

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/abl T315I 点突变的研究, 已成为 CML 的研究热点。

1 bcr/abl T315I 点突变与耐药

bcr/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/abl T315I 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

定的严谨程度时,3'末端碱基则因磷酸二酯键形成困难而不能延伸,反应终止,也就得不到特异长度的扩增条带,从而表明模板 DNA 没有与引物 3'末端相应的突变;如果 PCR 结果能得到特异长度的扩增条带,表明模板 DNA 上具有与引物 3'末端相应的突变。因此针对不同的已知突变,设计适当的引物,可通过 PCR 方法和电泳图谱达到区分突变型和野生型的目的。ARMS-PCR 点突变的检出率依赖于反应条件的优化和防止引物与靶 DNA 错配时可能发生的错配延伸,这可通过调整实验条件如:引物、靶 DNA、Taq 酶的浓度和反应温度等来提高特异性,在反应体系中加入甲酰胺可减少非特异性扩增,还可通过人为地使引物 3'末端的第 2 个碱基发生错配来阻止错误延伸。该法操作简单,仅一次 PCR 就可检测出突变,经济便宜,且灵敏度高。目前,该法检测患者体内的 T315I 突变,最低可检测的突变量是 2.5×10^{-4} [8]。可见,AS-PCR 作为一种基因诊断方法,有快速、简便、特异、经济的特点,具有广阔的应用前景。

3 bcr/ablT315I 点突变的靶向治疗

近年来,以酪氨酸激酶抑制剂为代表的靶向药物治疗 CML 取得极大进步。然而,现有靶向药物对具有 bcr/ablT315I 突变的 CML 患者均无效。因此,如何克服 bcr/ablT315I 突变所致的耐药,成为研究热点。

近年已研发出针对 T315I 点突变第 3 代分子靶向治疗药物,但这些药物的效果还有待进一步的临床验证。Ponatinib 可抑制 abl 基因的催化活性,缓解 T315I 突变患者的症状 [9]。PHA-739358 主要通过抑制 Aurora 激酶发挥作用,对包括 T315I 点突变者的部分 IM 耐药的患者有作用 [10]。KW-2449 作为多激酶抑制剂,可抑制 FLT3 突变及 T315I 突变的白血病细胞的增殖 [11]。Itonaga 等 [11] 将 IM 与 α 干扰素联合应用,成功治愈了一例含 T315I 突变的 CML 患者,且消除了该患者体内的突变基因。Shi 等 [12] 发现雷公藤内酯可部分逆转 bcr/abl T315I 突变所致 IM 耐药。然而,至今尚无获批针对 T315I 突变 CML 的有效治疗药物。异基因造血干细胞移植仍是唯一可缓解 T315I 突变的有效治疗手段 [13]。

4 展 望

bcr/abl 融合基因及突变在 CML 疾病的发生、发展及预后起关键作用。其中以 T315I 点突变预后最差。由于它对现有靶向药物均产生耐药,故该突变一旦发生,患者预后极差。因此,检测 T315I 点突变对于 CML 治疗与预后判断十分重要。研究发现 CML 患者经 IM 治疗后产生耐药前平均 6.3 个月可检测到 T315I 点突变 [14]。可见,早期检测到该突变有助于重新评价 CML 患者的病情,适时调整治疗策略(如增加剂量或者选择其他药物)。有专家提出 bcr/abl 激酶域突变筛查的适应人群应包括:用 IM 治疗 3 个月未达完全血液学缓解、12 个月未达主要细胞遗传学缓解、18 个月未达主要分子水平缓解的患者 [15]。AS-PCR 具有灵敏度高、操作简单、成本低、检测时间短等特点,有望成为检测 CML 患者 T315I 点突变的首选方法。至今为止,唯有异基因造血干细胞移植是能针对 T315I 突变的有效治疗手段。因此,研制出能够有效针对此突变的药物依然是当务之急。

参考文献:

[1] Nowell PC, Hungerford DA. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes[J]. J Natl Cancer Inst, 1960, 6(25): 85-109.

[2] Gambacorti-Passerini CB, Gunby RH, Piazza R, et al. Molecular mechanisms of resistance to imatinib in Philadelphia-chromosome-positive leukaemias[J]. Lancet Oncol, 2003, 4(2): 75-85.

[3] Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, et al. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia[J]. Cancer Cell, 2002, 2(2): 117-125.

[4] Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results[J]. Blood, 2006, 108(1): 28-37.

[5] Velez N, Cortes J, Champlin R, et al. Stem cell transplantation for patients with chronic myeloid leukemia resistant to tyrosine kinase inhibitors with BCR-ABL kinase domain mutation T315I[J]. Cancer, 2010, 116(15): 3631-3637.

[6] Wongboonma W, Thongnoppakhun W, Auewarakul CU. A single-tube allele specific-polymerase chain reaction to detect T315I resistant mutation in chronic myeloid leukemia patients[J]. J Hematol Oncol, 2011, 4(7): 7.

[7] Yin L, Dittman D, Chenn A. Rapid quantitative detection of the T315I mutation in patients with chronic myelogenous leukemia[J]. Diagn Mol Pathol, 2012, 21(1): 34-39.

[8] O'Hare T, Shakespeare WC, Zhu X, et al. AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance[J]. Cancer Cell, 2009, 16(5): 401-412.

[9] Noronha G, Cao J, Chow CP, et al. Inhibitors of ABL and the ABL-T315I mutation[J]. Curr Top Med Chem, 2008, 8(10): 905-921.

[10] Gontarewicz A, Balabanov S, Keller G, et al. Simultaneous targeting of Aurora kinases and Bcr-Abl kinase by the small molecule inhibitor PHA-739358 is effective against imatinib-resistant BCR-ABL mutations including T315I[J]. Blood, 2008, 111(8): 4355-4364.

[11] Itonaga H, Tsushima H, Hata T, et al. Successful treatment of a chronic-phase T-315I-mutated chronic myelogenous leukemia patient with a combination of imatinib and interferon-alfa[J]. Int J Hematol, 2012, 95(2): 209-213.

[12] Shi X, Jin Y, Cheng C, et al. Triptolide inhibits Bcr-Abl transcription and induces apoptosis in STI571-resistant chronic myelogenous leukemia cells harboring T315I mutation[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(5): 1686-1697.

[13] Nicolini FE, Basak GW, Soverini S, et al. Allogeneic stem cell transplantation for patients harboring T315I BCR-ABL mutated leukemias[J]. Blood, 2011, 118(20): 5697-5700.

[14] Ernst T, Erben P, Muller MC, et al. Dynamics of BCR-ABL mutated clones prior to hematologic or cytogenetic resistance to imatinib[J]. Haematologica, 2008, 93(2):

186-192.

[15] Baccarani M, Saglio G, Goldman J, et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the

European LeukemiaNet[J]. Blood, 2006, 108(6): 1809-1820.

(收稿日期:2013-05-23 修回日期:2013-06-18)

· 综 述 ·

交锁髓内钉治疗胫骨骨折的研究进展

李廷栋¹综述,蒋赞利^{2△}审校

(东南大学附属中大医院骨科,南京 210009)

关键词:内固定;交锁髓内钉;胫骨骨折;研究进展

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.30.046

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)30-3702-02

胫骨骨折(tibial fracture)是临床常见的长骨骨折,多为高能量、暴力损伤,多伴有严重的软组织损伤,临床治疗及功能恢复难度较大。随着内固定技术的进步和微创外科的发展及BO治疗理念的推广,交锁髓内钉固定成为治疗胫骨干骨折的首选方法^[1-2]。然而,其治疗应用中也存在诸多分歧和不足,文献报道不一。现将近年来关于交锁髓内钉固定胫骨骨折的治疗现状做一综述。

1 手术入路及进针点

适当的手术入路及进针点可以使膝关节具有良好的耐受性,骨折端固定牢固,预防并发症的发生,手术入路和进针点选择不当容易出现膝前区疼痛等并发症^[3-4]。有关髓内钉固定后出现膝前区疼痛的系统评价表明^[3]:膝前区疼痛的发生率为47.4%(10%~86%),患病率30%。

1.1 手术入路 经髌韧带入路不破坏髌韧带两侧的营养血管,韧带容易愈合,手术操作方便但术后容易引起膝关节疼痛;经髌韧带旁入路容易损伤髌韧带侧方的营养血管,术后膝前区疼痛的发生与髓内钉突出相关^[4]。Darabos等^[5]研究发现,经髌韧带旁入路,主钉顶端位置不超过胫骨平台6.0 mm,不超过胫骨粗隆2.6 mm,不会引起膝前区疼痛。

1.2 进针点 适宜的进针点取决于胫骨长度、髓内钉的型号、手术方法^[6]。理想的髓内钉插入点应在胫骨结节与膝关节前缘的中点,由于髌韧带的解剖结构存在个体差异,进针点在胫骨结节中点外侧(2.5±1.8)mm进行调整。通常尽量避免内置物损伤髌韧带增加膝关节疼痛^[7]。

2 切开穿钉和闭合穿钉

2.1 切开复位穿钉 传统的切开复位穿钉技术,广泛剥离骨膜破坏局部血供及损伤皮肤软组织,同时,骨折端暴露于外界增加切口感染及骨不连风险^[8-9]。有限切开复位穿钉技术损伤小、失血量少、减少骨折端骨膜的剥离、骨折愈合快;多段骨折,粉碎性骨折闭合复位困难,有限切开复位穿钉取得良好效果^[10-11]。

2.2 闭合复位穿钉 闭合复位骨牵引或牵引床牵引复位不暴露骨折端,骨折断端血供破坏少,但由于肌肉牵拉以及近关节端缺少骨皮质的支撑,复位困难,容易导致畸形;并且术后容易进一步丢失手术复位使骨筋膜室压力增高,发生骨筋膜室综合征的潜在风险增高,骨折愈合时间,住院时间,手术时间,术中,术后出血量,闭合复位比切开复位更具优势^[12-13]。Im等^[14]通

过前瞻性研究表明:切开复位穿钉技术在恢复力线方面和复位方面具有显著优势。

3 扩髓与非扩髓

扩髓与否目前仍存在不少争议。扩髓主要是通过有效地扩大延长髓腔峡部增加工作长度;增加内置物与骨髓腔的接触面,从而增加固定的强度;扩髓后的骨屑浇灌局部具有植骨作用。非扩髓则对骨膜系统血供破坏相对较小;手术时间、骨折移位、感染等并发症的发生率相对较低;但患肢负重时间较晚。Gómez-Benito等^[12]对胫骨近段、中段、远段3个不同位置的骨折进行生物力学方面的研究提示:近端不扩髓临床疗效较好,中段及远段扩髓则获得良好的效果。扩髓产生高热以及高温退去的时间间隔与骨坏死的发生相关,扩髓引起的全身反应较小。

4 静力固定与动力固定

4.1 静动力固定 锁钉与主钉之间通过分享式应力承载来稳定骨折,使骨折处应力减小,同时能防止骨折旋转、短缩重叠及延长分离,适合于不稳定性骨折的治疗。缺点:由于锁钉与主钉之间轴向应力集中,容易出现锁钉断裂,延迟愈合等并发症。动力固定:固定骨折近端或远端,骨折断端紧密接触,增强应力刺激,将骨折端髓腔的间叶细胞挤出髓腔并扩散至外骨膜区域,分化产生胶原束连接外、内骨痂,促进矿物质沉积,产生更坚强的内、外骨痂,促进骨痂塑形^[14]。

4.2 静力固定动力化 动力化固定应最大限度地保持骨折端稳定性,且不影响关节运动功能;动力化应使骨折部位峡部与保留锁钉之间以维持固定稳定。动力化时机应综合骨折部位、髓腔直径及患肢功能等因素。有学者建议^[15]:术后骨痂形成早期及中期4~10周,通过骨折端微动刺激促进骨痂形成,同时消除了应力集中,动力加压过程中锁钉对主钉滑动进行限制,有效避免髓内钉退出,锁钉疲劳断裂和取出远端锁钉动力化突破胫骨远端关节穹隆顶而进入踝关节等危险。动力化的不足:骨折端稳定性变弱,远端锁钉断裂,二次手术存在感染风险及增加患者经济负担。

5 远端锁定技术与阻挡螺钉

5.1 远端锁定 胫骨中下段骨折远端固定治疗难度较大。有文献报道:胫骨远端骨折力线不良率约为14%^[15]。锁定失败及畸形愈合的常见原因^[16]:髓内钉的直径选择不当,容易导致髓内钉插入困难增加锁定难度;进针点与进针方向选择不当,影响髓内钉与髓腔中轴方向;目前常用带锁髓内钉远端锁钉大