022/7/11	5.50	182	53.2
18	男	71	2022/5/19	5.65	172	50.9
19	男	58	2022/3/24	5.90	186	58.0
20	男	61	2022/4/19	5.82	192	54.0
21	男	42	2022/2/25	6.75	186	52.9
22	男	51	2022/3/11	5.47	186	52.4
23	男	38	2022/8/18	6.40	199	57.3
24	男	31	2022/8/18	6.92	188	59.9
25	男	60	2022/7/13	5.86	192	56.8
26	男	24	2022/9/8	5.78	172	50.3
27	男	38	2022/8/4	6.16	163	48.6
28	男	63	2021/7/1	6.02	187	56.8
29	男	35	2022/10/13	5.78	171	52.0
30	男	68	2022/11/10	6.28	199	57.5
31	男	49	2022/11/21	4.96	165	50.9

位点未被收录。患者 2022 年 1 月于外院再次复查血常规示红细胞计数 $6.16 \times 10^{12}/L$, Hb 179 g/L, HCT 50.7%。(2) 编号 5 患者, 男, 69 岁, 2019 年 7 月发现红细胞增多, 波动于 175 g/L 左右, 2022 年 7 月于我院门诊就诊, 就诊时红细胞计数 $5.93 \times 10^{12}/L$, Hb 164 g/L, HCT 50.50%, EPO 5.70 IU/L; 其子也确诊为红细胞增多症。患者行红细胞增多症相关基因检测 (9 个基因), 结果示其携带 NM_000799.4:c.-36C>A 变异 (杂合, 图 2); 2022 年 8 月再次复查血常规示红细胞计数 $6.08 \times 10^{12}/L$, Hb 170 g/L, HCT 49.10%。

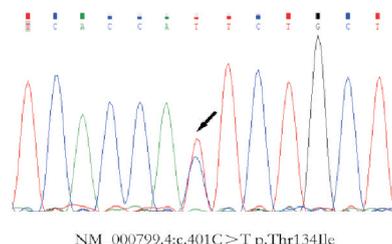
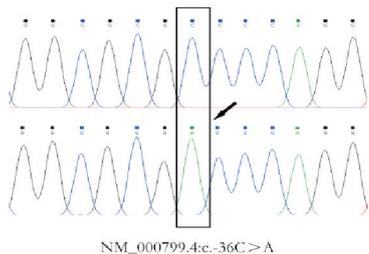


图 1 编号 6 患者 EPO 基因测序结果 (箭头所示位置发生碱基替换)



讨 论

对于初诊红细胞增多症患者, JAK2 突变和 EPO 水平测定是目前比较推荐的一线检查方法, 当 JAK2 突变为阴性时, 有必要启动更加系统的综合检查作为二线方法。除外继发性获得性红细胞增多症, 先天性红细胞增多症相关基因突变筛查就是其中最重要的一部分, 这些基因通常涉及红细胞生成调节、氧感受器及 Hb 氧亲和力等^[7]。如 EPO 为红细胞生成的主要刺激因子, EPO 及 EPOR 基因突变可引起红细胞增多^[8-9]。目前已报道 EPOR 基因有 11 种突变形式^[10]。此外, SH2B3 基因是 Janus 酪氨酸激酶/信号传导与转录激活因子(JAK/STAT)通路下游细胞因子信号通路的负调控因子, 在遗传性红细胞增多症中已发现 SH2B3 突变^[11]。而氧感知通路上的许多基因突变已被证明能引起遗传性红细胞增多, 主要涉及希佩尔-林道-缺氧诱导因子 2 α -脯氨酰羟化酶 2 (VHL-HIF2A-PHD2) 轴, 这一通路的基因突变可导致缺氧诱导因子降解失败, 增加 EPO 促进红细胞生成的作用。最早在俄罗斯发现 VHL C598T 纯合突变^[12], 此后在其他地区发现 VHL 外显子和剪接子的复杂突变^[7]。在 EGLN1 (PHD2) 基因上也发现了 16 种突变, 大多为错义突变^[10]。此外, HBA1/2、HBB、BPGM 基因异常可通过增强 Hb 氧亲和能力引起组织缺氧从而导致红细胞数量增多。既往由于先天性红细胞增多症是一组罕见的异质性疾病, 发生率相对较低, 涉及到的基因变异范围广泛, 加之相应的基因检测在临床并未普及, 文献或数据库中已明确报道的具有致病性的位点仍然有限。近年来, 随着二代测序的应用, 已有研究发现红细胞增多症患者中, 上述基因病理性变异并不少见。一项针对 1 192 例红细胞增多症患者遗传性红细胞增多基因的检测结果显示, 12% 患者存在可报告的遗传学变异, 其中 85 个为致病性/可能致病性变异, 58 个是临床意义未明的变异, 而其中大多数变异此前尚未报道^[13]。Filser 等^[14]对 270 例红细胞增多症患者进行了 EPAS、VHL、EPO、EPOR、EGLN、BPGM 及 SH2B3 基因检测, 其中 23% 患者存在氧感知通路基因的病理性变异。综上, 探寻红细胞生成调节基因或氧感知通路或 Hb 氧亲和力相关基因突变对明确红细胞增多症患者的病因具有重要意义。因此, 本研究采用 Sanger 测序方法进一步分析上述基因在 31 例 JAK2 突变阴性的红细胞增多症患者中的变异情况。

图 2 编号 5 患者 EPO 基因 TA 克隆测序结果 (上图为野生型克隆, 下图为突变型克隆, 如箭头所示)

3. 患者基因 SNP 情况分析: 在所有受检患者中, 检测到 PHD2 和 SH2B3 基因共 4 个 SNP 位点, 见表 2。按发生率由高至低依次为 SH2B3 基因 rs3184504、rs78894077、PHD2 基因 rs186996510 及 SH2B3 基因 rs140649197。使用 Geneious 软件比对 6 例患者测序结果与参考序列间差异, 其 SH2B3 基因 rs78894077 变异峰图见图 3。通过检索人群数据库发现, SH2B3 基因 rs78894077 主要见于东亚人群, 在其他种族中该基因变异发生率极低, 但在本研究人群中该基因变异发生率(30%, 6/20)显著高于 1000 Genomes 中东亚人群(6.35%)、ExAC 中亚洲人群(0.10%)及 gnomAD-Genomes 中东亚人群(5.46%)。多种软件预测该变异可能有害, 如 Mutation Taster 软件预测提示 Disease causing, PolyPhen-2 软件预测提示可能损害, Mutation Assessor 软件预测提示 Medium, 但 FATHMM 软件预测提示 Tolerated。

表 2 红细胞增多症患者检测到的 SNP 位点及发生率

基因	变异信息	发生率 (%)
PHD2	NM_022051.3:c.12C>Gp. Asp4Glu rs186996510	6.45 (2/31)
	NM_005475.3:c.784T>A p. Trp262Arg rs3184504	95.00 (19/20)
SH2B3	NM_005475.3:c.724C>T p. Pro242Ser rs78894077	30.00 (6/20)
	NM_005475.3:c.1606G>A p. Ala536Thr rs140649197	5.00 (1/20)

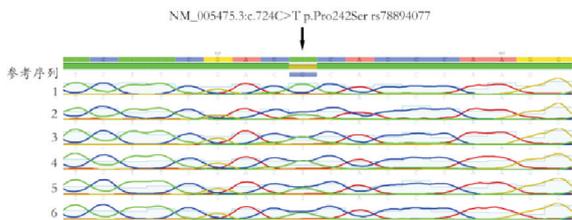


图 3 6 例患者 SH2B3 基因 rs78894077 变异峰图 (箭头所示位置为 SH2B3 基因 c.724C>T 变异)

在所测基因中, 我们发现两个新的 EPO 基因变异, 1 例为编码序列的错义突变, 另外 1 例为非编码序列单核苷酸替换。EPO 突变与家族性红细胞增多症

研究已被陆续报道,如 c. 32delG 变异致 EPO 功能获得性突变,通过影响转录导致 EPO 过度产生,进而促进红细胞增多^[8]。此外,其他不同类型 EPO 基因变异也在红细胞增多症患者中被报道,包括 NM_000799. 2: c. - 1306C > A (rs1617640)、c. - 136G > A、c. 19delC, p. P7fs、c. 250G > C, p. G84R (rs137953994)、c. 296A > G, p. E99G 及 rs551238 等^[15]。而本研究中发现的 EPO c. 401C > T p. Thr134Ile 变异在人群数据库中尚未被收录,SIFT 软件预测结果为损害,但其他多个软件预测结果为良性且 ClinVar 数据库暂未收录,因此该变异的临床意义尚不明确;本研究中的另 1 例 EPO 基因突变(NM_000799. 4:c. - 36C > A)在 ClinVar 数据库也未见报道。尽管上述两种变异临床意义尚不明确,但两例患者在后期随访过程中 Hb/HCT 仍高于正常上限,EPO 水平正常,所以变异与先天性红细胞增多症的关系仍需进一步确定,也提示临床中对于高度怀疑先天性红细胞增多症患者应扩展这些基因的检测区域,对于没有检测到基因突变的患者可考虑进行全外显子测序探寻可能存在的基因变异,以进一步明确先天性红细胞增多症的病因。

SNP 与疾病易感性间的关系已被广泛报道,部分疾病相关 SNP 可导致其所在基因及相关基因转录和蛋白表达水平发生变化,增加某些良性疾病的易感性^[16],进而参与疾病的发生与发展。陈郁等^[17]发现 EPAS1 基因 SNP (rs6756667) 与汉族男性高原红细胞增多症的发生相关,GG 基因型可能是高原红细胞增多症的危险因素。据此,我们推测部分原因不明红细胞增多症患者也可能存在红细胞生成调节、氧感知通路基因 SNP,导致患者对红细胞增多易感。在本研究中,我们检测到了 PHD2 基因及 SH2B3 基因多个 SNP 位点,其发生频率与数据库中人群发生频率大致相同,但 SH2B3 基因 rs78894077 引起了我们的兴趣。经数据库检索,该变异主要见于东亚人群,在其他种族中发生率极低。重要的是,在本研究中 rs78894077 的发生率远高于数据库中东亚人群发生率(约 5~6 倍)。通过文献检索发现,该基因变异曾在 MPN 中有报道,与 ET 的发生风险有关^[18];本研究发现 rs78894077 同样可发生在部分 JAK2 未突变的红细胞增多症患者中,不能除外其与红细胞增多症间具有潜在联系。为进一步明确该变异是否会影响蛋白质功能,我们借助多种计算机软件进行预测分析,结果多种软件测试结果均提示 rs78894077 变异为有害突变。因此,rs78894077 与红细胞增多症之间的关系值得我们深入探索。

本研究局限性在于:(1)尚未完善家族史信息及亲属样本收集;(2)所纳入基因数量及检测位点有限,

主要以热点区域突变为主,检测结果不能全面反映红细胞增多症患者的分子遗传学全貌,结果解释具有局限性;(3)样本数量有限,结论可能尚不具有普适性。

总之,本研究通过分析 JAK2 野生型红细胞增多症患者先天性/遗传性红细胞增多症相关的分子遗传学异常,首次报告了 2 个新的 EPO 基因突变,并发现 SH2B3 单核苷酸多态性 rs78894077 在入组患者中具有更高的发生率,这些结果可能会为原因不明的红细胞增多症的分子诊断、病因学研究及临床的精准诊治提供理论基础。

参 考 文 献

- [1] 中华医学会血液学分会白血病淋巴瘤学组. 真性红细胞增多症诊断与治疗中国指南(2022 年版)[J]. 中华血液学杂志, 2022, 43 (7): 537-541.
- [2] Tefferi A, Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2021 update on diagnosis, risk-stratification and management[J]. Am J Hematol, 2020, 95 (12): 1599-1613.
- [3] Jalowiec KA, Vrotniakaitė-Bajercienė K, Jalowiec J, et al. JAK2 Unmutated Polycythaemia-Real-World Data of 10 Years from a Tertiary Reference Hospital[J]. J Clin Med, 2022, 11 (12): 3393.
- [4] Patnaik MM, Tefferi A. The complete evaluation of erythrocytosis: congenital and acquired[J]. Leukemia, 2009, 23 (5): 834-844.
- [5] McMullin MF. Genetic Background of Congenital Erythrocytosis[J]. Genes (Basel), 2021, 12 (8): 1151.
- [6] Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations[J]. Nat Methods, 2010, 7 (4): 248-249.
- [7] Lenglet M, Robriquet F, Schwarz K, et al. Identification of a new VHL exon and complex splicing alterations in familial erythrocytosis or von Hippel-Lindau disease[J]. Blood, 2018, 132 (5): 469-483.
- [8] Zmajkovic J, Lundberg P, Nienhold R, et al. A Gain-of-Function Mutation in EPO in Familial Erythrocytosis[J]. N Engl J Med, 2018, 378 (10): 924-930.
- [9] de la Chapelle A, Traskelin AL, Juvonen E. Truncated erythropoietin receptor causes dominantly inherited benign human erythrocytosis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90 (10): 4495-4499.
- [10] Bento C, Percy MJ, Gardie B, et al. Genetic basis of congenital erythrocytosis: mutation update and online databases[J]. Hum Mutat, 2014, 35 (1): 15-26.
- [11] McMullin MF, Cario H. LNK mutations and myeloproliferative disorders [J]. Am J Hematol, 2016, 91 (2): 248-251.
- [12] Ang SO, Chen H, Hirota K, et al. Disruption of oxygen homeostasis underlies congenital Chuvash polycythemia[J]. Nat Genet, 2002, 32 (4): 614-621.
- [13] Oliveira JL, Coon LM, Frederick LA, et al. Genotype-Phenotype Correlation of Hereditary Erythrocytosis Mutations, a single center experience [J]. Am J Hematol, 2018. [Epub ahead of print]
- [14] Filser M, Aral B, Airaud F, et al. Low incidence of EPOR mutations in idiopathic erythrocytosis[J]. Haematologica, 2021, 106 (1): 299-301.
- [15] Vocanec D, Prijatelj T, Debeljak N, et al. Genetic variants of erythropoietin (EPO) and EPO receptor genes in familial erythrocytosis[J]. Int J Lab Hematol, 2019, 41 (2): 162-167.
- [16] Qiu F, Tang R, Zuo X, et al. A genome-wide association study identifies six novel risk loci for primary biliary cholangitis[J]. Nat Commun, 2017, 8: 14828.
- [17] 陈郁, 蒋春华, 罗勇军, 等. EPAS1 基因 rs6756667 及 rs7583392 多态性与汉族男性高原红细胞增多症的相关性研究[J]. 解放军医学杂志, 2012, 37 (12): 1120-1124.
- [18] Tian RM, Rong Y, Wu LS, et al. Variation and Clinical Significance of LNK Gene in Essential Thrombocytosis[J]. Zhongguo shi yan xue yue xue za zhi, 2018, 26 (1): 228-233.

(收稿日期: 2023-02-10)

(本文编辑: 余晓曼)