

· 综 述 ·

机械通气相关性肺损伤及发病机制

赵银洁 综述,葛衡江 审校

(第三军医大学大坪医院麻醉科,重庆 400042)

关键词:机械通气;肺损伤;促炎介质;肺功能保护

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.30.044

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)30-3697-04

近几十年来,机械通气(mechanical ventilation, MV)作为维护生命的呼吸支持技术在临床治疗中运用日趋广泛。但 MV 所致的肺损伤(ventilator-induced lung injury, VILI)也受到了国内外专家学者们的关注。研究 VILI 及其发病机制以用于临床中如何防止和减轻其在治疗过程中带来的危害已成为当前的热点之一。

1 VILI 的类型及概念

1.1 气压伤(barotrauma) 早期有学者认识到,当机械通气压力过高时,可由于高气道压力导致肺泡破裂、气体溢出,形成气胸、纵膈气肿、气体栓塞、弥漫性肺水肿等严重并发症,并称之为气压伤。肺泡上皮在机械力的作用下其连续性受到破坏,肺泡内气体溢出进入肺间质,脏层胸膜破裂可形成气胸;同时,肺泡毛细血管屏障过度牵拉,细胞间隙增大,毛细血管通透性增加,小分子物质漏出,形成肺水肿。70 年代初,Webb 等^[1]通过动物实验发现当通气压力 PIP 达 45 cm H₂O 时,大鼠发生气胸、肺水肿的程度较 PIP 为 30 cm H₂O 是严重,且发生的速度较快,约 13~35 min 即可发生。90 年代初,Parker 等^[2]通过对狗开胸后行 PIP 分别为 64 cm H₂O 水平和 19 cm H₂O 水平通气,发现通气 30 min 后前者的肺泡毛细血管静水压比后者高出 12.5 cm H₂O,导致了肺水肿。这些研究表明机械通气时当 PIP 水平升高到一定程度发生肺损伤。近年中国学者李乃娥等^[3]通过将 68 例无气胸发生和 9 例发生气压伤的急性呼吸窘迫综合征(ARDS)患者就通气模式、潮气量、吸气峰压、平台压、呼吸末正压等指标进行回顾性分析,发现 9 例气压伤患者中有 6 例机械通气的平台压大于 35 cm H₂O,另外 3 例有胸部外伤,因此认为平台压过高是机械通气致气压伤的关键因素。呼吸道峰压(peak inflation pressure, PIP)是克服气道阻力和胸肺弹性阻力之和,而平台压(Pplat)则单纯表示在吸气末肺泡所承受的夸肺压力,更直接的反映了机械通气时肺泡所承受的压力,所以认为平台压是 MV 过程中的一项重要监测指标。

1.2 容量伤(volutrauma) 所谓容量伤是指在吸气末肺容积过大,肺泡过度扩张引起的肺泡损伤。在 80 年代末期,Dreyfuss 等^[4]通过对大鼠进行不同的通气方式试验,发现高压大潮气量组和低压大潮气量组均发生肺水肿,而通过包裹大鼠胸肺部实现高压小潮气量组并无肺水肿发生。由此说明了 MV 过程中单纯高气道压不是导致肺损伤的惟一决定性因素,VILI 的发病与潮气量过大吸气末肺泡容积过大有密切关系。姜威等^[5]通过对大鼠进行不同容量的机械通气,发现常规潮气量通气(10 mL/kg)组和自然呼吸组的大鼠肺组织在光镜下的病理学检查无明显差异,而潮气量为 20 mL/kg 通气组的大鼠肺组织在光镜下可见肺间质水肿及炎症细胞浸润,潮气量为 40 mL/kg 通气组的大鼠肺组织损伤不仅肉眼可见,光镜下改变

有肺泡破裂、融合、小血管断裂、肺泡出血等。李克忠等^[6]通过对大鼠进行小潮气量通气、大潮气量通气、自然呼吸相比较,结果发现大潮气量组肺组织的病理评分、肺泡灌洗液中白细胞(WBC)升高,TLR-4 mRNA 及 TLR-4 蛋白表达均较自然呼吸组和小潮气量组高。Keszler 等^[7]也通过实验阐述了致肺损伤的主要因素包括肺泡容积过大而非仅是高气道压力。事实上,在肺的机械通气过程中,潮气量与气道压之间就存在着相互影响、相互联系的关系,要使两者的作用截然分开几乎是不可能的。因此多数学者常把气压伤、容积伤相提并论。

1.3 不张伤(atelectrauma) 因肺不张或萎陷的肺泡随机械通气吸气和呼气周期性开放、闭合,与周围正常的肺泡或肺间质产生的高剪切力的作用而致肺损伤,又称切变力损伤。该损伤尤其在 ARDS 的患者机械通气时表现突出。ARDS 患者肺泡表面活性物质减少,存在广泛的肺泡萎陷与不张,其肺部病变特点为具有重力依赖性,大体分为高位正常肺区、低位实变肺区、中间陷闭肺区,不但导致肺的容量大大减小,而且还导致肺泡在机械通气时不均匀地膨胀极易增加剪切力对肺的损害作用。Lorenzo 等^[8]认为,肺泡的不稳定性是呼吸机相关性肺损伤的主要发病机制之一。有大量的动物实验和 ARDS 的临床治疗研究证明,在 MV 过程中,若使用适当的呼气末正压(positive end-expiratory pressure, PEEP)技术,保证肺泡在呼吸周期中为开放状态,可减轻机械力对肺泡的牵拉,减轻肺损伤。PEEP 即呼气末呼吸道压力大于大气压,其可增加肺的功能残气量 FRC,改善通气/血流比值,增加肺的顺应性,适度的 PEEP 可打开肺泡,避免肺泡的周期性开放与闭合时反复牵拉产生剪切力对肺的损害作用,但是若 PEEP 水平过高,可增加 PIP、肺容积,从而加重肺损伤。由于 ARDS 患者肺部病变的特殊性,如何在机械通气时实现其肺部各区肺泡压力变化的均匀与肺泡的稳定是减少该类患者 VILI 的关键所在,也是目前重症医学面临的棘手问题。

1.4 生物伤(biotrauma) 因气道压过高、肺泡容积过大、萎陷肺泡周期性的开放和闭合导致的肺泡破裂、漏气,肺泡-毛细血管屏障受损、通透性增加等均是损伤性通气所致的一种机械的、直观的物理性肺损害,明确了这些机械因素在 VILI 发病中的重要作用后,许多专家学者进行了更深入的研究发现:气压伤、容积伤、不张伤最终均并发了肺的生物性损害,即肺组织内有细胞因子和炎症介质的参与及炎症细胞的募集,可诱发或加重肺部的炎症反应。国内外均已有的试验证明损伤性机械通气后肺泡灌洗液中的促炎介质主要包括肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1(IL-1)、IL-6、IL-8、IL-22 以及巨噬细胞炎性蛋白-2(MIP-2)等^[9]。吴华等^[10]通过对兔进行机械通气性肺损伤试验发现 TNF- α 、IL-1 β 、NF- κ B p65 在 VILI 发病中有重

要作用,不但在损伤早期就有表达,且在时间上还有一定的变化规律,并可以为损伤时间的推断提供参考。王月兰等^[11]通过对大鼠进行试验,将大鼠分为自然呼吸组、正常通气组、过度通气组,并用丝裂原蛋白激酶(MAPK)抑制剂对 3 组大鼠进行预处理,再测定通气 4 h 后大鼠肺组织、肺泡灌洗液中及血浆中 TNF- α 、MIP-2 的浓度,结果正常通气组和过度机械通气组 TNF- α 、MIP-2 的浓度均比自然呼吸组高,但以过度通气组为甚,两组均又激活 MAPK 信号传导通路,该传导通路为细胞反应的重要信号系统,存在于多种生物细胞内,可被放射线、渗透压、机械力、病毒等因素激活,调控细胞的生长代谢、分化、迁移和炎症反应。

2 VILI 发生的相关因素

虽已明确机械因素致肺组织的物理性损害作用,但 VILI 发生的确切病理及机制目前还不十分清楚,通过收集现有的文献及实验资料整理分析主要有如下几方面因素:

2.1 机械牵张机制

肺组织细胞在感受到外来异常机械力刺激后,可通过细胞膜及受体激活细胞内信号系统产生系列的生化反应^[12]。Featherstone 等^[13]通过机械牵张胎鼠的肺细胞,发现张力敏感性阳离子通道激活并诱导了快速的 Ca^{2+} 内流致细胞内发生信号传导。Copland 等^[14]采用体外系统研究胎儿肺上皮细胞,发现早期 p44/42 丝裂原活化蛋白激酶可短暂促进早期生长反应基因和 IL-6 的表达,而 NF- κ B 导致热休克蛋白 70 和 MIP-2 的表达呈持续递增,若抑制钙内流或使用 Ras 蛋白可消除上述现象,因此认为肺上皮细胞机械传导的关键是钙内流。大量实验研究还表明肺泡上皮细胞、血管内皮细胞、肺泡巨噬细胞在受到机械牵张后,产生了 TNF- α 、IL-1、IL-8 等细胞因子和炎症介质。Okada 等^[15]进行牵拉血管内皮实验,发现可明显增加 IL-8 和单核细胞趋化激活因子(MCAF)、MIP-1 的生成水平。丁宁等^[16]发现机械牵张可诱导肺泡巨噬细胞释放许多细胞因子,且牵张诱导 MIP-2 的上调呈强度和时间的依赖性。近年,研究证明机体产生大量炎症细胞因子与 Toll 样受体(toll like receptor, TLR)信号通路激活密切相关^[12-13]。TLR 是模式识别受体,除了主要表达于各类免疫细胞以外,还表达于肾脏、心肌细胞、微血管内皮细胞等,其与内源性配体(细胞释放或产生的蛋白质、核苷酸、透明质酸、细胞外基质分解产物)、外源性配体(病原微生物)结合后,通过 NF- κ B 和 MAP 激酶相关信号途径,促进炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-8 等的基因的转录。机械通气引起的肺损伤,受损组织通过释放内源性激活物激活了 TLR 受体家族而启动了炎症的级联反应^[17-18]。

2.2 氧化与抗氧化能力失衡

机械通气过程中,还伴随着机体的氧化-抗氧化能力的失衡。Chess 等^[19]研究报道,长时间的机械通气会加重肺上皮细胞、内皮细胞、血管平滑肌细胞的氧化应激反应,导致氧化-抗氧化能力失衡,使肺组织受到氧自由基的损害,而且大潮气量机械通气时肺组织的氧化应激反应更加严重。刘庆辉等^[20]通过对大鼠进行试验,发现高氧合并常规机械通气与空气合并常规机械通气 4 h 相比仅有丙二醛(MDA)水平的增高和超氧化物歧化酶(SOD)活性的下降,其余指标无明显差异,而高氧合并大潮气量通气与空气合并大潮气量通气相比,通气 2 h 后氧和指数开始下降,但以前者为甚,肺泡灌洗液中中性粒细胞计数、TNF- α 、IL-1 β 、MIP-2 浓度升高更显著,由此提示高浓度氧能明显增加大潮气量通气时所造成的肺损伤。胡乃浩等^[21]通过实验发现机械通气致大鼠肺组织损伤后与自然呼吸组相比,不但肺泡灌洗液中白细胞计数、TNF-

α 和蛋白总量明显增加,而且大鼠的肺组织和血液中的 MDA 浓度上升而 SOD 浓度下降,MDA 是反应脂质过氧化程度的客观指标,而 SOD 间接反映机体清除氧自由基的能力,由此说明机械通气致肺损伤时,肺组织有强烈的氧化应激反应且同时伴随机体抗氧化能力下降。

2.3 肺泡表面活性物质受损

另外,不适当的通气还可直接或间接的影响肺泡表面活性物质(PS)的功能从而来加重肺损害。大潮气量或高剪切力可使肺泡表面伸缩幅度过大,导致磷脂膜断裂,从而使 PS 由有活性的大聚体转化为无活性的小聚体;同时机械通气还可将肺泡表面活性物质挤压出肺泡腔;且在损伤性通气以后,肺泡毛细血管若通透性增加,渗入肺泡腔的红细胞(RBC)碎片、血浆蛋白、AM 活化后释放的磷脂酶等产物均可破坏 PS 并使之失活。PS 具有许多生理功能和生物活性,如降低肺泡表面张力、防止肺泡萎陷、舒张平滑肌解除小气道痉挛、清除氧自由基等。所以若 PS 受到破坏,必加重对肺功能的损害。因而认为机械通气时导致的肺损伤,PS 遭到破坏也是其发病机制之一。

3 肺功能保护

3.1 合理进行机械通气

为避免大潮气量通气所致的肺损伤,近年来强调小潮气量通气,此通气方式对其适宜的患者有保护治疗作用,但运用不当同样也会增加机械通气肺损伤的发病。专家提出接近正常自然呼吸的负压通气可能会因为减少异常机械牵张对肺组织细胞的刺激而优于正压通气,但目前该通气方式尚未成熟,现就临床上如何正确选取正压控制通气模式进行机械通气进行介绍。

机械通气是否合理应该根据不同肺的容积状态来确定,并且通气要符合呼吸力学特点,反应该力学特点的就是压力-容积曲线即 P-V 环。P-V 环上的基点表示呼气末肺的功能残气量(FRC),正常情况下肺随着吸气的开始肺泡容积随着压力呈线形陡直上升,P-V 环上从基点开始形成陡直段,该段反映了潮气量大小,在陡直段的顶点,又称为高位拐点,反应吸气末跨肺泡的平均压力即平台压(Plat),在吸气末若肺容积达肺总量时该压力在 35~40 cm H₂O,因此机械通气时 Plat 不宜超过此压力。若患者因某些疾病如肺纤维化、重症肺炎、ARDS 等致部分肺泡萎陷,肺容积减小,在吸气的开始随着压力增加到一定水平肺泡逐渐打开后才出现纵坐标上肺容积的增加,此时 P-V 环上形成了由基点开始的低位平坦段和低位拐点,该点是低容量肺控制通气时选择适宜 PEEP 压力设定的参照点。低容量肺的 P-V 环的陡直段缩短,则提示适宜潮气量减小,在机械通气过程中若忽视该段的变化容易导致 VILI,因此机械通气应根据呼吸力学特点进行动态调节管理。若患者合并有慢阻肺或支气管哮喘等疾患时,其肺 FRC 增大,呼气末肺组织过度充气肺容积增加,出现内源性 PEEP,其 P-V 环上表现为基点上移,陡直段也缩短,肺组织可耐受的潮气量减小,机械通气时应警惕患者是否有内源性 PEEP 形成。

近年研究认为,采取小潮气量联合适当呼气末正压通气可改善 ALI/ARDS 的预后^[22],此法减少了小潮气量通气时肺泡反复开关闭合导致肺的切变力伤,但可导致体内 PaCO₂ 的升高,由于机体对 PaCO₂ 升高有一定的容许性,因此提出了允许性高碳酸血症(PHC)通气。实施 PHC 通气要求潮气量 6~8 mL/kg,呼吸频率 10~15 bpm,吸呼比 1:2,吸入氧浓度小于 60%,Pplat < 25 cm H₂O,PIP < 35 cm H₂O,PH > 7.2,最适 PEEP 通气。PHC 可扩张脑血管,对短暂脑缺血/再灌注有保护作用,但可升高颅内压,轻到中度的 PHC(PaCO₂ 60~100

mm Hg)可导致冠脉扩张而有心肌保护的作用,但 CO₂ 具有负性肌力作用,因此凡是有颅内压升高倾向或心血管功能不全的患者应禁用该通气方式^[23]。而 Onuma 等通过临床观察比较证明小潮气量通气并未减少重症患者的 ICU 观察时间和总住院日^[24]。

关于使用含全氟碳的液体通气、气管内吹气、俯卧位通气、高频通气等辅助通气方式,这些措施对于改善肺的氧合有一定的作用,但缺乏前瞻性的研究。

3.2 其他肺功能保护措施 为预防和减轻 VILI,在机械通气过程中除了注意合理的机械通气以外,还可针对 VILI 的其他发病相关因素作相应的处理。如增加限制机械通气时的氧浓度以减少氧自由基的产生;积极的抗休克治疗;使用抗炎药物调控机体的免疫反应;在机械通气前吸入 IL-22^[25] 或早期使用外源性 PS 可预防 VILI,国外学者 Stato 等^[26] 有报道,最近国内学者刘翠青等^[27] 观察 PS 在机械通气治疗新生儿 ARDS 中的作用发现其能较快地改善患儿的肺的氧合;术后积极采用硬膜外镇痛,尤其是在上腹部手术和胸部手术可减轻疼痛而促进患者咳嗽排痰,有效的预防术后肺部并发症。

综上所述,机械通气致肺损伤除了有物理因素致肺组织损伤外还包含了肺部促炎因子的释放、炎症细胞的参与导致肺的生物性损害,增加了临床治疗过程中的难度。目前虽对 VILI 进行了大量的研究,但其发病机制及预防性处理措施仍在不断的探索研究中,临床上至今未能完全解决通气治疗与肺损伤之间的矛盾。如何改善通气技术,提高危重患者的治愈率仍然是现阶段的重要任务。

参考文献:

- [1] Webb HH, Tierney DF. Experimental pulmonary edema due to intermittent positive pressure ventilation with high inflation pressures. Protection by positive end-expiratory pressure[J]. *Am Rev Respir Dis*, 1974, 110(5): 556-565.
- [2] Parker JC, Hernandez LA, Longenecker GL, et al. Lung edema caused by high peak inspiratory pressures in dogs. Role of increased microvascular filtration pressure and permeability[J]. *Am Rev Respir Dis*, 1990, 142(2): 321-328.
- [3] 李乃娥, 宁方玉. 机械通气治疗 ARDS 过程中气压伤发生的相关因素分析[J]. *山东医药*, 2006, 46(10): 40-41.
- [4] Dreyfuss D, Soler P, Basset G, et al. High inflation pressure pulmonary edema. Respective effects of high airway pressure, high tidal volume, and positive end-expiratory pressure[J]. *Am Rev Respir Dis*, 1988, 137(5): 1159-1164.
- [5] 姜威, 王琳, 楚东岭, 等. 不同潮气量机械通气过程中呼吸机相关性肺损伤的病理学变化[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(31): 6236-6238.
- [6] 李克忠, 姚尚龙, 王志刚, 等. 不同潮气量机械通气对大鼠肺组织 TLR-4 表达的影响[J]. *中华麻醉学杂志*, 2006, 26(10): 888-890.
- [7] Keszler M. Volume-targeted ventilation[J]. *J Perinatol*, 2005, 25(S2): 19-22.
- [8] Del Sorbo L, Goffi A, Ranieri VM. Mechanical ventilation during acute lung injury: current recommendations and new concepts[J]. *Presse Med*, 2011, 40(12 Pt 2): 569-583.
- [9] Vaneker M, Joosten LA, Heunks LM, et al. Low-tidal-volume mechanical ventilation induces a toll-like receptor 4-dependent inflammatory response in healthy mice[J]. *Anesthesiology*, 2008, 109(3): 465-472.
- [10] 吴华, 唐群. 过度机械通气致肺损伤 TNF- α 、IL-1 β 及 NF- κ Bp65 的表达[J]. *中国法医学杂志*, 2009, 24(1): 33-35.
- [11] 王月兰, 姚尚龙. 丝裂原蛋白激酶信号传导通路在机械通气相关性肺损伤的作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2006, 23(3): 331-333.
- [12] Bigatello LM, Pesenti A. Ventilator-induced lung injury: less ventilation, less injury[J]. *Anesthesiology*, 2009, 111(4): 699-700.
- [13] Featherstone NC, Connell MG, Fleming DG, et al. Airway smooth muscle dysfunction precedes tera togenic congenital diaphragmatic hernia and may contribute to hypoplastic lung morphogenesis[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2006, 35(5): 571-578.
- [14] Copland IB, Post M. Stretch-activated signaling pathways responsible for early response gene expression in fetal lung epithelial cells[J]. *J Cell Physiol*, 2007, 210(1): 133-143.
- [15] Okada M, Matsumori A, Ono K, et al. Cyclic stretch up-regulates production of interleukin-8 and monocyte chemoattractant and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1 in human endothelial cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, 18(6): 894-901.
- [16] 丁宁, 肖慧, 许立新, 等. 机械牵张诱导肺泡巨噬细胞的细胞因子表达谱及其与脂多糖对 MIP-2 释放的协同效应[J]. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2009, 8(2): 166-170.
- [17] Sbane JZ. A clear and present danger endogenous ligands of Toll-like receptors[J]. *Neuromolecular Med*, 2010, 12(2): 149-163.
- [18] Curley GF, Kevin LG, Laffey JG. Mechanical ventilation: taking its toll on the lung[J]. *Anesthesiology*, 2009, 111(4): 701-703.
- [19] Chess PR, O'Reilly MA, Sachs F, et al. Reactive oxidant and p42/44 MAP kinase signaling is necessary for mechanical strain-induced proliferation in pulmonary epithelial cells[J]. *J Appl Physiol*, 2005, 99(3): 1226-1232.
- [20] 刘庆辉, 尹建敏, 刘岩, 等. 高浓度氧加重大鼠通气机所致肺损伤的实验研究[J]. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2007, 6(3): 197-200.
- [21] 胡乃浩, 赵文静. 机械通气致大鼠急性肺损伤时肺组织及血 MDA、SOD 的变化[J]. *徐州医学院学报*, 2009, 29(1): 1-3.
- [22] 徐志礼. 允许性高碳酸血症的器官保护及应用策略[J]. *临床肺科杂志*, 2011, 16(3): 432-434.
- [23] Liu M. Ventilator-induced lung injury and mechanotransduction: why should we care? [J]. *Crit Care*, 2007, 11(5): 168.
- [24] Chaiwat O, Vavilala MS, Philip S, et al. Intraoperative adherence to a low tidal volume ventilation strategy in critically ill patients with preexisting acute lung injury[J]. *J*

Crit Care, 2011, 26(2):144-151.

[25] Hoegl S, Bachmann M, Scheiermann P, et al. Protective of inhaled IL-22 in a model of ventilator-induced lung injury [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011, 44(3):369-376.

[26] Sato A, Whitsett JA, Scheule RK, et al. Surfactant protein-d inhibits lung inflammation caused by ventilation in premature newborn lambs [J]. Am J Respir Crit Care

Med, 2010, 181(10):1098-1105.

[27] 刘翠青, 马莉, 马海燕, 等. 机械通气联合肺泡表面活性物质治疗重症新生儿呼吸窘迫综合征 168 例临床分析 [J]. 中国实用儿科杂志, 2010, 25(4):275-278.

(收稿日期: 2013-05-17 修回日期: 2013-06-20)

· 综 述 ·

慢性粒细胞白血病 bcr/abl 融合基因 T315I 点突变的检测及靶向治疗

石 综 综述, 万腊根[△] 审核

(南昌大学第一附属医院检验科 330006)

关键词: 慢性粒细胞白血病; bcr/abl 融合基因; T315I 点突变; 靶向治疗

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.30.045

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)30-3700-03

慢性粒细胞白血病(chronic myelogenous leukemia, CML) 占有白血病的 15%~20%, 90% 以上患者存在特征性的 Ph 染色体(费城染色体)及 bcr/abl 融合基因。Ph 染色体由位于 9q34 的 abl 原癌基因断裂并易位到 22q11 的断裂点集簇区 (bcr) 形成, 并融合形成 bcr/abl 融合基因^[1]。CML 治疗重点在于慢性期获得分子水平的缓解。伊马替尼(imatinib mesylate, IM) 是治疗 CML 的一线药物。随病程进展, 部分患者对 IM 发生耐药, 而耐药的发生与 bcr/abl 基因突变密切相关, 其中 T315I 点突变患者对现有靶向药物几乎均耐药。因此, 针对 bcr/ablT315I 点突变的研究, 已成为 CML 的研究热点。

1 bcr/ablT315I 点突变与耐药

bcrl/abl 融合基因编码的蛋白质具有较强的酪氨酸蛋白激酶(TPK)活性, 通过作用于一系列复杂的细胞信号传导途径, 导致细胞恶性增生、凋亡减少和骨髓基质细胞粘附性下降, 使大量不成熟的髓细胞释放到外周血, 产生 CML 的临床表现。

作为第一代酪氨酸激酶抑制剂, IM 主要用于 CML 慢性期和加速期治疗。IM 竞争性结合 abl 酪氨酸激酶催化部位的 ATP 与胸苷激酶(TPK)受体的结合位点, 阻滞 TK 磷酸化, 从而抑制信号传导, 使酪氨酸激酶不能与 ATP 结合, 从而失去催化活性。随病程进展, abl 酪氨酸激酶区发生突变, 产生对 IM 的耐药^[2]。几乎所有的 CML 急变期和 15%~20% 的 CML 经 IM 治疗后复发的患者对 IM 发生耐药。增加 IM 的剂量或者更换第二代信号转导抑制剂如尼洛替尼(Nilotinib)和达沙替尼(Dasatinib)等, 对大多数突变型 CML 有效。但具有 bcr/abl T315I 突变的 CML 对上述药物均无效, 因而患者病情迅速恶化, 最终死亡。

在 IM 耐药或复发的 CML 患者中发现 100 多种 bcr/abl 基因的突变, 这些突变不仅干扰了激酶抑制剂的亲和力, 而且改变了 bcr/abl 的生物功能^[3-4]。其中, T315I 突变率约占 15%^[5], 该突变所致耐药最难克服。Thr315 位于 abl 核苷酸结合部位, 是与 IM 结合形成氢键的关键部位, 被作为门控分子的残基^[6]。T315I 突变是由位于 abl 基因第 6 号外显子的第 315 位苏氨酸(Thr)被异亮氨酸(Ile)替代, 碱基由 ACT 变为 ATT。突变发生后 Ile315 不能与 IM 形成氢键, 且替代后的 Ile 侧链上的额外碳氢键会产生空间上的干扰, 不利于 IM 结

合, 由此产生耐药。

2 bcr/ablT315I 点突变的常用检测方法

2.1 直接测序法 作为最常用的直接测序法, 双脱氧核糖核酸链末端终止法(Sanger 法)根据核苷酸在某一固定的点开始, 随机在某一个特定的碱基处终止, 并且在每个碱基后面进行荧光标记, 产生以 A、T、G、C 结束的 4 组不同长度的一系列核苷酸, 然后在尿素变性的聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)上电泳进行检测, 从而获得可见的 DNA 碱基序列。利用一种 DNA 聚合酶来延伸结合在待测序列模板上的引物, 直到掺入一种链终止核苷酸为止。每一次序列测定由一套 4 个单独的反应构成, 每个反应含所有 4 种脱氧核苷酸三磷酸(dNTP), 并混入限量的一种不同的双脱氧核苷酸三磷酸(ddNTP)。由于 ddNTP 缺乏延伸所需要的 3-OH 基团, 使延长的寡核苷酸选择性地地在 G、A、T 或 C 处终止。终止点由反应中相应的双脱氧而定。每一种 dNTPs 和 ddNTPs 的相对浓度可以调整, 使反应得到一组长几百至几千碱基的链终止产物, 它们具有共同的起始点, 但终止在不同的核苷酸上, 可通过高分辨率变性凝胶电泳分离大小不同的片段, 凝胶处理后可用 X-光胶片放射自显影或非同位素标记进行检测。然而, 直接测序法对技术要求比较严格, 而且灵敏度较低, 仅能检测浓度大于 6.25% 的突变率^[7], 难以广泛应用于临床。

2.2 高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC) HPLC 分析是以经典的液相色谱为基础, 采用高压输液系统, 将具有不同极性的单一溶剂或不同比例混合溶剂、缓冲液等流动相泵入装有固定相的色谱柱, 在柱内各成分被分离后, 进入检测器进行检测, 检测信号由数据处理设备采集与处理, 并记录色谱图, 从而实现对试样的分析。由于该法对样品要求高、仪器昂贵、且操作繁琐, 其所能检测到最低浓度为 1.5%~3.0%^[7], 尚难普及应用。

2.3 扩增阻碍突变系统(Amplification Refractory Mutation System, ARMS) ARMS 也称等位基因特异性聚合酶链反应(AS-PCR), 是基于 PCR 用于检测 DNA 中各种定点突变的新方法, 其依据的基本原理是: Taq DNA 聚合酶缺少 3' 到 5' 外切酶活性, 因此对于 3' 末端错配的引物, 以低于正常末端配对引物的速度延伸, 当错配碱基数目达到一定程度或者条件达到一