

EML4-ALK 融合基因在非小细胞肺癌中的研究进展

赵 腾 夏 凡 王晓红[△]

(哈尔滨医科大学附属第三医院肿瘤科 黑龙江 哈尔滨 150081)

摘要 肺癌是发病率和死亡率最高的恶性肿瘤,分子靶向治疗以其特异性高、副反应轻的特点正日益受到关注。近年来临床研究发现 EML4-ALK 融合基因是除 EGFR 突变及 KRAS 突变之外的另一个重要的酪氨酸激酶抑制剂的作用靶点,该融合基因在年轻、不吸烟或少吸烟、腺癌、无 EGFR 和 KRAS 突变的非小细胞肺癌患者中发生率较高,且该融合基因阳性者对酪氨酸激酶抑制剂耐药,对于 ALK 抑制剂(如克唑替尼)则有良好的治疗反应,关于该药的临床试验表明:总有效率达 57%(46 例确定为部分缓解,1 例确定为完全缓解),估计 6 个月无进展生存概率为 72%,常见的副反应是 1、2 级胃肠道反应。该基因及该药的发现为非小细胞肺癌患者带来了希望。

关键词 棘皮动物微管结合蛋白 4;非小细胞肺癌;研究进展

中图分类号 R734.2 文献标识码 A 文章编号:1673-6273(2012)25-4992-03

Research Progress of EML4-ALK Fusion Gene in Non-small Cell Lung Cancer

ZHAO Teng, XIA Fan, WANG Xiao-hong[△]

(Department of Oncology, the Third Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150081, China)

ABSTRACT: The morbidity and mortality of lung cancer is currently the highest in all the malignant tumors. Because of its higher specificity and milder side-effects, molecule target therapy in non-small cell lung cancer (NSCLC) is drawing concern at present. Recently clinical studies have found that EML4-ALK fusion gene is another important molecular target of tyrosine kinase inhibitors in addition to EGFR mutations and KRAS mutations. The fusion gene has higher morbidity in NSCLC patients who are young, never or light smoking history, adenocarcinomas, without EGFR and KRAS mutation. Although patients who harbor this mutation do not benefit from EGFR TKIs, they have shown good response to ALK inhibitor (for example: Crizotinib). Clinical trials about the drug have shown: the overall response rate was 57% (with 46 confirmed partial responses and 1 confirmed complete response), and the estimated probability of 6-month progression-free survival was 72%, grade 1 or 2 mild gastrointestinal effects are the common side effects. Discovery of the gene and the drug may bring new hope for the patients with NSCLC.

Key words: Echinoderm microtubule associated protein-like 4; Non-small cell lung cancer; Research progress

Chinese Library Classification(CLC): R734.2 Document code: A

Article ID:1673-6273(2012)25-4992-03

目前,肺癌是发病率和死亡率最高的恶性肿瘤,其中约 80% 为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC),每年死于肺癌的患者超过 100 万人^[1]。多数患者确诊时即为晚期,已失去手术的机会,对于这些患者,放化疗为其治疗手段,但放化疗普遍存在的毒副反应又令多数患者望而生畏。分子靶向治疗的出现为这些患者的治疗提供了契机,并以其特异性高及副反应轻的特点迅速被广大医生和患者认可。临床较常用的分子靶向治疗有: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)如厄洛替尼和吉非替尼等,针对肿瘤血管生成的抗血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)单克隆抗体(贝伐单抗)及内皮抑素(恩度)等。近来研究发现非小细胞肺癌患者中存在除 EGFR 突变及 KRAS 突变之外的另一个重要的酪氨酸激酶抑制剂的作用靶点——EML4-ALK 融合基

因,即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)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 抑制剂的治疗^[2,3]。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 融合基因的结构

EML4 为棘皮类动物微管相关蛋白样蛋白家族成员,其结构由 N 端 Basic 区,疏水的棘皮动物微管相关蛋白区(hydrophobic echinoderm microtubule-associated protein-like protein, HELP)以及 WD 重复区三部分构成。其中 Basic 区在 EML4-ALK 融合蛋白产生效应中起重要作用,而 Basic 区靠近 N 端的 CC 区全部由 EML4 的 2 号外显子编码,HELP 区或 WD 重复区的缺失会使激酶的活性降低 50%以上^[2,5]。间变淋巴瘤激酶(ALK)是受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTK)家族的胰岛素受体亚族,于 1994 年首先发现于间变性大细胞淋巴瘤^[6],属于胰岛素受体家族成员^[7]。二者均位于 2 号染色体上但方向相反,其发生机制为 EML4 基因从染色体上断

作者简介 赵腾(1987-),女,硕士研究生,主要研究方向:肺癌的靶向治疗,电话:13845087124, E-mail: tengtengkan@126.com

[△]通讯作者 王晓红, E-mail: guolili-guoguo@163.com

(收稿日期:2012-03-15 接受日期:2012-04-10)

裂分离 裂解成不同长度的片段 插入 ALK 基因 20 外显子内^[8], Fukuyoshi 等^[9]在一例 EML4-ALK 融合基因阳性的患者体内分离出 2.5kb 的 PCR 产物 与 Soda 最初报道的大小不同 标志着该融合基因在形成时有不同的断裂位点。正是由于断裂位点的差异,形成了多种融合基因型,已经检测到的断裂点有 2、6、13、14、15、17、18、20 号外显子,形成了 11 种 EML4-ALK 融合基因型^[2,5],其中最常见的是 EML4 的 13 号外显子与 ALK 的 20 号外显子的融合和 EML4 的 6a/b 外显子与 ALK 的 20 号外显子的融合,有文献报道此二者占 NSCLC 中 EML4-ALK 融合基因的 62%。Perner 等^[10]则提出 EML4-ALK 融合基因的发生机制存在更复杂的细胞遗传学改变,而不是单纯的染色体倒位。2007 年 Soda 等^[2]首次报道从一名有吸烟史的 62 岁男性肺腺癌患者的手术标本中提取出 cDNA 表达产物 将肿瘤细胞中的基因分别在体外植入正常细胞,结果当植入 ALK 和 EML4 融合基因后,正常细胞发生癌变。随后 EML4-ALK 融合基因在多种肿瘤中被证实具有促进肿瘤形成的作用^[11]。

2 EML4-ALK 融合基因的检测方法

一般根据样本组织的性质及质量选择敏感性和特异性较高的检测方法。目前比较常用的 EML4-ALK 融合基因的检测方法有:免疫组织化学方法(immunohistochemistry,IHC),逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR),荧光原位杂交方法(fluorescence in situ hybridization, FISH)。

IHC 操作简便,是最常用的检测方法。通过检测肿瘤特异性抗原的表达从而确定有无融合^[12],但由于 NSCLC 中 ALK 蛋白的表达较低,因此其检测的敏感性相对 RT-PCR 和 FISH 法较低,且不能分辨出具体的 ALK 融合基因类型。Kenudson 等^[13]研究发现,应用兔单克隆抗体 D5F3 检测肺腺癌中 ALK 蛋白表达的敏感性及其特异性均优于鼠来源的单克隆抗体 ALK1,两个抗体最大的区别在于 ALK1 抗体高浓度情况下肿瘤和非肿瘤组织非特异性染色的水平。

RT-PCR 具有诊断快速、敏感性高的特点,即使在只有很少 EML4-ALK 突变细胞的情况下也能检测到突变的存在,其检测主要针对 ALK,但此种方法对 RNA 质量的要求高,对于新鲜标本检测阳性率较高。该方法可在患者痰中从成千上万的非肿瘤细胞中检测出仅有的少许携带融合基因的肿瘤细胞,甚至可以从肺癌患者胸膜腔积液、支气管盥洗液、肺活检标本、外周血标本中检测出 EML4-ALK 融合基因^[12]。

FISH 检测是采用特异性的生物探针标记 ALK 的断裂点,来检测 ALK 重排,分离的荧光信号提示存在 ALK 重排^[14],该方法的敏感性和特异性均相对较高,当 IHC 不能确定有无突变存在时可用此法进行确认,其缺点为价格昂贵。

除上述方法外,张旭超等^[15]曾报道过另一种检测方法: RACE- 偶联 PCR 测序法 (rapid amplification of cDNA ends-coupled PCR),该方法可用于 ALK 融合伴侣已知情形下的融合基因检测,也可用于检测新的未知的融合伴侣。该方法敏感性高,在临床上可用于 EML4-ALK 融合基因患者靶向治疗的筛选。

3 EML4-ALK 融合基因与 NSCLC

2007 年 Soda、Fukuyoshi 等^[2,9]应用 RT-PCR 方法检测了包括肺癌、急性粒细胞白血病、非霍奇金淋巴瘤、结直肠癌、胃肠道肿瘤、乳腺癌在内的共 1010 例恶性肿瘤患者的 EML4-ALK 融合基因,除一例肺癌患者外,在其他肿瘤中均未发现含有该融合基因,强烈提示该融合基因是 NSCLC 特有的一个新型基因靶点。

2008 年,日本的 Inamura 等^[16]亦是用 RT-PCR 的方法检测 221 例肺癌患者的 EML4-ALK 融合基因的 mRNA 情况,其中包括腺癌、鳞癌、大细胞癌以及小细胞癌,对于检测阳性的患者,进一步使用 IHC 法观察融合基因的表达。结果只在腺癌中检测到 5 例(3.4%)有融合基因,并检测到相应的 ALK 融合蛋白。

2009 年 Shaw 等^[4]报道了 141 例 NSCLC 患者 EML4-ALK 融合基因情况,该研究要求入组患者必须具备以下特征中的至少两项:女性、亚裔、无或少量吸烟史(每年吸烟 ≤ 10 包或戒烟 ≥ 1 年者)、腺癌。结果显示,19 例存在 EML4-ALK 融合突变,其发生率为 13%。其中,年轻($P<0.001$)、男性($P=0.036$)、不吸烟或少量吸烟患者($P<0.001$)的阳性率较高,19 例突变患者中 18 例组织学检查为腺癌,印戒细胞癌占多数,另一例是腺鳞癌。

2010 年,中国学者张旭超等^[15]运用 RACE- 偶联 PCR 方法检测了 103 例 NSCLC 患者 EML4-ALK 融合基因的情况,结果显示该融合基因发生率为 11.6%(12/103),进一步的分析显示,该融合基因在腺癌中的发生率是 16.13(10/62),在不吸烟患者中的发生率为 19.23%(10/52, $P=0.03$),在无 EGFR 和 KRAS 突变的腺癌患者中的发生率为 42.80%(9/21, $P=0.04$)。由此该实验得出结论: EML4-ALK 融合基因在中国非小细胞肺癌患者中的发生率更高,尤其是在无 EGFR 和 KRAS 突变的腺癌患者中。

4 EML4-ALK 融合基因与 ALK 抑制剂

Soda 等^[17]利用转基因小鼠建立肺腺癌模型后,将小鼠随机分为治疗组与对照组,治疗组接受 ALK 抑制剂(2,4-pyrimidinediamine)治疗,以胸部 CT 评价治疗疗效,在治疗 0、11、25 天所有小鼠均行胸部 CT 检查。对照组小鼠双肺的肿瘤组织均快速增长,肺内已经存在的肿瘤结节增大并且出现了许多不同大小的新生结节。治疗组小鼠肿瘤负荷明显减少,其中一只小鼠(373 号)在治疗第 11 天时右下叶一个较大的肿瘤结节体积缩小了大约 70%,治疗 25 天时胸部 CT 已不能发现该病灶。

目前,选择性 ALK 激酶抑制剂在早期临床试验中已取得令人瞩目的结果。Crizotinib (PF-02341066) 是一种口服的 ALK 和 MET 酪氨酸激酶抑制剂,它选择性竞争 ATP,从而抑制活化的 ALK 中酪氨酸磷酸化。Kawak 等^[3]应用该药治疗 82 例经 FISH 证实 ALK 阳性的晚期非小细胞肺癌患者,其中 90%以上至少为二线治疗,给药剂量从 50mg 每天到 300mg 一天两次不等,结果 46 例部分缓解,1 例完全缓解,27 例稳定,总有效率达 57%,估计 6 个月无疾病进展期的概率为 72%。对于

250mg 一天两次口服组的患者安全性分析表明,Ⅰ级恶心(52%)及腹泻(46%)是最常见的副作用,其次为呕吐(43%)、轻微视力损害(41%)及便秘(22%)等,没有3、4级副反应出现。有人提出疑问:上述结果的出现是否与 Crizotinib 的 MET 酪氨酸激酶抑制作用相关?针对这一疑问,对33例可获得标本的患者同时检测了 MET 扩增,均为阴性,从而否定了上述疑问,更加确认了 Crizotinib 对于 ALK 的抑制作用。Li 等^[18]研究发现另一种 ALK 小分子抑制剂 TAE684 与 PF-02341066 相比,无论在体外或体内,对于 EML4-ALK 融合基因的致瘤活性具有更强的抑制作用。

然而,像其他的靶向药物一样,治疗有效的患者最终也会产生耐药。2010年,Choi 等^[19]报道过一例对 ALK 抑制剂耐药的 NSCLC 患者,该患者男性,28岁,无吸烟史,肺腺癌,T4N3M1期,EGFR 突变阴性,化疗后疾病进展,出现右胸腔积液,通过 RT-PCR 方法在痰液标本中检测到 EML4-ALK mRNA,于是入组到 crizotinib 研究,给予 crizotinib 250mg 一天两次口服,一周后症状明显缓解,虽然治疗效果评价为部分缓解(PR),但右胸腔积液始终未能完全消除,5个月后肿瘤再次进展,对患者胸水中的肿瘤细胞分析发现 EML4-ALK 融合基因激酶区域内的二次突变,4374 G→A 和 4493 C→A,导致对应位置的氨基酸改变,并证实这两个点突变都与 ALK 抑制剂耐药有关,由于未能检测 crizotinib 治疗前的胸水标本,不能确定耐药克隆是原发的还是治疗过程中继产生的。由此得出结论,EML4-ALK 抑制剂像其他靶向药物一样,可能只对一部分携带 EML4-ALK 融合基因的 NSCLC 患者有效,基因内的二次突变可能是引起 ALK 抑制剂耐药的原因。

5 EML4-ALK 融合基因与 EGFR 突变

多项研究表明,对于 EGFR 突变患者,酪氨酸激酶抑制剂(TKI)如吉非替尼等,有效率很高,而对于无突变的野生型患者上述药物基本无效。2009年,Shaw 等^[4]报道141例肺癌患者中 EML4-ALK 融合基因阳性率为13%,然而在无 EGFR 突变的不吸烟或轻度吸烟患者中其阳性率为33%,且 EML4-ALK 阳性与 EGFR-TKI 耐药相关。中国学者 Wong 等^[20]对266例 NSCLC 患者的手术冰冻标本进行 EML4-ALK 融合基因检测,结果发现 EGFR 突变阴性与 EML4-ALK 融合基因阳性呈正相关($P=0.001$)。提示在 EGFR 及 KRAS 突变之外存在其他的肺癌靶向位点,这对于 EGFR-TKI 耐药的患者无疑带来了福音。

EML4-ALK 融合基因是否完全独立于 EGFR 及 KRAS 突变之外?张旭超等^[15]在试验中发现一例患者同时存在 EGFR 突变与 EML4-ALK 融合基因 3b 型,该患者为中国、不吸烟、女性、腺癌,但 EML4-ALK 融合基因与 KRAS 突变却是相互排斥的。

6 结语

EML4-ALK 融合基因的发现为非小细胞肺癌患者的靶向治疗开辟了新的道路。但并非所有的非小细胞肺癌患者均携带该融合基因,腺癌、不吸烟或少吸烟、年轻、无 EGFR 和 KRAS 突变的患者阳性率更高。EML4-ALK 融合基因阳性与 TKI 耐药有关,因此临床上常先检测 KRAS 突变状态,对于 KRAS 野

生型患者进行 EGFR 突变检测,如 EGFR 为突变型,则可进行 TKI 药物治疗,若 EGFR 为野生型,则检测 EML4-ALK 融合基因,对该基因阳性者,可彻底排除 TKI 治疗,ALK 抑制剂则显示出很好的治疗前景。ALK 抑制剂的出现为 EML4-ALK 融合基因阳性的患者带来了希望。

参考文献(References)

- [1] Shibuya K, Mathers CD, Boschi-Pinto C, et al. Global and regional estimates of cancer mortality and incidence by site: II. Results for the global burden of disease 2000[J]. BMC Cancer, 2002, 2:37
- [2] Soda M, Choi YL, Enomote M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer[J]. Nature, 2007, 448(7153):561-566
- [3] Kawk EL, Bang Y. Anaplastic Lymphoma Kinase Inhibition in Non-Small-Cell Lung Cancer [J]. N Engl J Med, 2010, 363 (18): 1693-1703
- [4] Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK[J]. Clin Oncol, 2009,27(26):4247-4253
- [5] Takeuchi K, Choi YL, Soda M, et al. Multiplex reverse transcription-PCR screening for EML4-ALK fusion transcripts[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(20):6618-6624
- [6] Shiota M, Fujimoto J, Semba T, et al. 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(6): 1567-1574
- [7] Morris SW, Naeve C, Mathew P, et al. ALK, the chromosome 2 gene locus altered by the t (2;5) in non-Hodgkin's lymphoma, encodes a novel neural receptor tyrosine kinase that is highly related to leukocyte tyrosine kinase (LTK)[J]. Oncology, 1997, 14(18): 2175-2188
- [8] Koivunen JP, Mermel C, Zejnullahu K, et al. EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer [J]. Clin Cancer Res, 2008,14(13):4275
- [9] Fukuyoshi Y, Inoue H, Kita Y, et al. EML4-ALK fusion transcript is not found in gastrointestinal and breast cancers[J]. Br J Cancer, 2008, 98(9): 1536-1539
- [10] Perner S, Wagner P L, Demichelis F, et al. EML4-ALK fusion lung cancer: a rare acquired event[J]. Neoplasia, 2008,10(3): 298-302
- [11] Kelleher Fc, McDermott R. The emerging pathogenic and therapeutic importance of the anaplastic lymphoma kinase gene [J]. Eur J Cancer, 2010,46(13):2357
- [12] 杨衿记,张旭超,江本元,等.EML4-ALK 融合基因为靶点的晚期 NSCLC 个体化治疗研究进展[J]癌症进展,2010,8(6):538-545
Yang Jin-ji, Zhang Xu-chao, Jiang Ben-yuan, et al. EML4-ALK fusion gene as a target for individual treatment of advanced NSCLC Research[J].Oncology Progress, 2010,8(6):538-545
- [13] Mino-Kenudson M, Chirieac LR, Law K, et al. A Novel, Highly Sensitive Antibody Allows for the Routine Detection of ALK-rearranged Lung Adenocarcinomas by Standard Immunohistochemistry [J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(5): 1561-1571
- [14] 王慧娟,袁静,马志勇.非小细胞肺癌治疗的新靶点:EML4-ALK 融合基因[J]中国肺癌杂志,2011,14(6):538-542
Wang Hui-juan, Yuan Jing, Ma Ma Zhi-yong. A New Target in Non-small Cell Lung Cancer: EML4-ALK Fusion Gene [J]. China Lung Cancer, 2011,14(6):538-542

(下转第 4991 页)

- frequently[J]. *Clinical Endocrinology*, 2003, 58(2): 59-64
- [20] Baldeweg SE, Pollock JR, Powell M, et al. A spectrum of behaviour in silent corticotroph pituitary adenomas[J]. *British Journal of Neurosurgery*, 2005, 19(4): 38-42
- [21] Dorota D, Ashley B, Grossman MD. The pathophysiology of pituitary adenomas [J]. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2009, 23(5):525-541
- [22] Casanueva FF, Molitch ME, Schlechte JA, et al. Guidelines of the Pituitary Society for the diagnosis and management of prolactinomas[J]. *Clinical Endocrinology*, 2006,65(1): 265-273
- [23] Karavitaki N, Thanabalasingham G, Shore HC, et al. Do the limits of serum prolactin in disconnection hyperprolactinaemia need re-definition? A study of 226 patients with histologically verified non-functioning pituitary macroadenoma [J]. *Clinical Endocrinology*, 2006,65(1): 524-529
- [24] Findling JW, Raff H. Cushing's syndrome: important issues in diagnosis and management[J]. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2006, 91(2): 3746-3753
- [25] Carroll T, Raff H, Findling JW. Late-night salivary cortisol measurement in the diagnosis of Cushing's syndrome[J]. *Nature Clinical Practice. Endocrinology & Metabolism*, 2008, 4(1): 344-350
- [26] Reincke M, Allolio B, Saeger W, et al. The 'incidentaloma' of the pituitary gland. Is neurosurgery required?[J]. *The Journal of the American Medical Association*, 1990, 263: 2772-2776
- [27] Yuen KCJ, Cook DM, Sahasranam P, et al. Prevalence of GH and other anterior pituitary hormone deficiencies in adults with nonsecreting pituitary microadenomas and normal serum IGF-1 levels[J]. *Clinical Endocrinology*, 2008, 69(1): 292-298
- [28] Molitch ME, Gilliam MP. Lymphocytic hypophysitis [J]. *Hormone Research*, 2007,68(S5): 145-150
- [29] Honegger J, Zimmermann S, Psaras T, et al. Growth modeling of non-functioning pituitary adenomas in patients referred for surgery[J]. *European Journal of Endocrinology*, 2008, 158(1): 287-294
- [30] Molitch ME. Nonfunctioning pituitary tumors and pituitary incidentalomas[J]. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 2008, 37(1): 151-171
- [31] Daly AF, Burlacu MC, Livadariu E, et al. The epidemiology and management of pituitary incidentalomas[J]. *Hormone Research*, 2007, 68(suppl. 5): 195-198

(上接第 4994 页)

- [15] Zhang X, Zhang S, Yang X, 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
- [16] Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, et al. EML4-ALK fusion is linked to histological characteristics in a subset of lungcancers [J]. *J Thorac Oncol*, 2008, 3(1): 13-17
- [17] Soda M, Takada S, Takeuchi K, et al. A mouse model for EML4-ALK positive lung cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(50): 19893-19897
- [18] Li YJ, Ye XF, Liu JF, et al. Evaluation of EML4-ALK fusion proteins in non-small cell lung cancer using small molecular inhibitors [J]. *Neoplasia*, 2011,13(1):1-11
- [19] Choi YL, Soda M, Yamashita Y, et al. EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors [J]. *N Engl J Med*, 2010, 363(18):1734-1739
- [20] Wong D W, Leung E L, So K K, et al. The EML4-ALK fusion gene is involved in various histologic types of lung cancers from nonsmokers with wild-type EGFR and KRAS [J]. *Cancer*, 2009, 115(8): 1723-1733