

# Ruxolitinib 对人红白血病 HEL 细胞 VEGF、HIF-1 $\alpha$ 表达的影响\*

徐倩<sup>1,2</sup>, 刘贵敏<sup>1,3</sup>, 王凤云<sup>1</sup>, 张丽军<sup>1,3</sup>, 梁文同<sup>1</sup>, 成志勇<sup>1 $\Delta$</sup>

1. 保定市第一医院 血液内科(保定 071000); 2. 南京市红十字医院(南京 210001); 3. 承德医学院研究生院(承德 067000)

**【摘要】** 目的 探讨 JAK2 抑制剂 Ruxolitinib 对人红白血病 HEL 细胞血管内皮生长因子(VEGF)、缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )分泌的影响。方法 用不同浓度 Ruxolitinib(1、5、10、50、100、500 nmol/L)处理 HEL 细胞 24、48、72 h,通过 CCK-8 法观察其对 HEL 细胞增殖的抑制作用;不同浓度 Ruxolitinib 处理细胞 24、48、72 h,RT-PCR 检测 *JAK2* 基因(*JAK2*) mRNA 水平,Western blot 检测 p-JAK2、VEGF、HIF-1 $\alpha$  蛋白表达;鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)体内血管生长实验检测 Ruxolitinib 对血管生成的影响。结果 不同浓度 Ruxolitinib(除外 1 nmol/L 作用 24 h)均可抑制 HEL 细胞增殖。不同浓度 Ruxolitinib 处理 HEL 细胞 24、48、72 h 后,RT-PCR 结果显示 *JAK2* mRNA 表达较对照组降低( $P < 0.01$ );Western blot 结果显示 p-JAK2、VEGF、HIF-1 $\alpha$  蛋白表达较对照组亦均降低( $P < 0.05$ );CAM 实验结果显示 Ruxolitinib 处理细胞 72 h 后血管数目明显减少。结论 Ruxolitinib 可能通过抑制 JAK2 通路,抑制 HEL 细胞 VEGF、HIF-1 $\alpha$  表达进而抑制血管新生。

**【关键词】** 骨髓增殖性肿瘤 Ruxolitinib 血管新生 VEGF HIF-1 $\alpha$

**The Effect of Ruxolitinib on the Expression of VEGF and HIF-1 $\alpha$  in Leukemia HEL Cells** XU Qian<sup>1,2</sup>, LIU Guimin<sup>1,3</sup>, WANG Feng-yun<sup>1</sup>, ZHANG Li-jun<sup>1,3</sup>, LIANG Wen-tong<sup>1</sup>, CHENG Zhi-yong<sup>1 $\Delta$</sup> . 1. Department of Hematology, the No.1 Hospital of Baoding, Baoding 071000, China; 2. Nanjing Red Cross Hospital, Nanjing 210001, China; 3. Postgraduate Research Institute, Chengde Medical College, Chengde 067000, China

$\Delta$  Corresponding author, E-mail: dzczy@sohu.com

**【Abstract】** **Objective** To investigate the effect of Ruxolitinib on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and hypoxia inducible factor-1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ) in HEL cells. **Methods** The HEL cells were treated with Ruxolitinib in different concentrations (1 nmol/L, 5 nmol/L, 10 nmol/L, 50 nmol/L, 100 nmol/L, 500 nmol/L). The growth inhibition of Ruxolitinib on HEL cells was detected by CCK-8 assay; the mRNA expression level of *JAK2* were measured by RT-PCR and the protein level of p-JAK2, VEGF, HIF-1 $\alpha$  were observed by Western blot after treated with Ruxolitinib for 24, 48, 72 h. Chick chorioallantoic membrane (CAM) test was used to testify the effect of Ruxolitinib on angiogenesis. **Results** Ruxolitinib with different concentrations could inhibit HEL cells proliferation. RT-PCR showed that the mRNA level of *JAK2* decreased in a concentration-dependent manner and Western blot demonstrated that the expression levels of p-JAK2, VEGF and HIF-1 $\alpha$  were lower in Ruxolitinib treatment groups than those in control group ( $P < 0.05$ ) after HEL cells were treated with different concentrations of Ruxolitinib for 24, 48, 72 h. Ruxolitinib significantly suppressed blood vessels' formation in CAM. **Conclusion** Ruxolitinib can inhibit VEGF, HIF-1 $\alpha$  expression and angiogenesis of HEL leukemia cells by inhibiting JAK2 pathway.

**【Key words】** Myeloproliferative neoplasms Ruxolitinib Angiogenesis VEGF HIF-1 $\alpha$

血管生成是指新生血管从预先存在的血管网发展的一个严格调节的过程。在实体肿瘤中,血管生成是肿瘤生长、进展和转移的至关重要的因素。有证据表明,在血液系统恶性肿瘤如白血病、多发性骨髓瘤、淋巴瘤、骨髓增殖性肿瘤等与实体瘤相似的肿

瘤中具有高骨髓微血管密度(MVD),考虑血管生成在血液系统恶性肿瘤的发展中起重要作用<sup>[1]</sup>。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是促肿瘤血管新生的重要因子,因其可增强血管内皮细胞有丝分裂活性而得名,通过其受体 VEGFR 与相应刺激信号结合,能够刺激有丝分裂活性和内皮细胞增殖,增加血管通透性,并诱导血管扩张及产生促血管活性因子参与新生血管的形成及肿瘤转移<sup>[2]</sup>。缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia inducible

\* 河北省重点研发计划(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

$\Delta$  通信作者, E-mail: dzczy@sohu.com

factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )是存在于肿瘤中的缺氧应答调控因子,在维持细胞能量代谢、肿瘤血管生成及转移中发挥重要作用。国外研究报道,在 JAK2V617F 骨髓增殖性肿瘤(myeloproliferative neoplasms, MPNs)患者中 MVD 明显高于正常人,同时 VEGF、HIF-1 $\alpha$  存在高表达,提出 Jauns 激酶 2 (JAK2)突变可能与 VEGF、HIF-1 $\alpha$  表达存在重要关系。Ruxolitinib(鲁索替尼)是 2011 年被美国食品和药物管理局批准的用于治疗中、高风险骨髓纤维化的选择性 JAK1/2 抑制剂<sup>[3]</sup>,但其对肿瘤血管新生因子 VEGF、HIF-1 $\alpha$  分泌的影响未见报道。本研究通过 Ruxolitinib 作用于 JAK2V617F 阳性人红白血病 HEL 细胞,观察 Ruxolitinib 对 HEL 细胞增殖能力及对 VEGF、HIF-1 $\alpha$  蛋白表达的变化,同时通过体内血管生长实验观察 Ruxolitinib 对血管生成的影响,为抗血管新生治疗骨髓增殖性肿瘤提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂

RPMI1640(GIBICO 公司)、胎牛血清(杭州四季青公司)、Ruxolitinib(瑞士诺华)、CCK-8(日本同仁)、引物(北京赛百胜)、Vazyme Hiscript 合成试剂盒(石家庄惠友生物科技有限公司)、抗体(Santa Cruz 公司)。

### 1.2 细胞系及细胞培养

人红白血病 HEL 细胞为 JAK2V617F 阳性、具有 JAK-STAT 信号通路的活化的人红白血病细胞系,购自上海科学院细胞库。HEL 细胞于 37 °C、体积分数为 5%的 CO<sub>2</sub> 孵育箱中培养。细胞培养液为加入 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液。根据细胞生长状况,2~3 d 换液 1 次,取对数生长期细胞进行实验。

### 1.3 CCK-8 测细胞增殖抑制率

收集对数生长期细胞,加入细胞悬液 100  $\mu$ L 到 96 孔板(边缘孔用无菌水或 PBS 填充)。设置对照组及实验组,对照组加 100  $\mu$ L 细胞悬液不加 Ruxolitinib,实验组加 100  $\mu$ L 细胞悬液和不同浓度 Ruxolitinib(1、5、10、50、100、500 nmol/L),每组设 5 个平行孔。分别于 0、24、48、72 h 后加入 CCK-8 溶液 10  $\mu$ L,待 2~4 h 后酶标仪测定吸光度值(A<sub>450</sub>),绘制生长曲线,依据公式计算细胞增殖抑制率:细胞增殖抑制率(%)=(对照组 A<sub>450</sub>值-实验组 A<sub>450</sub>值)/对照组 A<sub>450</sub>值 $\times$ 100%。

### 1.4 RT-PCR 检测 JAK2 mRNA 表达

实验分组同 1.3。收集 0、24、48、72 h 对照组及实验组细胞,Trizol 提取各组细胞总 RNA,电泳鉴定 RNA 纯度及定量。根据 Vazyme Hiscript 合成试剂盒反转录合成 cDNA,逆转录反应体系 20  $\mu$ L,包括细胞 RNA 2  $\mu$ g,50 U/ $\mu$ L RNasin 0.5  $\mu$ L,50  $\mu$ g/mL 随机物 1  $\mu$ L,10 mol/L dNTP 2  $\mu$ L,5 $\times$  逆转录反应缓冲液 4  $\mu$ L,M-MLV 反转录酶 200 U,余用 DEPC 水补足至 20  $\mu$ L。在 37 °C 中反应 60 min,95 °C 反应 5 min 后终止反应。产物进行 PCR 扩增或分装稀释,放置于-20 °C,保存时间不超过 6 个月。JAK2 上游引物:5'-CAGCAAGT ATGATGAGCAAGCTTT-3',下游引物 5'-TGAA CCAGAATATTCTCGTCTCCAC-3'。内参基因  $\beta$ -actin 上游引物:5'-CTGGCACCACCTTCT ACA AT-3',下游引物 5'-AATGTCACGCACG ATTTCCCGC-3'。JAK2 扩增片段产物长度 101 bp, $\beta$ -actin 扩增片段长度 382 bp。取 cDNA 2  $\mu$ L 作为模板,建立 20  $\mu$ L 反应体系。反应条件:94 °C 变性 5 min,94 °C 变性 45 s,60 °C 退火 1 min,68 °C 延伸 45 s,40 个循环后 68 °C 延伸 6 min。扩增后的产物进行琼脂糖凝胶电泳,全自动凝胶成像仪下分析,应用分析软件,以目的基因和内参基因灰度值的比值作为目的基因的相对表达量。

### 1.5 Western blot 检测磷酸化 JAK2 (p-JAK2)、VEGF、HIF-1 $\alpha$ 蛋白水平

实验分组同 1.3。收集 0、24、48、72 h 各组细胞,提取蛋白,根据蛋白定量结果,分装蛋白,将分装好的蛋白置于沸水中煮沸变性 5 min,配电泳分离胶、浓缩胶,蛋白上样,电泳使蛋白分离,转移至 PVDF 膜上,配 5%脱脂奶粉,37 °C 烤箱中封闭 2 h,封一抗,4 °C 过夜,TTBS 洗膜 6 次,5 min/次,封二抗,37 °C 烤箱中 2 h,TTBS 洗 3 遍,TBS 洗 1 遍,化学发光液混合,应用 Alpha Innotech 系统对 PVDF 膜进行扫描及图像分析。扫描图像用灰度扫描软件进行灰度分析,取得蛋白条带灰度值,分别用 p-JAK2、VEGF 和 HIF-1 $\alpha$  蛋白条带灰度值与  $\beta$ -actin 蛋白条带灰度值的比值作为其相对灰度,以相对灰度进行统计分析。

### 1.6 鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)体内血管生长实验检测 Ruxolitinib 对血管生成的影响

取新鲜鸡胚,孵育至 7 日龄。鸡胚发育第 8 天,于壳上作好气室和胚体标记。用齿科砂轮挫出裂痕,轻轻去除蛋壳(外壳膜)及撕去内壳膜,暴露接种

部位。将事先制备的明胶海绵置于 CAM 中央血管稀少区,滴加 20  $\mu$ L 相应浓度 Ruxolitinib(1、5、50、100、500 nmol/L),透明胶带封窗后继续孵育 72 h。打开封口膜,观察结果。揭开透明胶带向开窗处蛋壳内加甲醇、丙酮混合液(体积比为 1 : 1)固定 15 min,待绒毛尿囊膜上血管凝固后,将膜剪下放于盛有水的平皿中展开,阴干后拍照,并在解剖显微镜下常规记录血管数。若在植入含药明胶海绵周围出现苍白的无血管区域,说明该药物具有抑制新生血管形成的作用,苍白无血管区的大小可以反映药物抑制新生血管形成的强弱,反之,若看不见苍白无血管区说明该药无抑制新生血管形成的作用。

### 1.7 统计学方法

两样本均数比较采用 *t* 检验,多组均数比较采用方差分析,组间两两比较选用 *q* 检验,两变量的相关程度采用 Pearson 直线相关分析法, $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 Ruxolitinib 对 HEL 细胞增殖的影响

CCK-8 结果显示:不同浓度的 Ruxolitinib(1、5、10、50、100、500 nmol/L)作用 HEL 细胞后,随着时间推移,细胞增殖抑制率逐渐升高,随着 Ruxolitinib 药物浓度增大,HEL 细胞增殖活性明显

附表 Ruxolitinib 作用 HEL 细胞 48 h 后 JAK2 mRNA、p-JAK2、VEGF 及 HIF-1 $\alpha$  蛋白的表达变化( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table The change of JAK2 mRNA, p-JAK2, VEGF and HIF-1 $\alpha$  protein expression levels in HEL cells after being treated with Ruxolitinib for 48 h ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Group	JAK2 mRNA	Protein expression		
		p-JAK2	VEGF	HIF-1 $\alpha$
Control	0.97 $\pm$ 0.07	1.23 $\pm$ 0.11	2.35 $\pm$ 0.20	1.05 $\pm$ 0.09
Ruxolitinib				
1 nmol/L	0.89 $\pm$ 0.06	1.11 $\pm$ 0.08	2.29 $\pm$ 0.19	0.91 $\pm$ 0.07
5 nmol/L	0.75 $\pm$ 0.06*#	0.93 $\pm$ 0.07*	2.14 $\pm$ 0.18	0.83 $\pm$ 0.05*
10 nmol/L	0.61 $\pm$ 0.04*#	0.88 $\pm$ 0.05*#	1.37 $\pm$ 0.11*#	0.76 $\pm$ 0.04*#
50 nmol/L	0.42 $\pm$ 0.03*#	0.76 $\pm$ 0.04*#	0.87 $\pm$ 0.06*#	0.66 $\pm$ 0.03*#
100 nmol/L	0.28 $\pm$ 0.02*#	0.39 $\pm$ 0.03*#	0.71 $\pm$ 0.04*#	0.32 $\pm$ 0.02*#
500 nmol/L	0.11 $\pm$ 0.01*#	0.11 $\pm$ 0.01*#	0.17 $\pm$ 0.01*#	0.20 $\pm$ 0.01*#

\*  $P<0.01$ , vs. control group; #  $P<0.05$ , vs. former concentration group

### 2.3 Ruxolitinib 对 HEL 细胞 p-JAK2、VEGF、HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达的影响

随着孵育时间的延长,不同浓度 Ruxolitinib 作用 HEL 细胞后 p-JAK2、VEGF 及 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达水平均明显下降。以孵育 48 h 为例,与对照组相比,随着加入 Ruxolitinib 浓度的增加,HEL 细胞 p-JAK2 蛋白表达呈逐渐减低的趋势,VEGF 和 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达亦逐渐下降。见附表、图 2。相关性分析显示 VEGF 与 p-JAK2 二者呈正相关性( $r=0.991, P<0.01$ );HIF-1 $\alpha$  与 p-JAK2 亦呈正相关性( $r=0.993, P<0.01$ )。

下降。见图 1。

### 2.2 Ruxolitinib 对 HEL 细胞 JAK2 mRNA 表达的影响

见附表。随着孵育时间的延长,不同浓度 Ruxolitinib 作用 HEL 细胞后 JAK2 mRNA 表达水平明显下降。以孵育 48 h 为例,实验组 JAK2 mRNA 表达较对照组降低( $P<0.01$ ),并随着药物浓度的增加呈逐渐减低趋势。

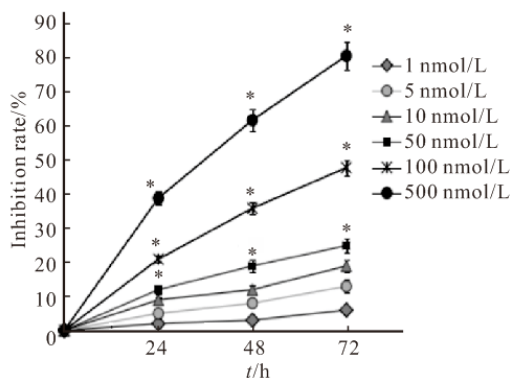


图 1 不同浓度 Ruxolitinib 作用不同时间后 HEL 细胞的增殖抑制率

Fig 1 The proliferation inhibition rate of HEL cells after being treated with Ruxolitinib of different concentrations and for different hours

\*  $P<0.01$ , vs. 0 h

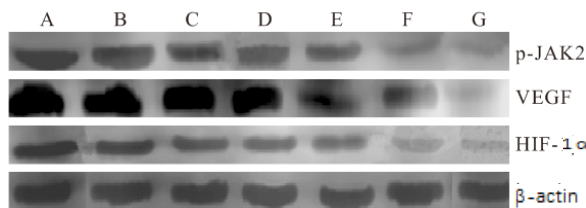


图 2 Ruxolitinib 作用 HEL 细胞 48 h 后 p-JAK2、VEGF 及 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达的变化

Fig 2 The p-JAK2, VEGF and HIF-1 $\alpha$  protein expression levels in HEL cells after being treated with Ruxolitinib for 48 h

A: Control group; B: 1 nmol/L Ruxolitinib; C: 5 nmol/L Ruxolitinib; D: 10 nmol/L Ruxolitinib; E: 50 nmol/L Ruxolitinib; F: 100 nmol/L Ruxolitinib; G: 500 nmol/L Ruxolitinib

## 2.4 Ruxolitinib 对血管生成的影响

见图 3。结果显示,对照组鸡胚尿囊膜血管生长良好,呈树枝状,分支适中,Ruxolitinib 药物组出现比较明显的血管稀疏区及苍白的无血管区,血管

数目明显减少。对照组,Ruxolitinib 1、5、50、100、500 nmol/L 浓度组血管生成数分别为:  $91.5 \pm 3.59$ 、 $87.4 \pm 4.71$ 、 $70.3 \pm 2.79$ 、 $43.2 \pm 1.78$ 、 $29.4 \pm 1.02$ 、 $13.1 \pm 0.45$ ,随着药物浓度的增加,血管数目

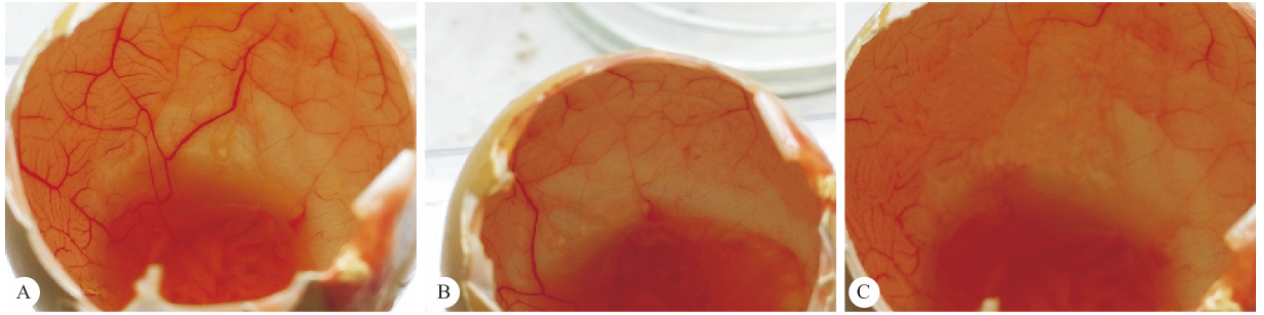


图 3 Ruxolitinib 对 CAM 中血管生成的影响

Fig 3 Effect of Ruxolitinib on blood vessel formation in CAM

A: Control group; B: 50 nmol/L Ruxolitinib; C: 100 nmol/L Ruxolitinib

逐渐减少( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

JAK-STAT 传导通路在细胞生长、分化、免疫功能和造血中发挥重要生理、病理作用。目前,越来越多的研究报道 JAK2-STAT5 在多种组织及细胞系中异常表达和活化,并与肿瘤的增殖、分化、凋亡、血管新生及肿瘤侵袭有密切关系。

MPNs 患者大多存在 JAK2V617F 突变,此突变作为一种组成性激活酪氨酸激酶,在缺乏细胞因子的情况下自发性激活 JAK2-STAT5 信号通路<sup>[4-5]</sup>。HEL 细胞是 JAK2V617F 突变阳性人红白血病细胞,具有 JAK2-STAT5 信号通路活化。OKU 等<sup>[6]</sup>通过干扰 RNA 阻断 JAK2-STAT5,发现 JAK2V617F 突变的 MPNs 细胞增殖明显受到抑制,认为 JAK2V617F 具有促进细胞增殖及抑制凋亡作用,从而介导了 MPNs 的发病。考虑可能的机制为 JAK2V617F 自发性激活下游的 JAK2-STAT5、Ras/MEK/ERK 和 PI3K/Akt 等通路,导致参与细胞增殖、细胞凋亡的基因如 *Bcl-2*、*Mcl-1*、*cyclinD1/D2* 和 *c-myc* 等表达上调,引起细胞增殖及凋亡抑制<sup>[7]</sup>。

Ruxolitinib 是选择性 JAK1/JAK2 激酶抑制剂,现已应用于临床,口服单剂量为每日 5~200 mg,能够被迅速吸收,在 1~2 h 内达到最大血药浓度<sup>[8]</sup>。其通过抑制 JAK/STAT 的磷酸化而发挥作用。在 JAK2V617F 突变阳性的 MPNs 动物模型中,Ruxolitinib 可明显逆转脾肿大,减少循环中

炎症细胞因子的水平,优先消除肿瘤细胞,显著延长生存期而未抑制骨髓及免疫功能<sup>[9-10]</sup>。一项在欧洲九国进行的开放、随机化 COMFORT-II 期研究<sup>[11]</sup>,结果显示 Ruxolitinib 在治疗 48 周后,28.5% 患者脾脏体积至少缩小至原体积的 35%。QUINTÁS-CARDAMA 等<sup>[12]</sup>研究显示,不同浓度 Ruxolitinib 作用 JAK2V617F 阳性 Ba/F<sub>3</sub> 细胞后,细胞增殖明显受到抑制。本研究亦显示 Ruxolitinib 作用于人 JAK2V617F 阳性红白血病 HEL 细胞后,细胞增殖受到明显抑制,抑制率呈时间、剂量依赖性增加。与既往研究相符。

研究表明血管新生在血液系统肿瘤如白血病、多发性骨髓瘤、淋巴瘤中发挥重要作用,血管新生的程度目前已成为预测肿瘤患者的预后指标。血管新生的机制表现在促血管生成因子的活性上调和/或血管生成抑制因子的活性下调。有证据表明,VEGF 相关的通路是新血管生成和招募内皮祖细胞最为相关的调节器。VEGF 是目前认为促进血管新生最重要的因子,其表达受内在和外在因素的调控,其中组织缺氧是 VEGF 重要的刺激因素,HIF-1 $\alpha$  可通过与 VEGF mRNA 结合诱导 VEGF 表达,目前已发现肿瘤内缺氧和 HIF-1 $\alpha$  是触发血管新生的关键因素。通常情况下,血管生成由内源性抗血管生成及促血管生成因子的平衡保持,在 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 受到异常刺激时,VEGF 及其受体可通过自分泌或旁分泌途径刺激内皮细胞增殖促进血管新生及肿瘤转移<sup>[13]</sup>。

有研究显示:在初治急性髓细胞性白血病

(AML)患者骨髓中,其 MVD 是正常人骨髓的 2 倍,经治疗缓解后患者 MVD 较之前明显下降<sup>[14]</sup>。PANTELI 等<sup>[15]</sup>和 BOVERI 等<sup>[16]</sup>研究报道 MPNs 患者骨髓中 MVD 明显高于正常人,同时存在 VEGF 及其受体 VEGFR 高表达, MVD 随着 VEGF 表达增加逐渐增大<sup>[16]</sup>,并提出可能与 JAK2V617F 突变负荷密切相关<sup>[17]</sup>。本研究结果表明,HEL 细胞中高表达 p-JAK2,同时存在促血管新生因子 VEGF、HIF-1 $\alpha$  表达的增加。在应用 JAK2 抑制剂 Ruxolitinib 后, JAK2 mRNA 水平及 p-JAK2 蛋白表达明显减低,呈剂量依赖性,随着 JAK2 表达的降低 VEGF、HIF-1 $\alpha$  蛋白表达水平亦明显下降,与 JAK2 表达呈正相关。表明抑制 JAK2 突变可抑制 HEL 细胞分泌 VEGF、HIF-1 $\alpha$ , 下调 VEGF、HIF-1 $\alpha$  蛋白表达水平。Ruxolitinib 作用于鸡胚尿囊膜后显示该药物可明显抑制鸡胚尿囊膜血管的生长,表明 Ruxolitinib 可抑制血管新生。考虑其作用机制可能为 Ruxolitinib 通过抑制 JAK2 磷酸化,进一步导致 STAT 活化受抑,干扰下游靶基因与 VEGF、HIF-1 $\alpha$  启动基因结合,下调 VEGF、HIF-1 $\alpha$  蛋白表达,从而引起二者参与的血管生成受到抑制。

综上所述,Ruxolitinib 可通过抑制 HEL 细胞 JAK2 通路,抑制细胞 VEGF、HIF-1 $\alpha$  蛋白表达进而抑制其促血管新生。因此 Ruxolitinib 可通过抑制 JAK2 通路为抗血管新生治疗 MPNs 提供新方法。

### 参 考 文 献

- [1] 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(9): 1019-1022.
- [2] CONSTANTINESCU SN, GIRARDOT M, PECQUET C. Mining for JAK-STAT mutations in cancer. Trends Biochem Sci, 2008, 33(3): 122-131.
- [3] CHASE A, BRYANT C, SCORE J, *et al.* Ruxolitinib as potential targeted therapy for patients with JAK2 rearrangements. Haematologica, 2013, 98(3): 404-408.
- [4] 郭慧梅, 潘 峻, 贺建辉, 等. 骨髓增殖性肿瘤患者血栓栓塞的相关因素. 肿瘤防治研究, 2013, 40(10): 958-960.
- [5] 成志勇, 李士辉, 杨 琳, 等. 干扰素  $\alpha$  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.
- [6] OKU S, TAKENAKA K, KURIYAMA T. JAK2 V617F uses distinct signalling pathways to induce cell proliferation and neutrophil activation. Br J Haematol, 2010, 150(3): 334-344.
- [7] RUBERT J, QIAN Z, ANDRAOS R, *et al.* Bim and Mcl-1 exert key roles in regulating JAK2V617F cell survival. BMC Cancer, 2011(11): 24. doi: 10.1186/1471-2407-11-24.
- [8] SHI JG, CHEN X, MCGEE RF, *et al.* The pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of orally dosed INCB018424 phosphate in healthy volunteers. J Clin Pharmacol, 2011, 51(12): 1644-1654.
- [9] VANNUCCHI AM, KILADJIAN JJ, GRIESSHAMMER M, *et al.* Ruxolitinib versus standard therapy for the treatment of polycythemia vera. N Engl J Med, 2015, 372(5): 426-435.
- [10] ORITANI K, OKAMOTO S, TAUCHI T, *et al.* A multinational, open-label, phase 2 study ruxolitinib in Asian patients with myelofibrosis; Japanese subset analysis. Int J Hematol, 2015, 101(3): 295-304.
- [11] HARRISON C, KILADJIAN JJ, AL-ALI HK, *et al.* JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis. N Engl J Med, 2012, 366(9): 787-798.
- [12] QUINTÁS-CARDAMA A, VADDI K, LIU P, *et al.* Preclinical characterization of the selective JAK1/2 inhibitor or INCB018424; therapeutic implications for the treatment of myeloproliferative neoplasms. Blood, 2010, 115(15): 3109-3117.
- [13] SONG G, LI Y, JIANG G. Role of VEGF/VEGFR in the pathogenesis of leukemias and as treatment targets. Oncol Rep, 2012, 28(6): 1935-1944.
- [14] 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.
- [15] PANTELI K, ZAGORIANAKOU N, BAI M, *et al.* Angiogenesis in chronic myeloproliferative diseases detected by CD34 expression. Eur J Haematol, 2004, 72(6): 410-415.
- [16] 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, 2009, 140(2): 162-168.
- [17] MEDINGER M, SKODA R, GRATWOL A, *et al.* Angiogenesis and vascular endothelial growth factor/receptor expression in myeloproliferative neoplasms; correlation with clinical parameters and JAK2-V617F mutational status. Br J Haematol, 2009, 146(2): 150-157.

(2015-10-26 收稿, 2016-06-16 修回)

编辑 余琳