

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.00898

EML4-ALK 融合基因与非小细胞肺癌

赵 静,余永伟,郑建明*

第二军医大学长海医院病理科,上海 200433

[摘要] 棘皮动物微管结合蛋白4(echinoderm microtubule associated protein-like 4, EML4)与间变淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase, ALK)形成的融合基因,被认为是非小细胞肺癌(NSCLC)新的分子靶点。EML4-ALK 融合基因的发生率为3%~11%,该融合基因在年轻、腺癌、不吸烟或轻度吸烟的 NSCLC 患者中发生率较高,表达阳性者可以受益于 ALK 抑制剂(如克唑替尼)的治疗。本文重点阐述 NSCLC 中 EML4-ALK 融合基因的生物学特性、检测方法、临床特征和治疗方式。

[关键词] 非小细胞肺癌; EML4-ALK; 融合基因

[中图分类号] R 734.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2014)08-0898-03

EML4-ALK fusion gene and non-small cell lung cancer

ZHAO Jing, YU Yong-wei, ZHENG Jian-ming*

Department of Pathology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] The fusion gene of echinoderm microtubule-associated protein-like 4 (EML4) and anaplastic lymphoma kinase(ALK) has recently been identified as a new molecular target for non-small cell lung cancer (NSCLC). EML4-ALK fusion gene is about 3%-11% in patients with NSCLC, and it has a higher morbidity in NSCLC patients who are young, without or with light smoking history and with adenocarcinomas. EML4-ALK positive NSCLC patients may be treated with ALK inhibitor (crizotinib). This review focuses on the biology, detection method, clinical characteristics and the therapeutic application of EML4-ALK in NSCLC.

[Key words] non-small cell lung cancer; EML4-ALK; fusion gene

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(8):898-900]

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一,其中 75%~80%为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC),5年总生存率约 10%~15%^[1]。由于肺癌的早期发现率低,多数 NSCLC 患者确诊时即为晚期,已失去手术治疗的机会,放化疗成为其主要治疗手段,但放化疗普遍存在的毒副作用通常又令多数患者望而生畏^[2]。随着对肿瘤发病机制及其生物学行为研究的不断深入,针对这些发病机制的信号转导通路小分子抑制剂或单克隆抗体已逐步进入临床,人们越来越多地把焦点聚向以特异性高、不良反应轻为特点的分子靶向治疗。目前临床较常用的肺癌分子靶向治疗有针对表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)突变的小分子酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI)吉非替尼(Gefitinib)、厄洛替尼(Erlotinib)和西妥昔单抗(Cetuximab)。这些单克隆抗体可以阻断 EGFR 介导的信号转导,从而抑制肿瘤细胞的生长、抑制肿瘤细胞生命周期的延长、抑制肿瘤侵入周围组织和

促进肿瘤细胞的凋亡^[3]。近期发现 NSCLC 患者中存在除 EGFR 突变、K-ras 突变之外的另一个重要的 TKI 作用靶点——EML4-ALK 融合基因,即棘皮动物微管相关蛋白4(echinoderm microtubule associated protein-like 4, EML4)与间变淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase, ALK)融合基因。这一融合基因表达阳性的肺癌患者可以受益于 ALK 抑制剂(如克唑替尼)的治疗。有研究提示,在肿瘤转移患者中 EML4-ALK 融合基因阳性与 EGFR-TKI 耐药相关^[4]。

1 EML4-ALK 的生物学特性

ALK 于 1994 年首先发现于间变性大细胞淋巴瘤 AMS3 细胞株中^[5],是由 1 620 个氨基酸组成的跨膜蛋白,属于胰岛素受体家族。2007 年, Soda 等^[6]在 1 例 62 岁有吸烟史的男性肺腺癌患者的肿瘤组织中首次发现 EML4-ALK 融合基因。EML4-ALK 融合基因的重排发生在 2 号染色体短臂上的 2

[收稿日期] 2013-11-06 **[接受日期]** 2014-04-01

[作者简介] 赵 静,技师, E-mail: jinni_23@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-31162270, E-mail: jmzheng1962@163.com

区1带和2区3带,相隔10 Mb距离,由 *ALK* 基因的3'端与 *EML4* 基因的5'端倒位融合形成。在肺癌中, *ALK* 最常见的融合基因即为 *EML4*, *EML4-ALK* 融合基因在大约3%~11%的NSCLC中发生^[7]。到目前为止,研究人员确认至少存在9种 *EML4-ALK* 融合基因变异体,分析这些融合基因的结构特点发现, *ALK* 部分均为20号外显子编码细胞内酪氨酸激酶结构基因片段,而 *EML4* 部分包括不同外显子的片段基因(2、6、13、14、15、18和20号外显子)。其中最常见的是E13;A20(variant 1)和E6a/b;A20(variant 3),其发生率分别为33%和29%^[8-9]。

2 *EML4-ALK* 融合基因检测方法

目前 *EML4-ALK* 融合基因检测常用的方法有免疫组织化学法(IHC)、荧光原位杂交法(FISH)和反转录聚合酶链反应法(RT-PCR)。RT-PCR最早用于 *EML4-ALK* 融合基因的检测,该方法快速灵敏,应用范围广,不但可同时检测多个已知亚型,还可以结合测序技术发现新的亚型,可以对石蜡包埋组织进行测定,其不足之处是扩增带来的假阳性难以避免^[10]。IHC法优势是检测肿瘤特异性抗原表达,而不丢失能鉴别正常组织和病理组织的细胞和组织结构特征,具有快速筛选作用,其不足点是 *ALK* 蛋白表达结果可能会是微弱的和局部的^[11],存在一定主观性,对阳性结果须进一步用FISH等技术来验证。FISH采用探针特异性标记细胞核中 *ALK* 断裂点来检测 *ALK* 重排,分离的荧光信号提示存在 *ALK* 重排。其优点是可以从病理切片或细胞涂片上检测少数细胞的融合变异,假阳性率低。目前与 *ALK* 融合基因相关靶向药物的实验是以FISH作为入组的诊断方法^[8]。然而FISH结果也会受到一些因素的影响,如标本的固定、烤片温度、蛋白质消化不当等都会造成信号减弱或无信号,且价格昂贵造成其不适合用于 *EML4-ALK* 融合基因的筛查。目前没有检测 *EML4-ALK* 融合基因的金标准,以上方法各有优缺点,有一定的互补性,可结合临床获得的各种生物组织标本选择最合适的检测方法。

3 *EML4-ALK* 阳性患者的临床病理特征

EML4-ALK 基因阳性患者与 *EGFR* 突变患者有相似的临床特征,该融合基因更多发生于男性、不吸烟或轻度吸烟的肺腺癌患者,然而,在大多数情况下,除了极少数例外^[12-13], *EML4-ALK* 和 *EGFR* 基因突变是相互排斥的,患者如具有 *EGFR* 突变临床特征但 *EGFR* 突变检测为阴性时,约1/3可能携带

EML4-ALK 融合基因型。*EML4-ALK* 融合基因多表达于肺腺癌,在腺泡样腺癌、乳头状癌和印戒细胞癌中尤为多见,其他组织学类型如鳞癌、腺鳞癌及黏液表皮样癌中也偶见;在亚洲人群中,以腺泡癌为主^[14]。由此可见 *EML4-ALK* 阳性的NSCLC具有独特的分子病理学特征。最新研究提示 *EML4-ALK* 融合基因阳性的NSCLC患者可能临床病程较长,预后较好^[15],但尚需更多病例的观察与比较才能确认。

4 *EML4-ALK* 基因与TKI耐药性的关系

与大多数分子靶向治疗药物一样,克唑替尼(*crizotinib*)也出现了原发或继发耐药。有研究发现 *ALK-TKI* 耐药也与 *EGFR* 介导的旁路途径相关,联合应用 *EGFR* 与 *ALK* 抑制剂可能有效治疗这类NSCLC患者^[16],但缺少大型的临床对照研究。有研究称肿瘤生物学性状的改变是肿瘤发生耐药或进展的常见机制,关于 *EGFR* 的不同表达影响肿瘤原发及转移的信息已经被报道^[17],但关于 *ALK* 融合基因的影响仍需进一步研究。Choi等^[15]报道1例 *EML4-ALK* 阳性的NSCLC患者,男性,28岁,无吸烟史,肺腺癌,在经过5个月的克唑替尼治疗后出现了继发耐药,他们对治疗前后的肿瘤基因进行深层测序发现:耐药的产生主要是由于2种独立的突变,一种是融合基因 *EML4-ALK* 第4374位碱基由A替代G,导致位于 *ALK* 基因第1156位的半胱氨酸替代酪氨酸(C1156Y);另一种是 *ALK* 基因第4493位碱基由C替代A,导致位于 *ALK* 基因第1196位的亮氨酸替代甲硫氨酸(L1196M)。这2种突变可能影响 *ALK* 蛋白的结构,阻止药物与蛋白结合从而降低药物克唑替尼的疗效。L1196M突变通过改变三磷酸腺苷(ATP)结合位点,阻碍 *ALK* 基因与药物结合,从而产生耐药,表达L1196M突变的细胞要比表达C1156Y突变者耐药更加明显。L1196M突变的耐药患者可选择CH5424802,从而阻断 *EML4-ALK* L1196M突变所致的细胞生长,用以治疗克唑替尼耐药^[16]。Katayama等^[17]提出可以用比克唑替尼活性更强的 *ALK* 抑制剂如TAE684及AP26113,或是HSP90抑制剂对NSCLC患者进行治疗;目前C1156Y的耐药机制尚不清楚。既往的研究认为 *EML4-ALK* 融合基因与 *EGFR* 突变不共存,但最近有研究发现二者共存^[18],二者之间有什么关联呢?二者同时发生突变时的治疗方案和疗效如何?这需医学家和科学家共同努力开发出更加有效和毒性更小的抗NSCLC药物。

5 结 语

肺癌的靶向治疗近几年取得了一定的进展,但是大多数肺癌患者的生存时间仍未明显提高。对于肺癌分子基础的不断研究已经使人们对肺癌发生、发展过程中调控的信号通路网络有了更深入的认识。目前肺癌分子靶点的研究现状主要有:(1)基因突变:*EGFR*、*K-ras*、*BRAF*、*HER2*等;(2)基因扩增:*c-MET*、*HER2*、*PDGFR α* 、*FGFR1*等;(3)基因融合:*EML4-ALK*、*ROS1*、*KIF5B-RET*等。除此之外,还存在其他未知的或者了解得并不透彻的机制,只有深入充分地了解肺癌的发生、发展及其耐药机制,才能根据不同的肺癌分子改变开发出具有针对性的治疗药物,并有效地应用于特定的患者群体,发展并完善肺癌的个性化治疗。另外还有众多相关靶点如 VEGF、IGF-IR、mTOR 等同样与 NSCLC 密切相关。*EML4-ALK* 融合基因检测诊断的方法目前尚无公认的金标准,这些都有待于我们进一步深入研究。

6 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

【参 考 文 献】

- [1] Travis W D, Brambilla E, Muller-Hermelink H K. Pathology and genetics of tumors of the lung, pleura, thymus and heart World Health Organization classification of tumors[M]. Lyon: IARC Press, 2004: 9-67.
- [2] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62: 10-29.
- [3] Zhou C, Wu Y L, Chen G Y, Feng J, Liu X Q, Wang C. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced *EGFR* mutation-positive non-small cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre open-label, randomised, phase 3 study[J]. Lancet Oncol, 2011, 12: 735-742.
- [4] Shaw A T, Yeap B Y, Mino-Kenudson M, Digumarthy S R, Costa D B, Heist R S, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor *EML4-ALK*[J]. J Clin Oncol, 2009, 27: 4247-4253.
- [5] Shiota M, Fujimoto J, Semba T, Satoh H, Yamamoto T, Mori S. Hyperphosphorylation of a novel 80 kDa protein-tyrosine kinase similar to Ltk in a human Ki-1 lymphoma cell line, AMS3[J]. Oncogene, 1994, 9: 1567-1574.
- [6] Soda M, Choi Y L, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al. Identification of the transforming *EML4-ALK* fusion gene in no-small cell lung cancer [J]. Nature, 2007, 448: 561-566.
- [7] Lin E, Li L, Guan Y, Soriano R, Rivers C S, Mohan S, et

al. Exon array profiling detects *EML4-ALK* fusion in breast colorectal, and non-small cell lung cancers [J]. Mol Cancer Res, 2009, 7: 1466-1476.

- [8] Sasaki T, Rodig S J, Chirieac L R, Jänne P A. The biology and treatment of *EML4-ALK* non-small cell lung cancer [J]. Eur J Cancer, 2010, 46: 1773-1780.
- [9] Ou S H, Bartlett C H, Mino-Kenudson M, Cui J, Iafrate A J. Crizotinib for the treatment of *ALK*-rearranged non-small cell lung cancer: a success story to usher in the second decade of molecular targeted therapy in oncology [J]. Oncologist, 2012, 17: 1351-1375.
- [10] Soda M, Takada S, Takeuchi K, Choi Y L, Enomoto M, Ueno T, et al. A mouse model for *EML4-ALK* positive lung cancer [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105: 19893-19897.
- [11] Boland J M, Erdogan S, Vasmatazis G, Yang P, Tillmans L S, Johnson M R, et al. Anaplastic lymphoma kinase immunoreactivity correlates with *ALK* gene rearrangement and transcriptional up-regulation in non-small cell lung carcinomas [J]. Hum Pathol, 2009, 40: 1152-1158.
- [12] Zhang X, Zhang S, Yang X, Yang J, Zhou Q, Yin L, et al. Fusion of *EML4* and *ALK* is associated with development of lung adenocarcinomas lacking *EGFR* and *KRAS* mutations and is correlated with *ALK* expression [J]. Mol Cancer, 2010(9): 188.
- [13] Kuo Y W, Wu S G, Ho C C, Shih J Y. Good response to gefitinib in lung adenocarcinoma harboring coexisting *EML4-ALK* fusion gene and *EGFR* mutation [J]. J Thorac Oncol, 2010, 5: 2039-2040.
- [14] Takeuchi K, Choi Y L, Togashi Y, Soda M, Hatano S, Inamura K, et al. *KIF5B-ALK*, a novel fusion oncogene identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for *ALK*-positive lung cancer [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15: 3143-3149.
- [15] Choi Y L, Soda M, Yamashita Y, Ueno T, Takashima J, Nakajima T, et al. *EML4-ALK* mutations in lung cancer that confer resistance to *ALK* inhibitors [J]. N Engl J Med, 2010, 363: 1734-1739.
- [16] Sakamoto H, Tsukaguchi T, Hiroshima S, Kodama T, Kobayashi T, Fukami T A, et al. CH5424802, a selective *ALK* inhibitor capable of blocking the resistant gatekeeper mutant [J]. Cancer Cell, 2011, 19: 679-690.
- [17] Katayama R, Khan T M, Benes C, Lifshits E, Ebi H, Rivera V M, et al. Therapeutic strategies to overcome crizotinib resistance in non-small cell lung cancers harboring the fusion on-cogene *EML4-ALK* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108: 7535-7540.
- [18] 曾 珠, 吴一龙. *EML4-ALK* 与 *EGFR* 基因突变共存型非小细胞肺癌研究进展 [J]. 中国肺癌杂志, 2011, 14: 880-884.