

IFN- α 2b 对 JAK2V617F 突变的骨髓增殖性肿瘤 COX-2 表达及血管新生的影响^{*}

赵亚玲^{1,2}, 张丽军^{1,2}, 付建珠^{1,2}, 徐 倩^{1,2}, 刘贵敏^{1,2}, 谢旭磊¹, 梁文同¹, 成志勇^{1 Δ}

1. 保定市第一医院 血液内科 (保定 071000); 2. 承德医学院研究生学院 (承德 067000)

【摘要】 目的 研究干扰素- α 2b (IFN- α 2b)对骨髓增殖性肿瘤(MPN)患者 JAK2 激酶、环氧化酶-2 (COX-2)及微血管密度的影响及人红白血病 HEL 细胞系中 JAK2V617F 与 COX-2 之间的关系。**方法** 收集在保定市第一医院接受初次治疗的 42 例有 JAK2V617F 突变的 MPN 患者,其中 17 例患者为 IFN- α 2b 治疗组(给予 IFN- α 2b 肌肉注射治疗),25 例为初治组(未行治疗)。另取同期 10 例特发性免疫性血小板减少性紫癜(ITP)患者作为对照。采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 MPN 患者 JAK2V617F/JAK2 突变量,免疫组化检测 MPN 患者和 ITP 患者骨髓病理组织 p-JAK2、COX-2 及 CD105 标记的微血管密度(MVD)。用不同浓度 IFN- α 2b 作用于 HEL 细胞系,CCK-8 检测细胞增殖抑制率,流式细胞术检测凋亡率,Transwell 小室检测细胞迁移能力,半定量 PCR 检测 HEL 细胞中 JAK2、COX-2 mRNA 表达水平,Western blot 检测 p-JAK2、COX-2 蛋白表达水平。**结果** 初治组患者 p-JAK2、COX-2 表达水平及 MVD 高于对照组,IFN- α 2b 治疗后患者 p-JAK2、COX-2 及 MVD 表达水平减低。不同剂量 IFN- α 2b 作用 HEL 细胞 48 h,细胞增殖抑制率和细胞凋亡率随其剂量增加逐渐上升,JAK2 及 COX-2 mRNA 及 p-JAK2、COX-2 蛋白表达随其剂量增加逐渐降低。细胞迁移实验结果发现加入 0.5×10^4 U/L IFN- α 2b 处理 HEL 细胞 24 h,迁移至下室的细胞数低于对照组($P < 0.05$)。**结论** IFN- α 2b 通过调控 JAK2 信号通路抑制 COX-2 及 MPN 患者血管新生。

【关键词】 干扰素- α 2b 骨髓增殖性肿瘤 微血管密度 HEL 细胞系 COX-2

Effect of IFN- α 2b on COX-2 and Angiogenesis in JAK2V617F Mutation Myeloproliferative Neoplasms ZHAO Ya-ling^{1,2}, ZHANG Li-jun^{1,2}, FU Jian-zhu^{1,2}, XU Qian^{1,2}, LIU Gui-min^{1,2}, XIE Xu-lei¹, LIANG Wen-tong¹, CHENG Zhi-yong^{1 Δ} . 1. Department of Hematology, the First Hospital of Baoding, Baoding 071000, China; 2. Postgraduate Research Institute, Chengde Medical College, Chengde 067000, China

Δ Corresponding author, E-mail: dzczy@sohu.com

【Abstract】 Objective To investigate the influence of interferon- α 2b (IFN- α 2b) with JAK2 kinase, COX-2 and microvessel density in patients of MPN and the relation of JAK2V617F and COX-2 in human erythroleukemia cell line (HEL) cells. **Methods** Forty-two cases of MPN patients with JAK2V617F mutation of initial treatment were collected from the Frist hospital of Baoding, including the IFN- α 2b treatment group with 17 cases and untreated group with 25 cases. 10 cases of idiopathic immune thrombocytopenic purpura (ITP) patients synchronization were enrolled as controls. JAK2V617F/JAK2 mutation burden of MPN patients was detected by real time PCR (qRT-PCR); the expression levels of p-JAK2, COX-2 and microvascular density (MVD) marked with CD105 in pathological tissues of bone marrow in patients of MPN and ITP were detected by immunohistochemistry. The HEL cells were treated with different concentrations of IFN- α 2b. The cell proliferation inhibition rate was calculated by CCK-8 test; the apoptosis rate was detected by flow cytometry; cell migration ability was tested by transwell chambers. JAK2 and COX-2 mRNA were detected by semi-quantitative PCR; p-JAK2 and COX-2 protein in HEL cells were detected by Western blotting. **Results** The expression levels of p-JAK2, COX-2 protein and MVD in untreated group were significantly higher than those of control groups. p-JAK2, COX-2 and MVD levels were significantly reduced in patients treated with IFN- α 2b. Cell growth inhibition rates and apoptosis rates raise up by dose of IFN- α 2b in HEL cells at 48 h. The mRNA expression levels of JAK2 and COX-2 as well as protein expression levels of p-JAK2 and COX-2 had a decreasing tendency with the increase of IFN- α 2b concentration at 48 h. The migration capacity level of HEL cells which treated with 0.5×10^4 U/L IFN- α 2b after 24 h was lower than that of control group. **Conclusion** Angiogenesis of MPN and COX-2 were inhibited by IFN- α 2b which regulates JAK2 signal pathway.

^{*} 河北省重点研发科技项目(No. 162777120D)和 2012 年保定市科学技术研究与发展指导计划(No. 12ZF105)资助

Δ 通信作者, E-mail: dzczy@sohu.com

【Key words】 IFN- α 2b Myeloproliferative neoplasm Microvascular density HEL cell line COX-2

血管新生是指在多种促血管新生因子如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)等作用下,内皮细胞增殖、迁移,在原有血管基础上形成新的毛细血管网^[1-2]。其参与多种实体肿瘤及血液肿瘤的增殖、浸润及转移,并与预后密切相关^[3]。研究表明,骨髓增殖性肿瘤(myeloproliferative neoplasm, MPN)患者可能存在 JAK2 激酶点突变即 JAK2V617F^[4],该突变会导致 JAK2-STAT5 信号通路的持续活化,诱导细胞过度增殖。研究表明在 MPN 患者中微血管密度(microvessel density, MVD)明显高于正常人^[5-6]。干扰素- α -2b(interferon- α -2b, IFN- α 2b)作为细胞因子,具有广泛的生物学特性,具有明显抗血管生成作用。研究显示 IFN- α 2b 可明显减少 MPN 患者 JAK2V617F 拷贝数,并在多种不同类型 MPN 临床试验中有显著疗效^[4]。

本实验通过研究 IFN- α 2b 对 JAK2V617F 突变的 MPN 患者和 JAK2V617F 突变阳性人红白血病细胞系 HEL 细胞 JAK2 激酶、COX-2 以及血管新生的影响,初步探讨了 IFN- α 2b 抑制血管新生作用机制,为抗血管新生治疗 MPN 提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 对象

收集 2012 年 1 月至 2014 年 10 月在保定市第一医院门诊或住院接受了定量 PCR 检测确定有 JAK2V617F 突变的 MPN 患者 42 例,其诊断均符合《血液病诊断及疗效标准》^[7],其中男 18 例,女 24 例,年龄 32~75 岁,中位年龄 57 岁。其中原发性血小板增多症(ET)17 例,真性红细胞增多症(PV)10 例,原发性骨髓纤维化(PMF)15 例;42 例 MPN 患者中按照取样时间分为初治组(未行治疗)25 例,IFN- α 2b 治疗组 17 例;另收集 10 例特发性血小板减少性紫癜(idiopathic immune thrombocytopenic purpura, ITP)患者作为对照组,其中男 5 例,女 5 例,年龄 27~65 岁,平均年龄(40 $\pm$ 7)岁。所有对象均签署知情同意书。

1.2 样本收集

对照组及初治组均为诊断时即抽取骨髓液及骨髓组织进行活检。IFN- α 2b 治疗组所有 MPN 患者

均接受 IFN- α 2b(与本次细胞实验中 IFN- α 2b 同厂家不同批次)皮下或肌肉注射,每次 300 $\times$ 10⁴ U, 3~7 次/周,治疗 6~8 月后抽取骨髓液及骨髓组织进行活检。操作者均为我科医生。

1.3 细胞系

HEL 细胞购自上海科学院细胞库,作为细胞实验的研究对象。用含 10% 新生牛血清(FBS)的 RPMI1640 培养基培养;均在 37 $^{\circ}$ C、体积分数为 5% 的 CO₂ 饱和湿度环境培养。

1.4 试剂和仪器

IFN- α 2b 购自哈药集团生物工程有限公司(批号 20130911),使用前溶于磷酸盐缓冲液(PBS)中配成 10 $\times$ 10⁴ U/L,放置于-20 $^{\circ}$ C 保存。p-JAK2 兔抗人多克隆抗体(phospho-Y211)、COX-2 兔抗人多克隆抗体及 HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体均购自美国 Santa Cruz 公司;Elivision plus 试剂盒、DAB 显色剂、CD105 单克隆抗体购自中杉金桥公司。CCK-8 购自日本同仁化学研究所;血液基因组 DNA 提取试剂盒购自北京博迈德生化科技有限公司;引物由北京赛百盛公司合成;TaqMan Gene Expression MasterMix 购自 ABI 公司。

1.5 实验方法

1.5.1 免疫组织化学染色检测患者骨髓组织中 p-JAK2、COX-2 的表达和 MVD 取 MPN 及 ITP 患者骨髓组织蜡块行 4 μ m 切片,常规免疫组化染色步骤,后按 Elivision plus 试剂盒说明书进行操作,滴加一抗 p-JAK2、COX-2、CD105(工作浓度分别为 1:50、1:100、1:500)。COX-2 阳性着色定位于胞浆, p-JAK2 阳性着色定位于胞浆或胞核,其阳性表达呈棕黄色或棕褐色颗粒。计数每高倍镜视野(</HP)区域($\times$ 400)阳性细胞比例及 MVD。

1.5.2 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 MPN 患者 JAK2V617F 突变率 分别采集 42 例 MPN 患者新鲜骨髓液 4 mL 以 100 U/mL 的肝素抗凝。应用 DNA 提取试剂盒提取标本的基因组 DNA。DNA 终浓度为 50~100 ng/ μ L, -20 $^{\circ}$ C 保存。qRT-PCR 反应(包括探针反应)体系共 25 μ L。反应条件为 50 $^{\circ}$ C 2 min, 95 $^{\circ}$ C 10 min, 1 循环; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环,同时设标准品和空白对照。根据标准品计算 JAK2 和 JAK2V617F 的绝对拷贝数量,计算 JAK2V617F/JAK2 比值(即

JAK2V617F 突变率)。PCR 引物序列及探针如下：JAK2 上游引物：5'-CAG CAA GTA TGA TGA GCA AGC TTT-3'，下游引物：5'-TGA ACC AGA ATA TTC TCG TCT CCAC-3'；探针：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'。

1.5.3 CCK-8 法检测细胞增殖抑制 将 IFN-α2b 用 PBS 缓冲液分别调配至终浓度为 0.5×10⁴ U/L、1×10⁴ U/L、3×10⁴ U/L、5×10⁴ U/L。将 HEL 细胞接种于含 10% FBS 的 RPMI1640 培养液，细胞浓度为 2×10⁵ mL⁻¹，分为 4 组，每组 3 孔，分别加入不同浓度的 IFN-α2b，处理 24、48、72 h，同时设有阴性对照组及空白对照组；在 96 孔板中接种处理好的细胞悬液（每孔 100 μL），每孔约 5 000 个细胞，每个浓度设 3 复孔；每孔加入 10 μL CCK-8 溶液。在细胞培养箱内继续孵育 2 h 后分别用酶标仪测 450 nm 处的吸光度(A)。根据计算不同组 HEL 细胞增殖抑制率，绘制增殖抑制曲线。

1.5.4 流式细胞检测细胞凋亡 按 1.5.3 分组处理细胞 48 h 后，收集各处理组 HEL 细胞，每组细胞 1×10⁶ 个，PBS 洗涤 2 次，离心 5 min，弃上清，加入 1 mL 预冷体积分数为 70% 的乙醇，4 ℃ 过夜；离心，弃上清，PBS 洗涤 2 次；加入 1 mL DNA 抽提缓冲液提取 DNA，室温静置 30 min；离心弃上清，50 μg/mL RnaseA 1 mL，混匀后 37 ℃ 水浴 30 min；离心弃上清，加入 0.1 g/mL 碘化丙啶(propidium iodide,PI)染液，混匀避光 30 min，上机检测。

1.5.5 Transwell 小室迁移实验 调整细胞密度至 5×10⁵ mL⁻¹；取无血清细胞悬液 100 μL 加入 Transwell 小室上室，实验组加入 0.5×10⁴ U/L IFN-α2b，对照组不加 IFN-α2b，下室加入含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基，24 h 后显微镜下观察迁移至下室的细胞数并记数。

1.5.6 半定量 PCR 检测 JAK2 和 COX-2 mRNA 表达 按 1.5.3 分组处理细胞 48 h 后，收集各组 HEL 细胞，PBS 清洗 3 次，离心弃上清，提取总 RNA。电泳鉴定 RNA 并定量，逆转录合成 cDNA。PCR 反应条件为：50 ℃ 2 min，95 ℃ 10 min，1 个循环；95 ℃ 15 s，60 ℃ 1 min，40 个循环。设空白对照。PCR 结束后进行琼脂凝胶电泳。以各条带与 β-actin 的比值代表各基因的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 JAK2、COX-2 及 β-actin 引物序列		
Table 1 The primer sequence of JAK2、COX-2 and β-actin		
Primer	Sequence	Product size/bp
JAK-2	F:5'-CAGCAAGTATGATGAGCAAGCTTT-3'	101
	R:5'-TGAACCAGAATATTCTCGTCTCCAC-3'	
COX-2	F:5'-TCACAGGCTTCCATTGACCAG-3'	198
	R:5'-CCGAGGCTTTTCTACCAGA-3'	
β-actin	F:5'-CTGGCACCACACCTTCTACAAT-3'	382
	R:5'-AATGTCACGCACGATTTCCCGC-3'	

1.5.7 Western blot 检测 p-JAK2 和 COX-2 蛋白的表达 按 1.5.3 分组处理细胞 48 h 后，提取不同处理组细胞总蛋白，常规行 Western blot。一抗为人 p-JAK2 或 COX-2 兔抗人多克隆抗体。进行显影、定影及灰度扫描分析，取得蛋白条带灰度值，分别用 p-JAK2、COX-2 与 β-actin 蛋白条带灰度值的比值作为其对应蛋白条带相对灰度。

1.6 统计学方法

多组间均数比较采用方差分析，组间两两比较选用 *q* 检验或 *t* 检验，α=0.05。

2 结果

2.1 p-JAK2、COX-2 及 MVD 在各组患者骨髓组织中的表达

p-JAK2、COX-2 在初治组患者中表达水平分别为(82.41±11.65)%、(65.66±20.15)%，高于对照组患者[(43.05±4.59)%、(28.69±3.75)%]及 IFN-α2b 治疗组患者表达水平[(60.93±20.57)%、(44.30±12.83)%](*P*<0.05)。初治组的 MVD 为(26.58±5.93)，IFN-α2b 治疗组为(15.86±4.27)，均高于对照组(10.76±4.01)(*P*<0.05)。见图 1。

2.2 JAK2V617F 突变率与 p-JAK2、COX-2、MVD 的关系

MPN 患者的 JAK2V617F 突变率在 26.8%~75.4% 之间。初治组的突变率为(46.17±19.32)%，高于 IFN-α2b 治疗组的突变率(22.69±12.64)%(*P*<0.05)。IFN-α2b 治疗组中有 2 例患者 JAK2V617F 突变转阴性。

以 JAK2V617F/JAK2 比值 50% 为界值将 42 例 MPN 患者分为两组，其中<50% 组 26 例，≥50% 组 16 例，由表 2 可见，JAK2V617F/JAK2<50% 的患者 MVD、p-JAK2、COX-2 的表达低于 JAK2V617F/JAK2≥50% 组(*P*<0.05)。

2.3 IFN-α2b 对 HEL 细胞增殖抑制率的影响

由图 2 可见，不同浓度 IFN-α2b 作用 HEL 细胞 24 h 内细胞增殖抑制率差异无统计学意义(*P*>

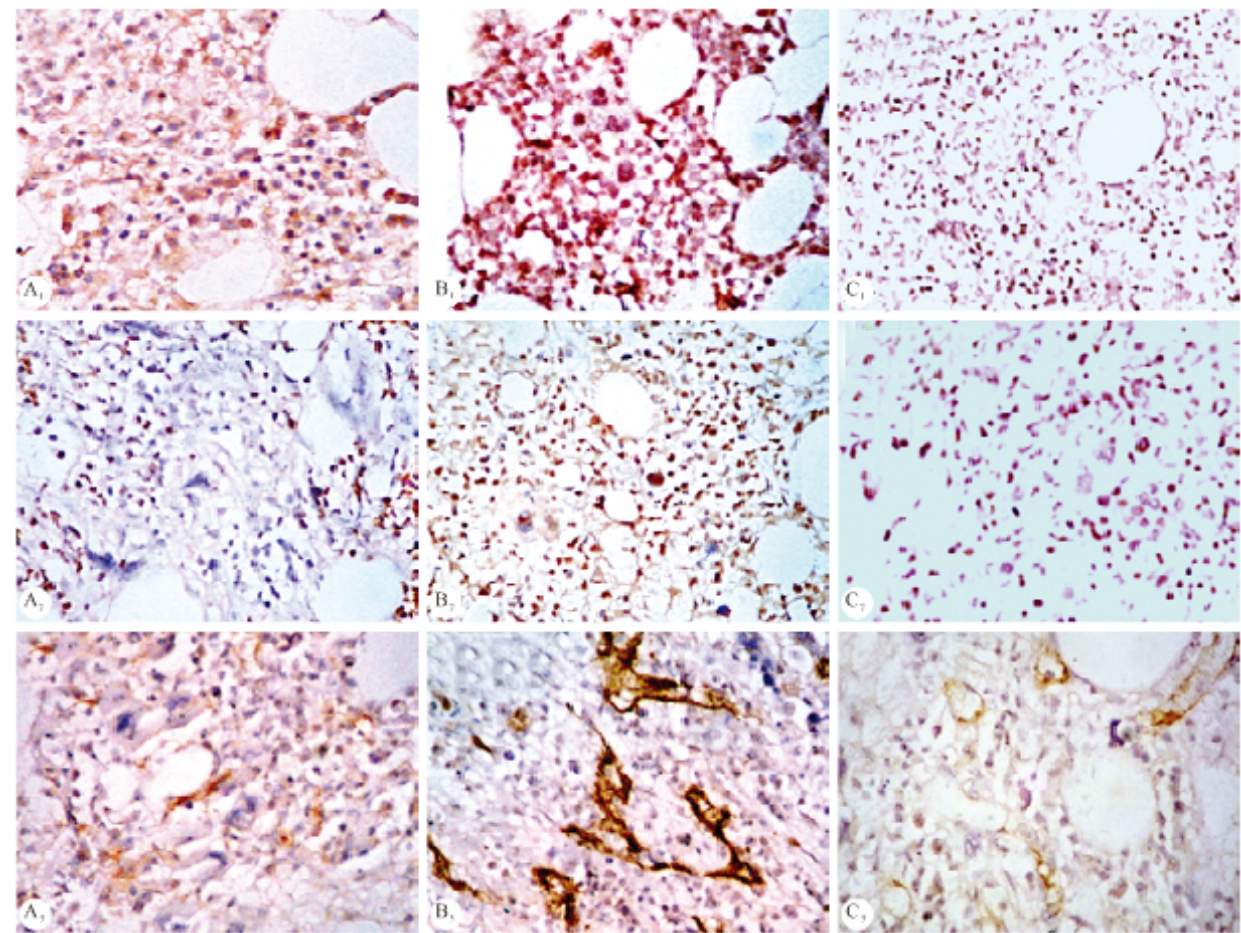


图 1 免疫组织化学染色检测 p-JAK2、COX-2 表达水平和 MVD。Elivision ×100

Fig 1 The expression level of JAK2, COX-2 and MVD detected by immunohistochemistry. Elivision ×100

A: Control group; B: Untreated group; C: Treatment group; 1: p-JAK2; 2: COX-2; 3: MVD

表 2 不同 JAK2V617F 突变水平的 MVD、p-JAK2、COX-2 表达

Table 2 Expression level of p-JAK2, COX-2 and MVD at different JAK2V617F mutations levels

JAK2V617F/ JAK2	Case	MVD/HP ⁻¹	p-JAK2/%	COX-2/%
<50%	26	19.16±5.34	65.15±17.59	44.72±18.41
≥50%	16	34.19±6.57*	89.76±20.56*	69.31±25.46*

* P<0.05, vs. JAK2V617F/JAK2<50%

0.05)。作用 48 h 及 72 h,组间增殖抑制率差异有统计学意义($P<0.05$),且同时点内(48 h 或 72 h)随着 IFN- α 2b 浓度的增加,HEL 细胞抑制率逐渐升高。

2.4 细胞凋亡

不同浓度(0、 0.5×10^4 U/L、 1×10^4 U/L、 3×10^4 U/L、 5×10^4 U/L)IFN- α 2b 作用于 HEL 细胞 48 h 后,HEL 细胞凋亡率分别为(0.51 ± 0.05)%、(1.76 ± 0.25)%、(2.51 ± 0.39)%、(15.02 ± 1.29)%、(20.71 ± 2.54)%,如图 3 所示;IFN- α 2b 可抑制 HEL 细胞的生长,且 HEL 细胞凋亡率随着 IFN- α 2b 浓度的增加而逐渐升高($P<0.05$)。

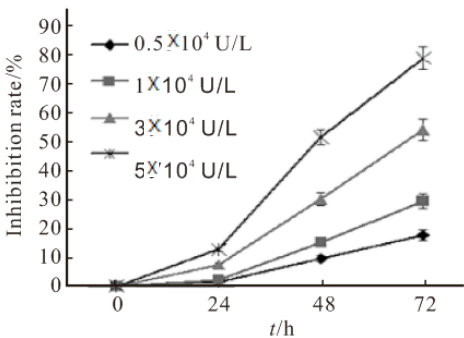


图 2 IFN- α 2b 对 HEL 细胞增殖抑制率的影响

Fig 2 The inhibition rate of HEL cell treated with IFN- α 2b

2.5 IFN- α 2b 对 HEL 细胞迁移的影响

由细胞增殖抑制率实验结果可见,低浓度 IFN- α 2b 作用于 HEL 细胞后 24 h 对 HEL 细胞无明显增殖抑制作用,故我们应用 0.5×10^4 U/L IFN- α 2b 处理 HEL 细胞 24 h 后,显微镜下观察迁移至下室细胞数(52.93 ± 7.51)低于对照组(77.39 ± 6.14 ,

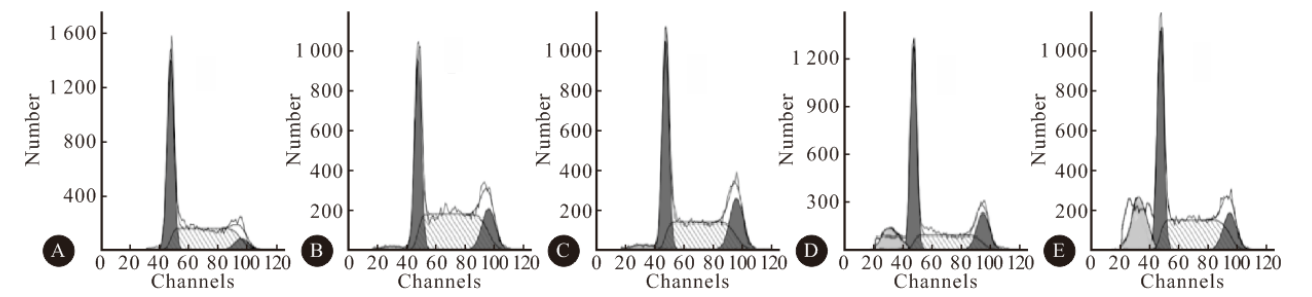


图 3 48 h 时 IFN-α2b 对 HEL 细胞凋亡率的影响

Fig 3 The apoptosis rate of HEL cells treated with IFN-α2b at 48 h

A: 0 U/L; B: 0.5×10^4 U/L; C: 1×10^4 U/L; D: 3×10^4 U/L; E: 5×10^4 U/L

$P < 0.05$).

2.6 IFN-α2b 对 HEL 细胞 JAK2、COX-2 mRNA 及 p-JAK2、COX-2 蛋白表达的影响

半定量 PCR 检测显示(图 4):IFN-α2b 作用于 HEL 细胞 48 h 后,对照和不同浓度的 IFN-α2b (0.5×10^4 U/L、 1×10^4 U/L、 3×10^4 U/L、 5×10^4 U/L)处理组 HEL 细胞 JAK2 mRNA 表达水平分别为(1.354 ± 0.099)、(1.271 ± 0.103)、(0.857 ± 0.091)、(0.443 ± 0.212)、(0.232 ± 0.176)。COX-2 mRNA 表达水平分别为(1.552 ± 0.122)、(1.424 ± 0.193)、(0.912 ± 0.075)、(0.343 ± 0.022)、(0.109 ± 0.016)。Western blot 检测显示(图 5):IFN-α2b 作用于 HEL 细胞 48 h 后,对照和不同浓度 IFN-α2b(0.5×10^4 U/L、 1×10^4 U/L、 3×10^4 U/L、 5×10^4 U/L)处理组 HEL 细胞 p-JAK2 蛋白表达水平分别为(2.504 ± 0.256)、(2.551 ± 0.219)、(1.857 ± 0.159)、(1.032 ± 0.127)、(0.703 ± 0.076)。COX-2 蛋白表达水平分别为(1.241 ± 0.109)、(1.301 ± 0.153)、(0.809 ± 0.063)、(0.351 ± 0.045)、(0.139 ± 0.022)。不同浓

度 IFN-α2b 处理 HEL 细胞系 48 h 后 JAK2、COX-2 mRNA 及 p-JAK2、COX-2 蛋白表达均降低,并随 IFN-α2b 的浓度增加而进行性减低。

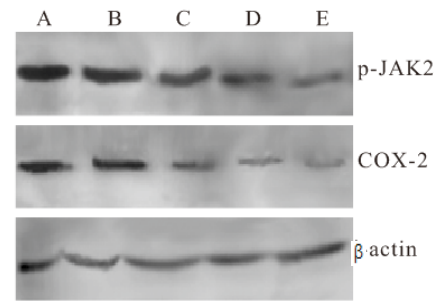


图 5 IFN-α2b 对 HEL 细胞 p-JAK2、COX-2 蛋白表达的影响

Fig 5 The protein expression levels of p-JAK2 and COX-2 in HEL cells treated with IFN-α2b after 48 h

A: Control group; B: 0.5×10^4 U/L; C: 1×10^4 U/L; D: 3×10^4 U/L; E: 5×10^4 U/L

3 讨论

JAK2V617F 突变是 BCR-ABL 阴性骨髓增殖性肿瘤中最常见的点突变之一,该突变可导致 JAK2-STAT5 信号通路异常活化^[4,8-9],JAK2-STAT5 信号通路与肿瘤的增殖、凋亡、侵袭、迁移及血管新生密切相关^[10]。血管新生是指在原有血管基础上形成新的毛细血管网。在包括恶性血液病在内的多种良、恶性肿瘤中存在血管新生,成为预测肿瘤预后的一项重要指标^[1-2]。血管新生与血液系统恶性肿瘤的发生、发展及预后密切相关。在初治 AML 患者骨髓 MVD 是正常人的 2 倍;缓解后恢复正常^[11]。在骨髓增殖性肿瘤患者骨髓中 MVD 明显高于正常人^[5-6]。同时存在 VEGF 及其受体高表达,MVD 随着 JAK2V617F 突变量的增加而增加^[6]。COX-2 作为一种诱导型酶,在多种恶性血液系统疾病中高表达^[12],同时 JAK2 信号活化能够诱导 COX-2 表达^[13]。COX-2 具有如下作用:①刺激

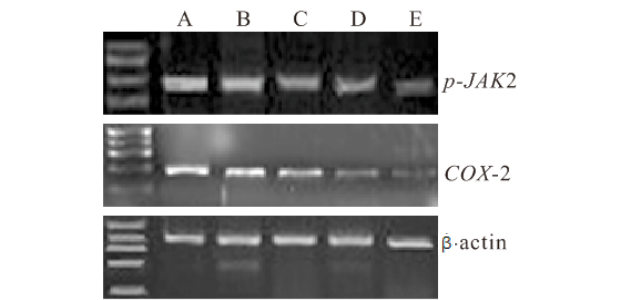


图 4 IFN-α2b 作用 HEL 细胞 48 h 后 JAK2、COX-2 mRNA 的表达

Fig 4 The mRNA expression levels of JAK2 and COX-2 in HEL cells treated with IFN-α2b at 48 h

A: Control group; B: 0.5×10^4 U/L; C: 1×10^4 U/L; D: 3×10^4 U/L; E: 5×10^4 U/L

肿瘤细胞增殖、抑制肿瘤细胞凋亡;②与 VEGF 协同促进肿瘤内血管形成;③与金属基质蛋白酶-2 共同促进肿瘤黏附和转移^[14]。因 ITP 患者不存在 JAK2V617F 突变,且其病理组织中 p-JAK2、COX-2 及 MVD 的水平与正常人相同,故本次实验中我们选用 ITP 患者作为对照组。本组存在 JAK2V617F 突变的 MPN 患者骨髓组织中, p-JAK2、COX-2 及 MVD 的表达均高于对照组, JAK2V617F/ JAK2<50% 的患者 p-JAK2、COX-2 及 MVD 的表达低于 JAK2V617F/ JAK2≥50% 组。以上研究提示 JAK2V617F 突变导致 JAK2 信号通路的活化诱导 COX-2 过表达,从而增加血管新生。

IFN-α2b 具有抗肿瘤作用,同时 JAK-STAT 信号通路中存在干扰素受体表达,因此 IFN-α2b 具有调节 JAK-STAT 信号通路作用^[15]。目前研究表明约 80% 的 MPN 患者在应用 IFN-α2b 后可获得血液学反应,同时不存在向白血病转化的潜在风险,能够减少 JAK2V617F 突变量,甚至部分患者能够达到分子生物学缓解^[16]。本研究结果显示, JAK2V617F 突变的 MPN 患者在应用 IFN-α2b 至少半年后,均出现不同程度分子生物学反应, JAK2V617F 突变量明显减少,有 2 例患者转阴性。p-JAK2、COX-2 及 MVD 的表达也明显低于初治患者。在对 HEL 细胞的实验中也发现,IFN-α2b 能够明显抑制 HEL 细胞增殖及迁移,并促进细胞凋亡;同时对 p-JAK2、COX-2 mRNA 和蛋白表达具有明显的抑制作用。上述研究均提示 IFN-α2b 能够通过作用于 JAK2 信号通路,抑制 JAK2V617F 突变的细胞增殖。

研究表明,IFN 具有抑制实体肿瘤血管新生作用^[17]。本研究结果显示 IFN-α2b 治疗后 MPN 患者 JAK2V617F 突变量明显降低,同时能够降低 MPN 患者 COX-2 表达及 MVD。在 JAK2V617F 突变的红白血病 HEL 细胞中,IFN-α2b 可通过抑制 p-JAK2 的表达降低 COX-2 的分泌,从而抑制 MPN 患者血管新生。

本研究初步探讨了 IFN-α2b、JAK2V617F 突变及 COX-2 之间的相互作用,为抗血管新生治疗 MPN 提供了理论基础。

参 考 文 献

- SONG G, LI Y, JIANG G. Role of VEGF/VEGFR in the pathogenesis of leukemias and as treatment targets. *Oncol Reports*, 2012, 28(6): 1935-1944.
- LI Y, LI S, SUN D, *et al.* Expression of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase and cyclooxygenase-2 in non-small cell lung cancer: correlations with angiogenesis and prognosis. *Oncol Lett*, 2014, 8(4): 1589-1594.
- ABDELAAL AA, AFIFY RA, ZAHER AE, *et al.* Study of prognostic significance of marrow angiogenesis assessment in patients with de novo acute leukemia. *Hematology*, 2015, 20(9): 504-510.
- ZHANG ZR, DUAN YC. Interferon alpha 2b for treating patients with JAK2V617F positive polycythemia vera and essential thrombocytosis. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(4): 1681-1684.
- MEDINGER M, PASSWEG J. Angiogenesis in myeloproliferative neoplasia, new markers and future directions. *Memo*, 2014(7): 206-210 [2015-10-24]. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0040531>.
- BOVERI E, PASSAMONTI F, RUMI E, *et al.* Bone marrow microvessel density in chronic myeloproliferative disorders: a study of 115 patients with clinicopathological and molecular correlations. *Br J Haematol*, 2008, 140(2): 162-168.
- 张之南, 沈 悌. 血液病诊断及疗效标准. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2007: 19.
- 成志勇, 黄月华, 梁文同, 等. 骨髓增殖性肿瘤中 JAK2V617F 突变与 I 型细胞因子受体相关性研究. *中国全科杂志*, 2012, 15(30): 1019-1022.
- WEBER A, BORGHOOTS C, BRENDEN C, *et al.* Stat5 exerts distinct, vital functions in the cytoplasm and nucleus of Bcr-Abl+ K562 and Jak2(V617F)+ HEL leukemia cells. *Cancers (Basel)*, 2015, 7(1): 503-537.
- PARK JH, DARVIN P, LIM EJ, *et al.* Hwanggeumchal sorghum induces cell cycle arrest, and suppresses tumor growth and metastasis through Jak2/STAT pathways in breast cancer xenografts. *PLoS One*, 2012, 7(7): e40531 [2015-10-24]. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0040531>
- NEGAARD HF, IVERSEN N, BOWITZ-LOTHE IM, *et al.* Increased bone marrow microvascular density in haematological malignancies associated with differential regulation of angiogenic factors. *Leukemia*, 2009, 23(1): 162-169.
- RAMON S, WOELLER CF, PHIPPS RP. The influence of Cox-2 and bioactive lipids on hematological cancers Woeller. *Curr Angiogenesis*, 2013, 2(2): 135-142.
- LIU X, JI Q, YE N, *et al.* Berberine inhibits invasion and metastasis of colorectal cancer cells via COX-2/PGE2 mediated JAK2/STAT3 signaling pathway. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0123478 [2015-10-24]. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0123478>.
- XIAO Y, WANG J, QIN Y, *et al.* Ku80 cooperates with CBP to promote COX-2 expression and tumor growth. *Oncotarget*, 2015, 6(10): 8046-8061.
- DILL MT, MAKOWSKA Z, TRINCUCCHI G, *et al.* Pegylated IFN-α regulates hepatic gene expression through transient Jak/STAT activation. *Clin Invest*, 2014, 124(4): 1568-1581.
- 成志勇, 李士辉, 杨 琳, 等. 干扰素 α 对 JAK2V617 阳性的骨髓增殖性疾病的影响. *实用肿瘤杂志*, 2008, 23(4): 318-321.
- JABLONSKA J, WU F, ANDZINSKI L, *et al.* CXCR2-mediated tumor-associated neutrophil recruitment is regulated by IFN-β. *Int J Cancer*, 2014, 136(6): 1346-1358.

(2015-11-02 收稿, 2016-03-08 修回)

编辑 汤 洁