

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2018.01.0074

· 论 著 ·

SOCS1、SHP1 在 *JAK2V617F* 突变阳性骨髓增殖性肿瘤中的表达及鲁索替尼的调控作用

谢旭磊^{1,2}, 杨圣俊¹, 郝洪岭¹, 王素云^{1*}, 王红杰³, 齐峰², 成志勇², 刘贵敏²

1. 河北省人民医院血液内科, 石家庄 050051
2. 保定市第一医院血液内科, 保定 071000
3. 河北大学附属医院麻醉科, 保定 071000

[摘要] **目的** 研究 *JAK2V617F* 突变阳性骨髓增殖性肿瘤 (MPN) 组织中 *JAK2V617F* 突变量与磷酸化 Janus 激酶 2 (p-JAK2)、细胞因子信号转导抑制蛋白 1 (SOCS1)、含 SH2 结构域蛋白酪氨酸磷酸酶 1 (SHP1) 表达的关系, 并探讨 JAK2 抑制剂鲁索替尼 (ruxolitinib) 对 *JAK2V617F* 突变阳性人红白血病细胞系 HEL 细胞的增殖和 HEL 细胞中 SOCS1、SHP1 表达的影响。**方法** 纳入 2012 年 7 月至 2016 年 8 月于河北省人民医院和保定市第一医院就诊的 48 例 *JAK2V617F* 突变阳性的 MPN 患者为 MPN 组, 同期 24 例贫血患者为对照组。采用免疫组织化学法检测骨髓组织标本中 p-JAK2、SOCS1 和 SHP1 的蛋白表达水平。SOCS1、SHP1 蛋白表达量与 *JAK2V617F* 突变量的相关分析采用 Spearman 等级相关分析。用不同浓度 (50、100、250、500、1 000 nmol/L) 的鲁索替尼处理 HEL 细胞后, 采用 CCK-8 法检测 HEL 细胞的活力, qPCR 法检测 MPN 组织和 HEL 细胞中 *JAK2V617F* 突变量以及 HEL 细胞中 *JAK2*、*SOCS1*、*SHP1* mRNA 表达水平, 蛋白质印迹法检测 HEL 细胞中 JAK2、p-JAK2、SOCS1、SHP1 的蛋白表达水平。**结果** (1) MPN 组织中 *JAK2V617F*/*JAK2* 比值为 (57.33±20.82)%, 对照组为 0%。MPN 患者骨髓细胞质中 p-JAK2、SOCS1、SHP1 蛋白质表达量与对照组相比差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01)。(2) MPN 组织中 SOCS1、SHP1 蛋白表达量均与 *JAK2V617F* 突变量呈负相关 ($r = -0.648$ 、 -0.692 , P 均 < 0.05)。*JAK2V617F*/*JAK2* 比值 < 50% MPN 患者的 SOCS1、SHP1 蛋白表达水平高于 *JAK2V617F*/*JAK2* 比值 ≥ 50% 的 MPN 患者 (P 均 < 0.01), p-JAK2 的蛋白表达水平低于 *JAK2V617F*/*JAK2* 比值 ≥ 50% 者 ($P < 0.01$)。(3) 250 nmol/L 鲁索替尼处理 24、48、72 h 后, HEL 细胞活力分别为 (60.06±3.87)%、(52.05±2.88)%、(36.43±2.01)%。随着鲁索替尼浓度的增加, HEL 细胞中 JAK2 的 mRNA 和蛋白表达与 p-JAK2 的蛋白表达水平逐渐降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), SOCS1 和 SHP1 的 mRNA 和蛋白表达逐渐增加 (P 均 < 0.01)。**结论** 鲁索替尼能够抑制 HEL 细胞中 JAK2 的 mRNA 和蛋白表达及其磷酸化水平, 增加 SOCS1、SHP1 mRNA 和蛋白表达, 降低 HEL 细胞的活力。

[关键词] 骨髓增殖性肿瘤; *JAK2V617F* 突变; JAK 激酶; 细胞因子信号转导抑制蛋白; 蛋白酪氨酸磷酸酶; SH2 域
[中图分类号] R 733.3; R 362 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2018)01-0074-07

Expression of SOCS1 and SHP1 in *JAK2V617F* mutation positive myeloproliferative neoplasms and regulation effect of ruxolitinib

XIE Xu-lei^{1,2}, YANG Sheng-jun¹, HAO Hong-ling¹, WANG Su-yun^{1*}, WANG Hong-jie³, QI Feng², CHENG Zhi-yong², LIU Gui-min²

1. Department of Hematology, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051, Hebei, China
2. Department of Hematology, The First People's Hospital of Baoding, Baoding 071000, Hebei, China
3. Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding 071000, Hebei, China

[Abstract] **Objective** To analyze the relationship between the *JAK2V617F* mutation and the expressions of phosphorylated Janus kinase 2 (p-JAK2), suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1), and SH2-containing protein tyrosine phosphatase 1 (SHP1) in *JAK2V617F* mutation positive myeloproliferative neoplasm (MPN) tissues, and to investigate the effects of JAK2 inhibitor ruxolitinib on regulating the proliferation of *JAK2V617F* mutation positive human erythroleukemia cell lines HEL and the expressions of SOCS1 and SHP1 in HEL cells. **Methods** A total of 48 patients with *JAK2V617F* mutation positive MPN (MPN group) and 24 patients with anemia (control group) in Hebei General Hospital and The First

[收稿日期] 2017-06-27 [接受日期] 2017-09-22

[作者简介] 谢旭磊, 硕士生, 主治医师. E-mail: xiexulei@126.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 0311-85988214, E-mail: suyunwcn@163.com

People's Hospital of Baoding from Jul. 2012 to Aug. 2016 were enrolled in this study. The protein expressions of p-JAK2, SOCS1 and SHP1 in bone marrow biopsies (BMBs) were detected by immunohistochemistry. The correlations between *JAK2V617F* mutation level and the protein expressions of SOCS1 and SHP1 were analyzed by Spearman rank correlation analysis. HEL cells were treated with ruxolitinib at different concentrations (50, 100, 250, 500 and 1 000 nmol/L), and the viability of cells was determined by CCK-8 assay. The *JAK2V617F* mutation levels in MPN tissues and HEL cells and the mRNA expressions of *JAK2*, *SOCS1* and *SHP1* in HEL cells were detected by qPCR. The protein expressions of JAK2, SOCS1 and SHP1 in HEL cells were detected by Western blotting analysis. **Results** The ratio of *JAK2V617F/JAK2* was $(57.33 \pm 20.82)\%$ in the MPN group and was zero in the control group. The protein expressions of p-JAK2, SOCS1 and SHP1 in BMBs of MPN patients were significantly different from those in the control group (all $P < 0.01$). The protein expressions of SOCS1 and SHP1 were negatively correlated with the mutation level of *JAK2V617F* ($r = -0.648, -0.692; P < 0.05$). The expressions of SOCS1 and SHP1 in MPN patients with *JAK2V617F/JAK2* $< 50\%$ were significantly higher than those in MPN patients with *JAK2V617F/JAK2* $\geq 50\%$ ($P < 0.01$), while the expression of p-JAK2 was significantly lower than that in MPN patients with *JAK2V617F/JAK2* $\geq 50\%$ ($P < 0.01$). After treatment with 250 nmol/L ruxolitinib for 24 h, 48 h, and 72 h, the viabilities of HEL cells were $(60.06 \pm 3.87)\%$, $(52.05 \pm 2.88)\%$, and $(36.43 \pm 2.01)\%$, respectively. With the increase of ruxolitinib concentrations, the mRNA and protein expressions of JAK2 and the protein expression of p-JAK2 were gradually decreased ($P < 0.01, P < 0.05$), while the mRNA and protein expressions of SOCS1 and SHP1 were gradually increased (all $P < 0.01$). **Conclusion** Ruxolitinib can inhibit the expressions of JAK and the phosphorylation of JAK in HEL cells, enhance the expressions of SOCS1 and SHP1, and reduce the viability of HEL cells.

[Key words] myeloproliferative neoplasm; *JAK2V617F* mutation; Janus kinase; suppressor of cytokine signaling; protein tyrosine phosphatase; Src homology 2 domain

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2018, 39(1): 74-80]

骨髓增殖性肿瘤 (myeloproliferative neoplasm, MPN) 是发生于血液系统的一类造血干细胞异常的克隆性疾病, 其特点为骨髓中出现一系或多系异常增殖的血细胞, 使血栓性疾病的发生率增加, 并且增加向急性髓细胞白血病转化的风险。大部分 MPN 患者存在 Janus 激酶 (Janus kinase 2, *JAK2*) 基因突变。Kim 等^[1]研究了包括原发性骨髓纤维化 (primary myelofibrosis, PMF)、真性红细胞增多症 (polycythemia vera, PV) 和原发性血小板增多症 (essential thrombocythemia, ET) 的 407 例 MPN 患者, 检测到 275 例 (67.6%) 患者具有 *JAK2V617F* 突变。该突变可导致 *JAK2* 持续激活, 从而使细胞因子受体 *JAK/STAT* 信号通路活化, 进一步引起细胞增殖和抑制凋亡, 导致 PMF、PV 或 ET 的发生^[2]。

鲁索替尼 (ruxolitinib) 是一种选择性的 *JAK1/2* 抑制剂, 通过竞争性抑制 *JAK1/2* 激酶结构域催化亚基上 ATP 结合位点, 对 *JAK* 激酶活性起到抑制作用。2010 年, Quintás-Cardama 等^[3]首次报道了鲁索替尼可以通过抑制 *JAK1/2* 治疗骨髓纤维化, 从而最早被批准用于治疗中危或高危骨髓纤维化。大系列的 III 期临床试验, 包括

COMFORT-I 和 COMFORT-II, 明确了鲁索替尼缩脾和改善骨髓纤维化症状的疗效, 并且证实了鲁索替尼与现有的骨髓纤维化治疗药物相比, 可延长骨髓纤维化患者的总体生存期^[4-6]。

研究表明, *JAK/STAT* 信号途径是多种细胞因子的转导途径, 介导细胞内多种细胞因子和生长因子的信号转导过程, 并且进一步活化相关靶基因, 影响细胞的增殖、凋亡和分化过程^[7]。*JAK/STAT* 信号通路同时也受多种因子的调控。细胞因子信号转导抑制蛋白 1 (suppressor of cytokine signaling 1, SOCS1) 是 *JAK/STAT* 信号通路的反馈调控蛋白之一, 能够抑制 *JAK/STAT* 信号途径的活性^[8]。含 SH2 结构域蛋白酪氨酸磷酸酶 1 (SH2-containing protein tyrosine phosphatase 1, SHP1) 也是 *JAK/STAT* 通路重要的负调控因子之一, 其基因表达的减少或缺失可引起 *JAK/STAT* 信号通路的持续激活, 与血液系统恶性肿瘤的发生密切相关^[9]。迄今为止, 鲁索替尼是否参与 *JAK2V617F* 突变细胞的 SOCS1、SHP1 表达调控, 尚未见相关报道。因此, 本研究观察了 MPN 患者 *JAK2V617F* 突变量和骨髓病理标本中磷酸化 *JAK2* (phosphorylated Janus kinase 2, p-JAK2)、SOCS1、SHP1 的蛋

白表达情况,同时用不同浓度的鲁索替尼处理 *JAK2V617F* 突变阳性的人红白血病细胞系 HEL 细胞,观察其对 HEL 细胞活力的影响,探讨鲁索替尼是否通过 JAK/STAT 信号通路影响 SOCS1、SHP1 mRNA 和蛋白的表达,为鲁索替尼治疗 MPN 阐明新的作用机制。

1 材料和方法

1.1 患者资料 纳入 2012 年 7 月至 2016 年 8 月于河北省人民医院和保定市第一医院就诊的 48 例初诊为 *JAK2V617F* 突变阳性 MPN 患者为 MPN 组,包括 PV 21 例、ET 14 例、PMF 13 例;其中男性 22 例、女性 26 例;中位年龄 52 (31~72) 岁。所有 MPN 患者的诊断均符合 2015 年世界卫生组织 (WHO) 修订的 MPN 诊断标准^[10]。对照组为同期就诊的 24 例贫血患者,其中男性 10 例、女性 14 例;中位年龄 48 (28~67) 岁。本研究通过保定市第一医院医学伦理委员会批准 (批准文号 20120701),所有患者均签署知情同意书。

1.2 细胞与主要试剂 人红白血病细胞系 HEL 细胞株 (购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心) 用含 10% 胎牛血清 (FBS, 美国 Gibco 公司) 的 RPMI 1640 培养液 (美国 Gibco 公司) 培养于 37 °C、5% CO₂ 孵育箱。CCK-8 试剂盒购自日本株式会社同仁化学研究所。JAK2 (货号 sc-294, 批号 14012)、p-JAK2 (货号 sc-101718, 批号 15002)、SOCS1 (货号 sc-9021, 批号 15001)、SHP1 (货号 sc-287, 批号 15002) 单克隆抗体均购自美国 Santa Cruz 公司。Envision™ plus 试剂盒购自福州迈新生物开发有限公司。基因组 RNA 提取试剂购自北京博迈德生物技术有限公司。引物序列由北京赛百盛基因技术有限公司合成。鲁索替尼 (货号 HY50858, 批号 SR007) 购自瑞士诺华公司。

1.3 实验方法

1.3.1 免疫组织化学染色检测组织中 p-JAK2、SOCS1、SHP1 蛋白表达 骨髓病理组织蜡块 4 μm 切片, 45 °C 烤片 3 h, 脱蜡, 抗原修复, 加 3% 过氧化氢、磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗, 随后加入 p-JAK2、SOCS1、SHP1 一抗 (均为 1:100 稀释) 4 °C 过夜。PBS 清洗 3 次, 每次 5 min, 加 Envision™ plus 试剂盒中试剂 A、试剂 B, PBS 冲

洗。DAB 显色, 以细胞膜、细胞质或细胞核中出现棕黄色颗粒为阳性判断标准, 苏木精复染, 0.1% 盐酸分化, 自来水冲洗。切片经梯度乙醇脱水干燥, 中性树胶封片。高倍镜视野下计数阳性细胞。

1.3.2 CCK-8 试剂盒检测 HEL 细胞活力 收集对数生长期 HEL 细胞, 取细胞悬液 100 μL (含 5 000 个细胞) 加入到 96 孔板, 设空白组、对照组和实验组, 每组设 5 个平行孔。空白组加入 100 μL 无细胞的培养液和不同浓度 (50、100、250、500、1 000 nmol/L) 的鲁索替尼; 对照组加入 100 μL 细胞悬液, 不添加鲁索替尼; 实验组加入 100 μL 细胞和不同浓度鲁索替尼。分别培养细胞至 0、24、48 h 时加入 CCK-8 溶液 10 μL, 孵育 4 h 后, 用酶标仪测定 450 nm 处的光密度 (D) 值, 计算细胞活力。细胞活力 (%) = $[(D_{\text{实验组}} - D_{\text{空白组}}) / (D_{\text{对照组}} - D_{\text{空白组}})] \times 100\%$, 根据计算结果绘制细胞生长曲线, 实验重复 3 次, 取平均值。

1.3.3 qPCR 法检测骨髓活检标本 *JAK2V617F* 突变量和 HEL 细胞中 *JAK2*、*SOCS1*、*SHP1* 的 mRNA 表达 收集细胞提取总 RNA, 检测 RNA 纯度, 合格后反转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板、以 β -actin 为内参基因进行 qPCR 反应, 反应体系共 25 μL, 反应条件: 50 °C 2 min, 95 °C 10 min, 1 个循环; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40 个循环。qPCR 反应前 3~15 个循环的荧光信号作为荧光本底信号, 调节基线至适宜处作为阈值, 各荧光曲线与基线交叉点的循环数即为 Ct 值。根据公式 $\Delta Ct = Ct$ (目的基因) - Ct (内参基因) 和 $\Delta\Delta Ct = 2^{-\Delta Ct}$, 计算各目的基因的相对表达量, 各组实验重复 3 次, 取平均值。*JAK2V617F* MGB 荧光探针上游引物 5'-FAM-TCA CAA GCA TTT GGT TTT-MGB-3', *JAK2V617F* 下游引物: 5'-CCA GAA TAT TCT CGT CTC CAC TGA A-3'。根据标准品计算 *JAK2* 和 *JAK2V617F* 的绝对拷贝数量, 计算 *JAK2V617F*/*JAK2* 比值。全序列引物设计见表 1。

1.3.4 蛋白质印迹法检测 HEL 细胞中 *JAK2*、p-*JAK2*、*SOCS1* 和 *SHP1* 的蛋白表达 收集细胞 (约 1×10^7 个), 于冰上加预冷蛋白裂解液和 PMSF, 4 °C 裂解 1 h, 离心收集上清液, 用考马斯亮蓝试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司) 测定样品上清液中的蛋白浓度。取适量蛋白样品加入上样缓冲液混匀, 高温变性。样品经 120 V 恒压

聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 4 °C 100 V 恒压 2 h 电转移至 PVDF 膜, 然后用 5% 脱脂奶粉溶液常温封闭 2 h, TBST 洗膜。加 JAK2 (1 : 700 稀释)、p-JAK2 (1 : 500 稀释)、SHP1 (1 : 500 稀释) 和 SOCS1 (1 : 500 稀释) 一抗, 4 °C 摇床孵育过夜。TBST 洗膜 3 次后, 加入二抗, 37 °C 孵育 2 h, TBST 再次漂洗, 显影、拍照, 并进行灰度扫描和分析。

表 1 qPCR 引物序列

Tab 1 Primer sequence for qPCR

| Primer | Sequence (5' - 3') |
|----------------|--------------------------------------|
| <i>JAK2</i> | F: CAG CAA GTA TGA TGA GCA AGC TTT |
| | R: TGA ACC AGA ATA TTC TCG TCT CCA C |
| <i>SOCS1</i> | F: ACC AGG TGG CAG CCG ACA AAT |
| | R: GCG AAC GGA ATG TGC GGA AGT |
| <i>SHP1</i> | F: CAG AAG CAG GAG GTG AAG AAC |
| | R: GAT GTA GTT GGC ATT GAT GTA GTC |
| <i>β-Actin</i> | F: GCG GAC ATC CGC AAA GAC |
| | R: AAA GGG TGT AAC GCA ACT AA |

JAK2: Janus kinase 2; SOCS1: Suppressor of cytokine signaling 1; SHP1: SH2-containing protein tyrosine phosphatase 1; F: Forward; R: Reverse

1.4 统计学处理 应用 SPSS 19.0 软件行数据分析。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用方差分析, 进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验。各变量间的相关性分析采用 Spearman 等级相关分析。检验水准 (α) 为 0.05。

表 2 MPN 组和对照组 *JAK2V617F* 突变量和 p-JAK2、SOCS1、SHP1 蛋白表达的比较

Tab 2 Comparison of *JAK2V617F* mutation level, and protein expressions of p-JAK2, SOCS1 and SHP1 between MPN and control groups

| Group | <i>JAK2V617F/JAK2</i> | p-JAK2 | SOCS1 | SHP1 |
|----------------------|-----------------------|---------------|---------------|---------------|
| Control <i>n</i> =24 | 0 | 42.29 ± 15.78 | 51.68 ± 18.33 | 47.97 ± 20.11 |
| MPN <i>n</i> =48 | 57.33 ± 20.82 | 74.01 ± 23.19 | 18.08 ± 7.90 | 25.23 ± 13.62 |
| <i>t</i> value | | 6.03 | 10.89 | 5.67 |
| <i>P</i> value | | 0.00 | 0.00 | 0.00 |

MPN: Myeloproliferative neoplasm; *JAK2V617F*: Janus kinase 2 V617F; JAK2: Janus kinase 2; p-JAK2: Phosphorylated Janus kinase 2; SOCS1: Suppressor of cytokine signaling 1; SHP1: SH2-containing protein tyrosine phosphatase 1

2.2 *JAK2V617F* 突变量与 p-JAK2、SOCS1、SHP1 蛋白表达量之间的关系 相关分析表明, MPN 组织中 SOCS1、SHP1 蛋白表达量均与 *JAK2V617F* 突变量呈负相关 ($r = -0.648$ 、 -0.692 ,

2 结果

2.1 MPN 患者 *JAK2V617F* 突变量和 p-JAK2、SOCS1、SHP1 蛋白的表达水平 MPN 组 *JAK2V617F/JAK2* 比值为 (57.33 ± 20.82)%, 对照组为 0%。骨髓病理组织中 p-JAK2、SOCS1、SHP1 蛋白均表达于细胞质中, 三者 MPN 组中的表达水平与对照组相比差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01)。见图 1 和表 2。

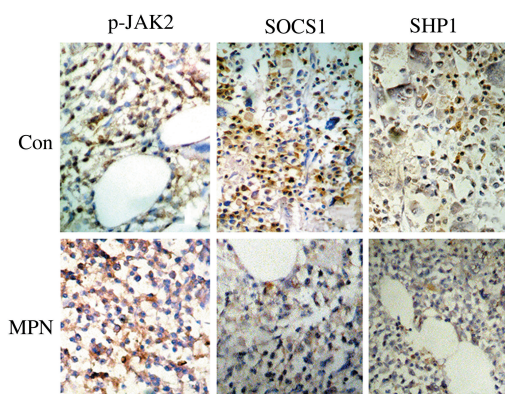


图 1 MPN 组和对照组骨髓病理组织中 p-JAK2、SOCS1、SHP1 的表达

Fig 1 Expressions of p-JAK2, SOCS1, and SHP1 in bone marrow tissues in MPN and Con groups

Con: Control; MPN: Myeloproliferative neoplasm; p-JAK2: Phosphorylated Janus kinase 2; SOCS1: Suppressor of cytokine signaling 1; SHP1: SH2-containing protein tyrosine phosphatase 1. Immunohistochemical staining. Original magnification: ×400

P 均 < 0.05)。以 50% 为界值, 将 MPN 患者分为 *JAK2V617F/JAK2* 比值 $\geq 50\%$ 和 $< 50\%$ 两组, *JAK2V617F/JAK2* 比值 $\geq 50\%$ 的 MPN 患者 22 例, $< 50\%$ 者 26 例。对两组 MPN 患者

SOCS1、SHP1 蛋白表达水平进行分析, 结果(表 3)表明, *JAK2V617F/JAK2* 比值 $\geq 50\%$ 的 MPN 患者骨髓病理组织中 SOCS1、SHP1 的蛋白表达水平均低于 *JAK2V617F/JAK2* 比值 $< 50\%$ 者 (P 均 < 0.01), p-JAK2 的蛋白表达水平高于 *JAK2V617F/JAK2* 比值 $< 50\%$ 者 ($P < 0.01$)。

表 3 *JAK2V617F* 突变量与 p-JAK2、SOCS1、SHP1 蛋白表达的关系

Tab 3 Relationships between *JAK2V617F* mutation and protein expressions of p-JAK2, SOCS1 and SHP1

| | %, $\bar{x} \pm s$ | | |
|-----------------------|--------------------|------------------|------------------|
| <i>JAK2V617F/JAK2</i> | p-JAK2 | SOCS1 | SHP1 |
| $\geq 50\%$ $n=22$ | 89.91 \pm 19.49 | 14.22 \pm 6.71 | 13.11 \pm 5.21 |
| $< 50\%$ $n=26$ | 60.56 \pm 16.77 | 21.34 \pm 7.43 | 35.48 \pm 9.34 |
| <i>t</i> value | 5.61 | 3.46 | 9.99 |
| <i>P</i> value | 0.00 | 0.00 | 0.00 |

JAK2V617F: Janus kinase 2 V617F; *JAK2*: Janus kinase 2; p-JAK2: Phosphorylated Janus kinase 2; SOCS1: Suppressor of cytokine signaling 1; SHP1: SH2-containing protein tyrosine phosphatase 1

2.3 鲁索替尼和HEL细胞活力的量效关系 CCK-8法检测结果显示, 不同浓度的鲁索替尼均可影响 HEL 细胞活力, 并且随着鲁索替尼浓度的增加细胞活力呈逐渐降低趋势。浓度为 50、100、250、500 和 1 000 nmol/L 的鲁索替尼分别处理 HEL 细胞 48 h 后, HEL 细胞活力分别为 (70.14 \pm 3.21) %、(59.71 \pm 3.46) %、(52.05 \pm 2.88) %、(43.31 \pm 2.16) % 和 (38.56 \pm 2.08) %。在鲁索替尼处理 24 h 时, HEL 细胞活力较 0 h 时下降, 250 nmol/L 鲁索替尼处理 HEL 细胞 24、48、72 h 时的细胞活力分别为 (60.06 \pm 3.87) %、(52.05 \pm 2.88) %、(36.43 \pm 2.01) %, 表明随着鲁索替尼处理时间的延长, 细胞活力逐渐降低。

2.4 不同浓度鲁索替尼对 HEL 细胞 *JAK2*、SOCS1、SHP1 的 mRNA 和蛋白以及 p-JAK2 蛋白表达的影响 结果如图 2、表 4 所示, 不同浓度鲁索替尼处理 HEL 细胞 48 h 后, 随着浓度的增加 *JAK2* mRNA 表达水平逐渐降低 ($F=60.84$, $P < 0.01$), *SOCS1*、*SHP1* mRNA 表达水平逐渐升高 ($F=34.20$ 、 87.23 , P 均 < 0.01)。不同浓度鲁索替尼处理 HEL 细胞 48 h 后, 随着鲁索替尼浓度的增加, HEL 细胞中 *JAK2*、p-JAK2 蛋白表达水平逐

渐降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), *SOCS1*、*SHP1* 的表达水平则逐渐升高 (P 均 < 0.01)。与鲁索替尼对 HEL 细胞中 *JAK2*、*SOCS1*、*SHP1* mRNA 的调控效应结果一致。

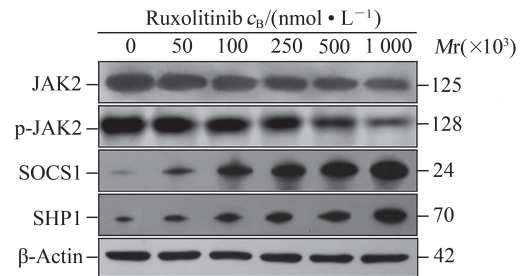


图 2 不同浓度鲁索替尼处理后 HEL 细胞中 *JAK2*、p-JAK2、SOCS1、SHP1 蛋白的表达

Fig 2 Expressions of *JAK2*, p-JAK2, SOCS1 and SHP1 proteins in HEL cells after treating with ruxolitinib at different concentrations

Western blotting analysis. *JAK2*: Janus kinase 2; p-JAK2: Phosphorylated Janus kinase 2; SOCS1: Suppressor of cytokine signaling 1; SHP1: SH2-containing protein tyrosine phosphatase 1

3 讨论

JAK/STAT 通路参与细胞增殖、分化、凋亡等生物学行为, 在细胞因子受体介导的信号通路中起核心作用, 是多数细胞因子的转导途径并活化相关靶基因^[7,11]。诸多研究表明, 肿瘤的发生、发展与 *JAK/STAT* 信号通路的异常激活密切相关。费城染色体阴性的 MPN 患者中常常存在 *JAK2V617F*、*JAK2* 基因第 12 外显子突变, 并且 *JAK2V617F* 突变发生率最高^[2]。*JAK2V617F* 突变导致酪氨酸激酶过度活化从而持续激活 *JAK/STAT* 信号通路。本研究采用 qPCR 检测了 48 例 MPN 患者的 *JAK2V617F* 突变量, 结果为 (57.33 \pm 20.82) %, 其中突变量 $\geq 50\%$ 的比例为 45.83% (22/48), 对照组的突变量则为 0%。Zhao 等^[12]研究了 170 例 PV 和 ET 患者 *JAK2V617F* 突变量, 所有患者 *JAK2V617F* 突变量中位数为 15.6%, 突变量 $> 50\%$ 的比例分别为 35.2% 和 11.2%, 低于本研究结果, 分析原因, 本研究检测的是 *JAK2* 突变阳性的 MPN 患者, 而 Zhao 等的结果则是统计了包括 *JAK2V617F* 突变阴性的所有 PV 和 ET 患者。另外, 本研究应用免疫组织化学法检测的 MPN 患者 p-JAK2 蛋白表达量为 (74.01 \pm 23.19) %, 对

对照组为 (42.29 ± 15.78)%, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 表明 MPN 患者 *JAK2V617F* 突变量

和 JAK2 的活性均存在异常。

表 4 不同浓度鲁索替尼处理后 HEL 细胞中 JAK2、SOCS1、SHP1 的 mRNA 和蛋白以及 p-JAK2 蛋白的表达

Tab 4 Expressions of JAK2, SOCS1 and SHP1 mRNA and proteins, and p-JAK2 protein in HEL cells after treating with ruxolitinib at different concentrations

$n=3, \bar{x} \pm s$

| Item | Concentration $c_B / (\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1})$ | | | | | | F value | P value |
|--------------|---|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------|---------|
| | 0 | 50 | 100 | 250 | 500 | 1 000 | | |
| mRNA | | | | | | | | |
| <i>JAK2</i> | 0.429 ± 0.038 | 0.371 ± 0.027 | 0.249 ± 0.030 | 0.192 ± 0.028 | 0.141 ± 0.025 | 0.091 ± 0.009 | 60.84 | <0.01 |
| <i>SOCS1</i> | 0.092 ± 0.009 | 0.153 ± 0.016 | 0.211 ± 0.022 | 0.237 ± 0.021 | 0.261 ± 0.031 | 0.331 ± 0.028 | 34.20 | <0.01 |
| <i>SHP1</i> | 0.089 ± 0.008 | 0.146 ± 0.012 | 0.188 ± 0.022 | 0.251 ± 0.027 | 0.354 ± 0.031 | 0.393 ± 0.032 | 87.23 | <0.01 |
| Protein | | | | | | | | |
| JAK2 | 1.752 ± 0.142 | 1.740 ± 0.136 | 1.717 ± 0.121 | 1.594 ± 0.111 | 1.540 ± 0.102 | 1.431 ± 0.103 | 3.47 | <0.05 |
| p-JAK2 | 1.844 ± 0.142 | 1.837 ± 0.140 | 1.828 ± 0.138 | 1.578 ± 0.132 | 1.190 ± 0.111 | 0.868 ± 0.062 | 32.63 | <0.01 |
| SOCS1 | 0.458 ± 0.032 | 0.804 ± 0.042 | 1.355 ± 0.106 | 1.400 ± 0.122 | 1.758 ± 0.151 | 1.858 ± 0.148 | 72.60 | <0.01 |
| SHP1 | 0.542 ± 0.042 | 0.697 ± 0.039 | 1.021 ± 0.096 | 1.103 ± 0.079 | 1.106 ± 0.092 | 1.589 ± 0.137 | 52.48 | <0.01 |

JAK2: Janus kinase 2; SOCS1: Suppressor of cytokine signaling 1; SHP1: SH2-containing protein tyrosine phosphatase 1; p-JAK2: Phosphorylated Janus kinase 2

SOCS1 不仅是 JAK/STAT 信号通路的靶基因, 也是其负反馈调控因子, 最终影响细胞的生长、增殖等生物学行为, 从而抑制疾病、肿瘤的进展。*SHP1* 是上皮和部分造血细胞恶性肿瘤的抑癌基因, 是一种含 SH2 域的胞质酪氨酸磷酸酶, 常通过 JAK/STAT 信号通路在造血细胞增殖分化中发挥负调控作用。多项研究表明, 在乳腺癌、多发性骨髓瘤、急性髓细胞白血病等多种恶性肿瘤中发现 SOCS、SHP1 参与 JAK/STAT 的负向调节^[13-16], 但在 MPN 患者中尚未见相关报道。因此本研究检测了 MPN 患者肿瘤组织中 SOCS1、SHP1 蛋白表达情况, 发现在 MPN 患者中 SOCS1、SHP1 蛋白表达较对照组降低 ($P < 0.01$), 并且与 *JAK2V617F* 突变量呈负相关 (SOCS1: $r = -0.648$, SHP1: $r = -0.692$; P 均 < 0.01), 进一步证实了 MPN 中 SOCS1、SHP1 与 JAK/STAT 的负向调控关系, 为后续实验奠定了基础。

近期发表的 III 期临床试验证实了鲁索替尼的临床疗效^[17]。本课题组前期研究显示, 鲁索替尼能通过抑制 JAK/STAT 信号通路活化, 抑制 MPN 患者肿瘤组织和 HEL 细胞中 p-JAK2 的表达, 干扰下游靶基因与基质金属蛋白酶 (matrix metalloprotein, MMP) -2、MMP-9 启动基因的结

合, 下调 MMP-2、MMP-9 表达, 从而抑制 MMP-2、MMP-9 参与的肿瘤细胞的侵袭和迁移过程, 阻断了肿瘤细胞的无限增殖与迁移^[18]。本研究在既往研究的基础上, 进一步应用鲁索替尼处理具有 *JAK2V617F* 突变的人红白血病细胞系 HEL 细胞, 发现不同剂量的鲁索替尼能够抑制 HEL 细胞活力, 影响其增殖。

一项对骨髓纤维化患者的长期临床观察的研究结果显示, 经过鲁索替尼治疗后 *JAK2V617F* 突变量降低, 约 50% 的患者纤维化程度得到改善或者病情稳定^[19]。考虑到 MPN 患者中 SOCS1、SHP1 蛋白表达较对照组降低, 因此, 本研究还探讨了鲁索替尼是否能够通过调控 JAK/STAT 上调 SOCS1、SHP1 的表达。随着鲁索替尼浓度的增加, 鲁索替尼对 HEL 细胞 JAK2 mRNA、蛋白和 p-JAK2 蛋白表达的抑制作用逐渐增加, 同时 SOCS1、SHP1 在 mRNA 和蛋白的表达水平均逐渐上升, 表明鲁索替尼能够以 *SOCS1*、*SHP1* 为靶标, 通过促进或阻断 JAK/STAT 通路达到治疗 MPN 的目的。

由此可见, MPN 患者 *JAK2V617F* 突变细胞中 SOCS1、SHP1 低表达, 并且与 *JAK2V617F* 突变量密切相关, 鲁索替尼能够抑制 *JAK2V617F* 突变

HEL 细胞的增殖, 并通过调控 SOCS1、SHP1 抑制 JAK2 信号通路, 从而抑制 MPN 细胞增殖。

[参 考 文 献]

- [1] KIM Y, PARK J, JO I, LEE G D, KIM J, KWON A, et al. Genetic-pathologic characterization of myeloproliferative neoplasms[J/OL]. *Exp Mol Med*, 2016, 48: e247. doi: 10.1038/emm.2016.55.
- [2] O' SULLIVAN J M, HARRISON C N. JAK-STAT signaling in the therapeutic landscape of myeloproliferative neoplasms[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2017, 451: 71-79.
- [3] QUINTÁS-CARDAMA A, VADDI K, LIU P, MANSOURI T, LI J, SCHERLE P A, et al. Preclinical characterization of the selective JAK1/2 inhibitor INCB018424: therapeutic implications for the treatment of myeloproliferative neoplasms[J]. *Blood*, 2010, 115: 3109-3117.
- [4] VERSTOVSEK S, MESA R A, GOTLIB J, LEVY R S, GUPTA V, DIPERSIO J F, et al. A double-blind, placebo-controlled trial of ruxolitinib for myelofibrosis[J]. *N Engl J Med*, 2012, 366: 799-807.
- [5] HARRISON C, KILADJIAN J J, AL-ALI H K, GISSLINGER H, WALTZMAN R, STALBOVSKAVA V, et al. JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis[J]. *N Engl J Med*, 2012, 366: 787-798.
- [6] CERVANTES F, VANNUCCHI A M, KILADJIAN J J, AL-ALI H K, SIRULNIK A, STALBOVSKAVA V, et al. Three-year efficacy, safety, and survival findings from COMFORT-II, a phase 3 study comparing ruxolitinib with best available therapy for myelofibrosis[J]. *Blood*, 2013, 122: 4047-4053.
- [7] RAMPAL R, AL-SHAHROUR F, ABDEL-WAHAB O, PATEL J P, BRUNEL J P, MERMEL C H, et al. Integrated genomic analysis illustrates the central role of JAK-STAT pathway activation in myeloproliferative neoplasm pathogenesis[J/OL]. *Blood*, 2014, 123: e123-e133. doi: 10.1182/blood-2014-02-554634.
- [8] PFITZNER E, KLIEM S, BAUS D, LITTERST C M. The role of STATs in inflammation and inflammatory diseases[J]. *Curr Pharm Des*, 2004, 10: 2839-2850.
- [9] MIGONE T S, CACALANO N A, TAYLOR N, YI T, WALDMANN T A, JOHNSTON J A. Recruitment of SH2-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1 to the interleukin 2 receptor; loss of SHP-1 expression in human T-lymphotropic virus type I-transformed T cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 3845-3850.
- [10] BARBUI T, THIELE J, VANNUCCHI A M, TEFFERI A. Rationale for revision and proposed changes of the WHO diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia and primary myelofibrosis[J/OL]. *Blood Cancer J*, 2015, 5: e337. doi: 10.1038/bcj.2015.64.
- [11] 徐倩,刘贵敏,谷蕾,梁文同,成志勇. 鲁索替尼对人红白血病 HEL 细胞增殖、凋亡作用的研究[J]. *第二军医大学学报*, 2016, 37: 52-58.
- [12] XU Q, LIU G M, GU L, LIANG W T, CHENG Z Y. Effect of ruxolitinib on proliferation and apoptosis in human erythroleukemia leukemia[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2016, 37: 52-58.
- [13] ZHAO S, ZHANG X, XU Y, FENG Y U, SHENG W, CEN J, et al. Impact of *JAK2V617F* mutation burden on disease phenotype in Chinese patients with *JAK2V617F*-positive polycythemia vera (PV) and essential thrombocythemia (ET)[J]. *Int J Med Sci*, 2016, 13: 85-91.
- [14] SLATTERY M L, LUNDGREEN A, HINES L M, TORRES-MEJIA G, WOLFF R K, STERN M C, et al. Genetic variation in the JAK/STAT/SOCS signaling pathway influences breast cancer-specific mortality through interaction with cigarette smoking and use of aspirin/NSAIDs: the Breast Cancer Health Disparities Study[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2014, 147: 145-158.
- [15] BELDI-FERCHIOU A, SKOURI N, BEN ALI C, SAFRA I, ABDELKEFI A, LADEB S, et al. Abnormal repression of SHP-1, SHP-2 and SOCS-1 transcription sustains the activation of the JAK/STAT3 pathway and the progression of the disease in multiple myeloma[J/OL]. *PLoS One*, 2017, 12: e0174835. doi: 10.1371/journal.pone.0174835.
- [16] AL-JAMAL H A, MAT JUSOH S A, HASSAN R, JOHAN M F. Enhancing SHP-1 expression with 5-azacytidine may inhibit STAT3 activation and confer sensitivity in lestaurtinib (CEP-701)-resistant FLT3-ITD positive acute myeloid leukemia[J/OL]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 869. doi: 10.1186/s12885-015-1695-x.
- [17] LIONGUE C, WARD A C. Evolution of the JAK-STAT pathway[J/OL]. *JAKSTAT*, 2013, 2: e22756. doi: 10.4161/jkst.22756.
- [18] VANNUCCHI A M, KILADJIAN J J, GRIESSHAMMER M, MASSZI T, DURRANT S, PASSAMONTI F, et al. Ruxolitinib versus standard therapy for the treatment of polycythemia vera[J]. *N Engl J Med*, 2015, 372: 426-435. doi: 10.1056/NEJMoa1409002.
- [19] 刘贵敏,张丽军,付建珠,梁文同,成志勇,白萍,等. Ruxolitinib 对 *JAK2V617F* 阳性骨髓增殖性肿瘤细胞基质金属蛋白酶调控的研究[J]. *中华血液学杂志*, 2017, 38: 140-145.
- [20] MASSARO F, MOLICA M, BRECCIA M. How ruxolitinib modified the outcome in myelofibrosis: focus on overall survival, allele burden reduction and fibrosis changes[J]. *Expert Rev Hematol*, 2017, 10: 155-159.

[本文编辑] 杨亚红