

肺癌中EML4-ALK融合基因的存在状态及生物学功能

杨统 综述 刘红雨 陈军 审校

【中图分类号】R734.2

EML4-ALK Fusion Gene in Lung Cancer and Its Biological Function

Tong YANG, Hongyu LIU, Jun CHEN

Tianjin Key Laboratory of Lung Cancer Metastasis and Tumor Microenvironment, Tianjin Lung Cancer Institute,
Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China

Corresponding author: Jun CHEN, E-mail: huntercj2004@yahoo.com

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (to Jun CHEN)(No. 81172233), the China-Sweden Cooperative Foundation (to Jun CHEN)(No.09ZCZDSF04000), (to Hongyu LIU)(No.09ZCZDSF03800), Tianjin Natural Science Foundation (to Jun CHEN) (No.09JCYBJC16200), Wujiaping Foundation (to Hongyu LIU)(No.3206720.10008), (to Yongwen LI)(No.320.6720.10007), (to Sen WEI)(No.320.6740.10008) and Ministry of Education New Century Talent Foundation (to Jun CHEN)(No.NCET-10-0956).

肺癌是当前世界上最常见的恶性肿瘤，主要包括小细胞肺癌（small cell lung cancer, SCLC）和非小细胞肺癌（non-small cell lung cancer, NSCLC）两类，而NSCLC约占肺癌总数的80%。尽管外科手术技术不断提高，化疗新药不断上市并进入临床应用，但肺癌患者的预后仍然很差，原因是大多数NSCLC患者确诊时已处于晚期，失去了手术治疗的机会。同时部分临床诊断为早期的肺癌患者，手术后发生复发转移。长期以来，化疗在晚期NSCLC的治疗中占据主要地位，1995年进行的meta分析显示，以铂类为基础的化疗相对于支持治疗可以提高患者存活率^[1]。20世纪90年代，第三代化疗药物有了较大进展，多西紫杉醇、紫杉醇、长春瑞滨、吉西他滨等药物应用于肺癌患者。然而，以铂类为基础的化疗方案在晚期（IIIb或IV）NSCLC患者中，缓解率（response rate, RR）为30%-40%，中位生存期仅为8个月-10个月^[2]。如何更好而有效地改善NSCLC患者的生存率和生存时间，提高治疗效果，成为临床和科研工作者的一个研究方向和

目标。

近年来，随着分子生物学技术的发展，产生了一些针对细胞特定分子的分子靶向治疗药物，这些药物针对性强，能特异性地杀伤肿瘤细胞。其中，针对表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂（epidermal growth factor receptor-tyrosine kinases inhibitors, EGFR-TKI）的分子靶向治疗受到了极大的关注。目前，有两种EGFR-TKI（厄洛替尼和吉非替尼）成功在中国上市，其药物特点是口服、高效、高特异性，病人耐受性好，无骨髓抑制和神经毒性，能明显延长敏感患者生存期^[3]，改善患者生活质量。但是，相关的临床研究^[4,5]结果显示吉非替尼对东方人NSCLC的有效率为25%-35%，对西方人的有效率仅为8%-15%，临床研究表明腺癌、女性、非吸烟、亚裔的NSCLC患者获益明显。

2010年，日本学者^[6]研究了具有EGFR 19外显子缺失突变和21外显子L858点突变的病例，比较单纯使用吉非替尼组与单纯使用顺铂加紫杉醇组的生存时间后发现，

本研究受国家自然科学基金（No.81172233），天津市科技支撑计划中瑞合作重大项目（No.09ZCZDSF04000和No.09ZCZDSF03800），天津市自然科学基金（No.09JCYBJC16200），吴阶平医学基金（No.3206720.10008，No.320.6720.10007和No.320.6740.10008）和教育部新世纪人才基金（No.NCET-10-0956）的资助

作者单位：300052 天津，天津医科大学总医院，天津市肺癌研究所，天津市肺癌转移与肿瘤微环境实验室（通讯作者：陈军，E-mail: huntercj2004@yahoo.com）

在具有突变的患者中，使用吉非替尼者的生存时间较单纯使用化疗药长（9.2个月 vs 6.3个月），而在不具有EGFR外显子突变的非吸烟腺癌患者中，单纯使用吉非替尼者的生存时间也较单纯使用铂类化疗药物的时间延长。因此，在亚洲的非吸烟腺癌患者中，使用EGFR-TKI靶向药物吉非替尼的疗效优于传统的化疗，这无疑是肺癌治疗史上的一个巨大的进步。

然而，2007年，日本学者在腺癌患者中发现了一个亚群，这部分患者具有人类棘皮动物微管相关蛋白样4（echinoderm microtubule-associated protein-like 4, EML4）和人类间变性淋巴瘤激酶（anaplastic lymphoma kinase, ALK）重排形成的融合基因，即EML4-ALK融合基因，对EGFR-TKI治疗和传统的化疗不敏感，而可能对ALK抑制剂敏感^[7]。后来的研究发现，具有EML4-ALK重排的患者有其独特的临床病理生理特征，提示其治疗有别于一般的腺癌，本文就EML4-ALK融合基因的发现及研究现状作一综述。

1 EML4-ALK融合基因的发现

2007年日本学者Soda等^[7]在一名62岁男性吸烟肺癌患者手术标本中扩增出一个由3,926个碱基组成的cDNA片段，编码一个由1,059个氨基酸组成的蛋白质，该蛋白的氨基端（残基1-496）是EML4编码蛋白的一部分，而羧基端（残基497-1,059）则由ALK编码蛋白的一部分构成，提示这个cDNA片段由是EML4和ALK的融合形成。此病例的EGFR和KRAS基因均为野生型。如图1所示，该融合基因定位于2号染色体的短臂上（2p21和2p23），其5'端为EML4的片段，3'端为ALK的片段，由倒置后的EML4基因片段与残余的ALK片段连接。该融合基因拥有EML4基因中的basic区域、疏水的棘皮动物微管相关蛋白区（hydrophobic echinoderm microtubule-associated protein, HELP）以及部分WD重复区（后两部分在部分亚型中缺失）和ALK基因中的Kinase功能区；此外在75个病例中发现了另外5例也具有EML4-ALK融合基因，因此，提示具有EML4-ALK融合基因的患者可能为NSCLC的一个特殊群体。

目前，已至少发现了14种EML4-ALK的变异体。这些变异体均有功能，均为EML4的不同外显子与ALK的20外显子相融合。变种1（V1），为EML4的第13外显子与ALK的第20外显子相连；变种2（V2），为EML4的第20外显子与ALK的第20外显子相连^[7]；变种3（V3），有两

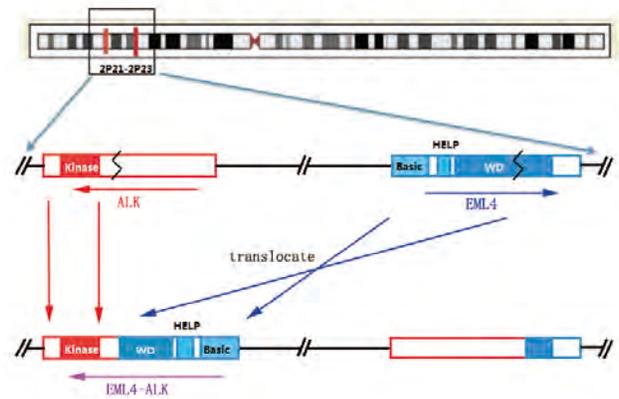


图1 EML4-ALK融合基因形成示意图

Fig 1 Schematic representation of fusion junctions and flanking sequences of the EML4-ALK fusion gene. Fusion of the N-terminal portion of EML4 (comprising the basic region, the HELP domain and part of the WD-repeat region) to the intracellular region of ALK (containing the tyrosine kinase domain).

个亚变种（V3a/b），V3a为EML4的第6外显子与ALK的第20外显子相连，而V3b为EML4的第6外显子加上一个33 bp的小片段再与ALK的第20外显子相连^[8]；变种4（V4），为EML4的第14外显子加上一个11 bp的小片段再与前面缺失49 bp的ALK的第20外显子相连；变种5（V5），有两个亚变种（V5a/b），V5a为EML4的第2外显子与ALK的第20外显子相连，而V3b为EML4的第2外显子加上一个117 bp的小片段再与ALK的第20外显子相连^[9]；变种6（V6），为EML4的第13外显子加上一个49 bp的小片段再与ALK的第20外显子相连；变种7（V7），为EML4的第14外显子与前面缺失12 bp的ALK的第20外显子相连；变种8（“V4”），为EML4的第15外显子缺失了后面19 bp再与前面缺失20 bp的ALK的第20外显子相连；变种9（“V5”），为EML4的第18外显子与ALK的第20外显子相连^[10]。

2 EML4-ALK融合基因阳性患者的病理生理学特征

几乎所有研究均显示EML4-ALK融合基因主要存在于NSCLC中，其出现频率为5%-10%。研究显示EML4-ALK融合基因阳性患者多为不吸烟或少吸烟的腺癌患者，多伴随印戒细胞样改变，与EGFR突变相比，EML4-ALK融合基因多出现于男性，较EGFR突变者年轻，在亚洲人群中出现的比例较大；与EGFR突变和KRAS突变多不会同时出现，即具有EML4-ALK融合基因的患者多为EGFR和KRAS野生型，而EGFR和/或KRAS突变的患者多不

具有EML4-ALK融合基因^[11,12]。EGFR-ALK患者对EGFR-TKI治疗不敏感,表现为对TKI治疗的原发性耐药;比较EML4-ALK阳性组与阴性组后发现两组患者对铂类药物的治疗效果无明显差异,总的生存时间也无统计学差异^[13]。

3 EML4-ALK融合基因可能的生物学功能

EML4-ALK融合基因的发现者Soda等将携带EML4-ALK基因的质粒转染小鼠胚胎成纤维细胞3T3,而使后者获得了致瘤性,接种于裸鼠皮下后成瘤。而在携带EML4-ALK的所有转基因小鼠的肺组织中,自发性形成数百个腺癌病灶。这种转基因的小鼠在口服ALK激酶的抑制剂后,肿瘤均趋于消失;而在静脉注射转染EML4-ALK的3T3细胞后,小鼠均由于呼吸衰竭而死亡,而使用ALK激酶抑制剂后,能明显延长这些小鼠的生存时间。使用特异的siRNA沉默EML4-ALK融合基因后,能抑制相关肿瘤细胞的生长^[14]。这些均提示EML4-ALK基因在肺癌的形成过程中起着重要的作用。

研究者研究了EML4-ALK融合基因的各个功能区,其中,EML4基因片段中的basic区及ALK基因的kinase区在各个亚型中均包含。后者为ALK基因的膜内催化区域,其激活后通过相关信号通路与细胞增殖、存活、迁移密切相关。EML4基因片段扮演着能使该融合基因产物蛋白二聚化的功能,因为ALK基因的膜内催化区域能在形成二聚体时激活,其异常激活导致细胞的癌变。Soda等^[7]构建缺失EML4 Basic区、HELP区、WD区质粒的3T3细胞,接种裸鼠后发现缺失EML4 Basic区完全不能成瘤,而缺失HELP区和WD区均能成瘤,但瘤体较小,提示各功能区在肺癌的转化过程中均发挥作用,但Basic区的作用可能最为重要。

对于EML4-ALK融合基因信号通路的研究,与其它ALK基因重排的融合基因一样,都是对ALK基因信号通路的研究,都是通过激活ALK基因的膜内催化区域达到细胞癌变的效果。目前研究发现其与STAT3、AKT/PI3K及RAS/ERK三条信号通路有关系。转录因子C/EBP β (CCAAT/enhancer binding protein beta)具有提高细胞增殖和生存的能力。ALK基因通过STAT3信号通路提高C/EBP β 的mRNA及蛋白水平,还通过ERK1/2磷酸化C/EBP β 的第235位苏氨酸激活C/EBP β 蛋白^[15]。研究^[16]发现ALK也可以通过SHH/GLI1信号通路发挥作用,且可激活AKT/PI3K信号通路稳定GLI1蛋白。

4 EML4-ALK融合基因的检测方法

自从该融合基因发现以来,为寻找更简便和更准确的方法,研究人员做了各方面大量的研究。目前最常用的方法是反转录PCR(RT-PCR)。RT-PCR是一种很灵敏的技术,可以检测很低拷贝数的RNA。RT-PCR广泛应用于遗传病的诊断,并且可以用于定量监测某种RNA的含量。利用手术切除标本或其他标本,提取总RNA后进行RT-PCR,对PCR产物进行电泳以确定是否含有EML4-ALK融合基因。通过对各种不同亚型进行专门引物的设计,可以分辨出各种不同亚型的EML4-ALK融合基因。

荧光原位杂交技术(fluorescent in situ hybridization, FISH)也是常用的方法。FISH是利用荧光标记的特异核酸探针与细胞内相应的靶DNA分子或RNA分子杂交,通过在荧光显微镜或共聚焦激光扫描镜下观察荧光信号,来确定与特异探针杂交后被染色的细胞或细胞器的形态和分布,或者是结合了荧光探针的DNA区域或RNA分子在染色体或其它细胞器中的定位。通过对EML4基因及ALK基因进行荧光标记,在荧光显微镜下查看这两种基因的位置关系判断是否有染色体易位,以确定是否有EML4-ALK融合基因^[17]。

Western blot的方法也是检测EML4-ALK融合基因的方法之一。Western blot采用的是聚丙烯酰胺凝胶电泳,经过PAGE分离的蛋白质样品,转移到固相载体(例如硝酸纤维素膜NC膜)上,固相载体以非共价键形式吸附蛋白质,且能保持电泳分离的多肽类型及其生物学活性不变。以固相载体上的蛋白质或多肽作为抗原,与对应的抗体起免疫反应,再与酶或同位素标记的第二抗体起反应,经过底物显色或放射自显影以检测电泳分离的特异性目的基因表达的蛋白成分。Western blot主要用来确定EML4-ALK融合基因是否表达及表达情况。

除了以上几种常用的方法外,还有其它各种常规或新的方法。Zhang等^[18]使用了一种RACE-coupled PCR的方法,也很好检测出了EML4-ALK融合基因阳性的样本。Takeuchi等^[19]发现了一种新的检测ALK相关融合基因的免疫组化方法-iAEP(antibody-enhanced polymer)。该法将ALK蛋白的不同区域分别做出相应的特异性抗体,然后用这些抗体特异检测标本中ALK蛋白不同区域的表达情况。若5'端的区域与3'端的区域表达差异较大,则说明有ALK融合基因。表1列出了文献^[7,9,11,13,14,18-25]报道的检测EML4-ALK的方法及阳性率。

表1 文献所用检测EML4-ALK的方法及阳性率

Tab 1 EML4-ALK fusion gene previously reported by the literatures in lung cancer

Author	EML4-ALK (% <i>, n/N</i>)	Area	Method
Soda ^[7]	6.67% (5/75)	Japan	RT-PCR
Takeuchi ^[9]	4.35% (11/253)	Japan	RT-PCR
Jokoji ^[11]	3.15% (8/254)	Japan	FISH
Shaw ^[13]	13.48% (19/141)	World	FISH
Lin ^[14]	11.32% (12/106)	US	FISH, exon array, RT-PCR
Zhang ^[18]	11.65% (12/103)	China	RACE-coupled PCR
Takeuchi ^[19]	6.15% (8/130)	Japan	iAEP, RT-PCR
Fukuyoshi ^[20]	0.96% (1/104)	Japan	RT-PCR
Koivunen ^[21]	2.62% (8/305)	US (138), Korea (167)	RT-PCR
Inamura ^[22]	3.03% (11/363)	Japan	RT-PCR
Martelli ^[23]	7.50% (9/120)	Italy, Spain	RT-PCR
Takahashi ^[24]	1.60% (5/313)	Japan	RT-PCR
Wong ^[25]	4.89% (13/266)	China	RT-PCR

5 展望

目前在NSCLC中EML4-ALK融合基因的亚型已经有14种。Lin等^[14]发现一种EML4的21外显子与ALK的20外显子融合而成的新亚型，但仅在大肠癌中出现，并未在肺癌中检测到，或许更敏感的检测方法或更大样本量的检测能发现更多新的亚型。

现在对EML4-ALK融合基因在信号转导通路方面的研究还刚开始，相信这部分的研究将是以后的重点。如果信号通路明确的话，可以设计相应的药物，这将对治疗有极大的帮助。实验中通过对EML4-ALK融合基因阳性的细胞系及EML4-ALK融合基因阳性的小鼠进行一些尝试性的治疗，观察细胞系的生长情况及小鼠肿瘤的生长情况，发现其对吉非替尼耐药，对铂类药物低反应，但ALK抑制剂对其有效，能明显抑制肿瘤的生长^[13,26]。

由于目前在临床上相关特征并无超大样本的统计资料，对一些特征还是比较难以把握，并且一些更常规高效的检测方法有待研究，EML4-ALK融合基因检测真正应用于临床还有一定的距离。

综上所述，EML4-ALK融合基因存在于NSCLC中，很有可能成为在EGFR突变与KRAS突变之外的另一个重要的分子靶点，进一步研究可能会展现出与NSCLC的发生、发展、治疗及评估等方面相关的新领域。

参考文献

1 Souquet PJ, Chauvin F, Boissel JP, *et al.* Meta-analysis of randomised trials of systemic chemotherapy versus supportive treatment in non-resectable non-

small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 1995, 12 Suppl 1: 147-154.

2 Schiller JH, Harrington D, Belani CP, *et al.* Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*, 2002, 346(2): 92-98.

3 Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, *et al.* Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med*, 2009, 361(10): 947-957.

4 Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, *et al.* Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial) [corrected]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(12): 2237-2246.

5 Herbst RS. Dose-comparative monotherapy trials of ZD1839 in previously treated non-small cell lung cancer patients. *Semin Oncol*, 2003, 30(1 Suppl 1): 30-38.

6 Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, *et al.* Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 2010, 11(2): 121-128.

7 Soda M, Choi YL, Enomoto M, *et al.* Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*, 2007, 448(7153): 561-566.

8 Choi YL, Takeuchi K, Soda M, *et al.* Identification of novel isoforms of the EML4-ALK transforming gene in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, 2008, 68(13): 4971-4976.

9 Takeuchi K, Choi YL, Soda M, *et al.* Multiplex reverse transcription-PCR screening for EML4-ALK fusion transcripts. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(20): 6618-6624.

10 Horn L, Pao W. EML4-ALK: honing in on a new target in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 2009, 27(26): 4232-4235.

11 Jokoji R, Yamasaki T, Minami S, *et al.* Combination of morphological feature analysis and immunohistochemistry is useful for screening of EML4-ALK-positive lung adenocarcinoma. *J Clin Pathol*, 2010, 63(12): 1066-1070.

- 12 Sabbatini P, Korenchuk S, Rowand JL, *et al.* GSK1838705A inhibits the insulin-like growth factor-1 receptor and anaplastic lymphoma kinase and shows antitumor activity in experimental models of human cancers. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8(10): 2811-2820.
- 13 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.
- 14 Lin E, Li L, Guan Y, *et al.* Exon array profiling detects EML4-ALK fusion in breast, colorectal, and non-small cell lung cancers. *Mol Cancer Res*, 2009, 7(9): 1466-1476.
- 15 Anastasov N, Bonzheim I, Rudelius M, *et al.* C/EBPbeta expression in ALK-positive anaplastic large cell lymphomas is required for cell proliferation and is induced by the STAT3 signaling pathway. *Haematologica*, 2010, 95(5): 760-767.
- 16 Singh RR, Cho-Vega JH, Davuluri Y, *et al.* Sonic hedgehog signaling pathway is activated in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Cancer Res*, 2009, 69(6): 2550-2558.
- 17 Perner S, Wagner PL, Demichelis F, *et al.* EML4-ALK fusion lung cancer: a rare acquired event. *Neoplasia*, 2008, 10(3): 298-302.
- 18 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. *Mol Cancer*, 2010, 9: 188.
- 19 Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, *et al.* KIF5B-ALK, a novel fusion oncokine identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(9): 3143-3149.
- 20 Fukuyoshi Y, Inoue H, Kita Y, *et al.* EML4-ALK fusion transcript is not found in gastrointestinal and breast cancers. *Br J Cancer*, 2008, 98(9): 1536-1539.
- 21 Koivunen JP, Mermel C, Zejnullahu K, *et al.* EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(13): 4275-4283.
- 22 Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, *et al.* EML4-ALK lung cancers are characterized by rare other mutations, a TTF-1 cell lineage, an acinar histology, and young onset. *Mod Pathol*, 2009, 22(4): 508-515.
- 23 Martelli MP, Sozzi G, Hernandez L, *et al.* EML4-ALK rearrangement in non-small cell lung cancer and non-tumor lung tissues. *Am J Pathol*, 2009, 174(2): 661-670.
- 24 Takahashi T, Sonobe M, Kobayashi M, *et al.* Clinicopathologic features of non-small-cell lung cancer with EML4-ALK fusion gene. *Ann Surg Oncol*, 2010, 17(3): 889-897.
- 25 Wong DW, Leung EL, So KK, *et al.* The EML4-ALK fusion gene is involved in various histologic types of lung cancers from nonsmokers with wild-type EGFR and KRAS. *Cancer*, 2009, 115(8): 1723-1733.
- 26 Brambilla E. Lung cancer: multidisciplinary approach for management: cell and molecular biology assembly contribution to the celebration of 20 years of the ERS. *Eur Respir J*, 2010, 35(4): 717-720.

(收稿: 2011-10-24 修回: 2011-11-11)

(本文编辑 孙丹)

· 消息 ·

第五届世界癌症大会会议通知

癌症是一类严重危害人类健康的疾病,一种让人谈之色变的顽疾。为了促进国际癌症学术、企业界之间的交流,第五届世界癌症大会在前四届癌症大会成功举办的基础上,将于2012年5月18日-20日在北京国际会议中心举行。

本届会议将邀请全球癌症研究领域最顶级最著名的专家、各国科学院院士、500强企业高管等做报告。并邀请来自世界上40多个国家的癌症领域科学家、研究员、临床工作者、课题组长等出席大会。大会在组织过程中得到了各国癌症研究机构、癌症基金会、抗癌联盟以及国际主流媒体的大力支持和高度评价。

大会交流内容涉及癌症研究突破和技术创新、烟草控制和癌症、抗癌药物的发现、专业的网络程序、临床肿瘤学和医疗实践、癌症预防,流行病学和公共健康、商务网络会议、癌症领域领袖论坛、青年科学家研究论坛等九大板块的百余个议题。

会议时间: 2012年5月18日-20日

会议地点: 中国北京国际会议中心(北京市朝阳区北四环中路8号)