

and transcriptional up-regulation in non-small cell lung carcinomas. *Hum Pathol*, 2009, 40(8):1152-1158.

- [9] Camidge DR, Kono SA, Flacco A, et al. Optimizing the detection of lung cancer patients harboring anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene rearrangements potentially suitable for ALK inhibitor treatment. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(22):5581-5590.
- [10] Camidge DR, Theodoro M, Maxson DA, et al. Correlations between the percentage of tumor cells showing an ALK (anaplastic lymphoma kinase) gene rearrangement, ALK signal copy number, and response to crizotinib therapy in ALK fluorescence in situ hybridization-positive nonsmall cell lung cancer. *Cancer*, 2012, 118(18):4486-4494.

- [11] McLeer-Florin A, Moro-Sibilot D, Melis A, et al. Dual IHC and FISH testing for alk gene rearrangement in lung adenocarcinomas in a routine practice: a French study. *J Thorac Oncol*, 2012, 7(2):348-354.
- [12] Yoshida A, Tsuta K, Nitta H, et al. Bright-field dual-color chromogenic in situ hybridization for diagnosing echinoderm microtubule-associated protein-like 4-anaplastic lymphoma kinase-positive lung adenocarcinomas. *J Thorac Oncol*, 2011, 6(10):1677-1686.

(收稿日期:2013-05-27)

(本文编辑:齐文安)

## 聚合酶链反应技术在非小细胞肺癌 EML4-ALK 融合基因检测中的应用

张杰

棘皮动物微管相关样蛋白 4 (echinoderm microtubule associated protein-like 4, EML4) 与间变性淋巴瘤激酶 (anaplastic lymphoma kinase, ALK) 融合基因是非小细胞肺癌 (NSCLC) 中继发表皮生长因子受体 (EGFR) 突变、KRAS 突变后的又一特异性肿瘤驱动基因, 近期, 针对 EML4-ALK 为靶点的克唑替尼 (crizotinib) 在治疗晚期 NSCLC 中已取得了令人瞩目的疗效, 因此使用准确、可靠并且易于临床开展的 EML4-ALK 融合基因检测方法是决定患者能否应用克唑替尼治疗的先决条件。2013 年 3 月, 国产的基于逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 技术的 EML4-ALK 检测试剂盒获得中国食品药品监督管理局 (CFDA) 批准上市。本文主要介绍 RT-PCR 技术在 EML4-ALK 融合基因筛查中的应用。

### 一、EML4-ALK 融合基因的结构特点

EML4 基因由 N 端 Basic 区、HELP 域和 WD 重复区构成, 这 3 个区域均与 EML4-ALK 的肿瘤生成潜能有关, 其中 Basic 区在 EML4-ALK 二聚体化过程中扮演重要角色<sup>[1]</sup>。ALK 基因编码的受体酪氨酸激酶, 包含胞外配体结合区、疏水跨膜区及胞内酪氨酸激酶区<sup>[2]</sup>。二者分别位于人类第 2 号染色体的 p21 和 p23 带, 相隔约 12 Mb 距离, 这 2 个基因片段的倒位融合使 EML4 的 N 端与 ALK 激酶区发生融合, 表达 EML4-ALK 融合蛋白。体外克隆性转化试验和在体内基因重组基础上的肺部选择性表达试验证实, 不同的 EML4-ALK 融合类型均有恶性转化和致瘤能力<sup>[3]</sup>。在 NSCLC 中已发现多个基因可以与 ALK 发生融合, EML4-ALK 是其中最主要的融合类型。EML4 基因在不同的外显子断裂后插入 ALK 基因的第 19、20 号外显子之间, 形成不同类型的 EML4-ALK 融合基因。目前已发现 20 余种 EML4-ALK

融合类型, 大多与 ALK 基因的第 20 号外显子相融合, 且以 V1、V2 和 V3a/V3b 为主, 这 4 型占有所有 EML4-ALK 融合类型的 85% 以上<sup>[4]</sup>。

### 二、ALK 融合基因阳性患者的临床病理特征

多项回顾性研究显示, ALK 融合阳性患者在 NSCLC 中的发生比例为 3% ~ 7%, 无明显的种族和性别差异<sup>[5]</sup>。NSCLC 中 EML4-ALK 融合阳性患者具有独特的临床病理特征, 主要包括: (1) 平均年龄及中位年龄均较融合阴性患者低<sup>[6]</sup>; (2) 多为不吸烟或轻度吸烟者<sup>[7]</sup>; (3) 绝大多数 EML4-ALK 融合与 EGFR 及 KRAS 突变相排斥<sup>[8]</sup>; (4) 对于 EML4-ALK 融合阳性患者的性别差异仍有争议, 大多数研究者认为男女发生率无差异; (5) 大部分 (82%) EML4-ALK 融合阳性的肺腺癌是非伏壁生长型, 多呈实体状或含有筛状结构。瘤细胞内含有大量黏液, 而细胞核往往较小, 缺乏多态性, 71% 肺印戒细胞癌有 EML4-ALK 融合基因<sup>[9]</sup>。目前国内外已有多项研究使用 RT-PCR 技术对 NSCLC 中的多种类型标本进行 EML4-ALK 融合基因检测<sup>[1, 10-16]</sup>。

### 三、RT-PCR 技术在检测 EML4-ALK 融合基因中的应用

目前利用 RT-PCR 技术检测 EML4-ALK 基因融合的方法主要分为直接法和间接法。直接法是直接以 EML4-ALK mRNA 为检测对象, 通过在融合点两侧设计特异性引物对 EML4-ALK 融合基因进行检测的一种方法, 目前已有多项研究利用该方法对 NSCLC 患者甲醛固定石蜡包埋 (FFPE) 样本或新鲜冷冻样本进行 EML4-ALK 融合基因检测, 样本类型不但包括临床常见的肿瘤手术样本, 也可以是穿刺样本、支气管冲洗液、痰液和胸腔积液样本, 结合多重 RT-PCR 技术, 该方法已用于 NSCLC 患者 EML4-ALK 融合基因的大规模筛查检测。间接法是利用 EML4 与 ALK 融合后使 ALK 3' 端激酶区 mRNA 表达量明显高于其 5' 端表达量, 因此可以通过即时荧光 RT-PCR 方法检测 ALK 断裂点两侧 mRNA 表达量

的差异来预测样本中是否存在 ALK 基因融合。Wang 等<sup>[17]</sup>应用即时荧光 RT-PCR 方法检测 654 例 NSCLC 冷冻样本,发现 40 例样本 ALK mRNA 5' 和 3' 端表达量存在差异,且 40 例样本采用荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 方法检测均为阳性,从而证明间接法预测 ALK 融合的准确性;该研究利用间接法同时鉴定出 6 种新的 ALK 融合类型,包括 KIF5B-ALK 和 5 种 EML4-ALK 融合类型。2013 年, Lira 等<sup>[18]</sup>将 RT-PCR 和 NanoString nCounter 技术相结合,对 33 例 ALK 阴性样本和 34 例 ALK 阳性样本进行 ALK 5' 和 3' 端 mRNA 表达差异检测以预测 ALK 基因状态,并与 FISH 和免疫组织化学方法进行比较,结果发现 3 种方法之间的检测结果高度一致。

#### 四、RT-PCR 技术检测 EML4-ALK 融合基因应用前景

检测 EML4-ALK 融合基因有多种方法,除 RT-PCR 方法外,常见的还有 FISH 和免疫组织化学。2012 年, Murakami 等<sup>[19]</sup>讨论了 RT-PCR、FISH、免疫组织化学方法检测 EML4-ALK 融合基因的优缺点。RT-PCR 是检测染色体易位较直接的方法,快速灵敏,但需要有高质量的 RNA 且只能对 EML4-ALK 已知的断裂融合类型进行检测,检测范围有一定的局限性。

FISH 技术是目前检测 EML4-ALK 融合基因的常用方法,可以运用探针诊断 ALK 重排,相对于 RT-PCR 技术,该方法不仅可以直观地观察 EML4-ALK 基因断裂重排的所有类型,还可以检测到 ALK 与其他基因之间的融合改变,如 NPM-ALK、TPM3-ALK 等。但 FISH 技术检测成本高、周期长,尤其是检测活检样本时,不易判读,与 RT-PCR、免疫组织化学的检测结果存在差异。克唑替尼 I 期临床试验采用 FISH 方法筛选 ALK 阳性病例,患者对药物的客观反应率为 57%。进一步分析发现,如果以免疫组织化学或 RT-PCR 作为选择标准,药物的客观反应率可以达到 82%<sup>[20]</sup>。

免疫组织化学是病理诊断所采用的常规检测方法,具有检测成本低、操作简便、能快速鉴别正常组织和病理组织的细胞和组织结构特征等优点,但该方法无法直接检测 EML4-ALK 融合基因,且具有一定的假阳性和假阴性。由于 EML4-ALK 融合蛋白在 NSCLC 中的表达量较低,开发高灵敏度和高特异性的抗体有较大难度。由于检测样本类型和数量、抗原修复技术、抗体检测和信号放大技术的不同,加上缺乏统一评分标准和可供参照的“金标准”,不同 ALK 抗体在不同的实验室和实验人员之间的评价结果存在较大差异<sup>[21]</sup>。

关于 3 种检测方法哪种更适合临床应用,目前尚无统一的结论。2012 年,美国国家参考实验室 Wallander 等<sup>[22]</sup>对 FISH、免疫组织化学和 RT-PCR 方法检测 EML4-ALK 进行对比,结果发现 FISH 与 RT-PCR 检测结果的一致性为 80%,而 FISH 与免疫组织化学检测结果的一致性为 67%,其中 FISH 检测结果判读在不同操作者之间的差别较大。2013 年, Ying 等<sup>[23]</sup>就 FISH 检测试剂、免疫组织化学 ALK 检测产品和 EML4-ALK 检测试剂(荧光 PCR 法)对 196 例肺腺癌样本 ALK 基因重排进行检测,结果显示 RT-PCR 产品与免疫组织

化学产品总体符合率为 97%;以 FISH 产品作为参照,RT-PCR 产品的灵敏度和特异性分别为 98% 和 95%,因此 3 种检测方法均适用于 NSCLC 患者 EML4-ALK 融合基因的检测。从检测方法的灵敏度来讲,RT-PCR 是目前检测 EML4-ALK 融合基因灵敏度最高的检测方法,但 RT-PCR 方法是以 RNA 为检测对象,由于 RNA 易受 RNase 的影响而降解,且由于临床常见石蜡包埋样本在甲醛处理过程中会造成核酸交联和片段化,因此 RT-PCR 方法对于样本 RNA 质量有较高的要求。随着 EGFR 突变 PCR 检测方法在中国的普及、FFPE 样品制备程序的标准化、肿瘤个体化诊断病理质控流程的完善以及 FFPE 样本 RNA 提取试剂盒的成熟,FFPE 样本中 RNA 质量对 RT-PCR 技术应用的影响越来越小<sup>[24]</sup>。

随着与靶向药物治疗相关的 EGFR、KRAS 和 BRAF 等分子诊断在我国众多医院广泛开展,以及随着更多靶向药物的陆续问世,必将有更多的药物靶点需要检测,而在临床上提供于病理诊断的标本多是微小的活检标本,如何更有效、合理地利用珍稀的肿瘤样本资源,是广大病理医师面临的难题。所幸的是,目前已有从同一组织样本同时分离纯化 DNA 和 RNA 的成熟技术,核酸一次性提取即可以满足 EGFR、KRAS、EML4-ALK 等多项检测要求。不仅如此,EGFR 等 DNA 检测和 EML4-ALK 等 RNA 检测还可以在同一台荧光 PCR 仪上使用相同的 PCR 扩增程序,在同一个时间内完成,不但可以缩短检测时间,减少病理医师的工作量,而且可以帮助医师在最短的时间内制定治疗方案,更好地服务患者。相对于免疫组织化学和 FISH 检测方法,RT-PCR 不但适用于 FFPE 样本,同时适用于支气管冲洗液、胸腔积液、外周血和痰液等样本类型,因此,随着肿瘤个体化诊疗领域的发展,RT-PCR 技术的重要性将会不断凸显。

#### 参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] 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). *Oncogene*, 1997, 14(18): 2175-2188.
- [3] Soda M, Inoue K, Inoue A, et al. A prospective PCR-based screening for the EML4-ALK oncogene in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(20): 5682-5689.
- [4] Ou SH, Bartlett CH, Mino-Kenudson M, et al. 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. *Oncologist*, 2012, 17(11): 1351-1375.
- [5] Sasaki T, Rodig SJ, Chirieac LR, et al. The biology and treatment of EML4-ALK non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer*, 2010, 46(10): 1773-1780.
- [6] 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.
- [7] Shaw AT, Solomon B. Targeting anaplastic lymphoma kinase in lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(8): 2081-2086.
- [8] 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.
- [9] Rodig SJ, Mino-Kenudson M, Dacic S, et al. Unique clinicopathologic features characterize ALK-rearranged lung adenocarcinoma in the western population. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(16):5216-5223.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] Sanders HR, Li HR, Bruey JM, et al. Exon scanning by reverse transcriptase-polymerase chain reaction for detection of known and novel EML4-ALK fusion variants in non-small cell lung cancer. *Cancer Genet*, 2011, 204(1):45-52.
- [13] Li T, Huang E, Desai S, et al. Update on Large-scale screening of ALK fusion oncogene transcripts in archival NSCLC tumor specimens using multiplexed RT-PCR assays. *J Clin Oncol*, 2012, 30(suppl):abstr 7594.
- [14] 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.
- [15] Ren S, Chen X, Kuang P, et al. Association of EGFR mutation or ALK rearrangement with expression of DNA repair and synthesis genes in never-smoker women with pulmonary adenocarcinoma. *Cancer*, 2012, 118(22):5588-5594.
- [16] Li Y, Li Y, Yang T, et al. Clinical significance of EML4-ALK fusion gene and association with EGFR and KRAS gene mutations in 208 Chinese patients with non-small cell lung cancer. *PLoS One*, 2013, 8(1):e52093.
- [17] Wang R, Pan Y, Li C, et al. The use of quantitative real-time reverse transcriptase PCR for 5' and 3' portions of ALK transcripts to detect ALK rearrangements in lung cancers. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(17):4725-4732.
- [18] Lira ME, Kim TM, Huang D, et al. Multiplexed gene expression and fusion transcript analysis to detect ALK fusions in lung cancer. *J Mol Diagn*, 2013, 15(1):51-61.
- [19] Murakami Y, Mitsudomi T, Yatabe Y. A screening method for the ALK fusion gene in NSCLC. *Front Oncol*, 2012, 2:24.
- [20] Thunnissen E, Bubendorf L, Dietel M, et al. EML4-ALK testing in non-small cell carcinomas of the lung; a review with recommendations. *Virchows Arch*, 2012, 461(3):245-257.
- [21] Anagnostou VK, Welsh AW, Giltane JM, et al. Analytic variability in immunohistochemistry biomarker studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2010, 19(4):982-991.
- [22] Wallander ML, Geiersbach KB, Tripp SR, et al. Comparison of reverse transcription-polymerase chain reaction, immunohistochemistry, and fluorescence in situ hybridization methodologies for detection of echinoderm microtubule-associated proteinlike 4-anaplastic lymphoma kinase fusion-positive non-small cell lung carcinoma: implications for optimal clinical testing. *Arch Pathol Lab Med*, 2012, 136(7):796-803.
- [23] Ying J, Guo L, Qiu T, et al. Diagnostic value of a novel fully automated immunochemistry assay for detection of ALK rearrangement in primary lung carcinoma. *Ann Oncol*, 2013, 24(10):2589-2593.
- [24] Dietel M, Jöhrens K, Laffert M, et al. Predictive molecular pathology and its role in targeted cancer therapy: a review focussing on clinical relevance. *Cancer Gene Ther*, 2013, 20(4):211-221.

(收稿日期:2013-05-27)

(本文编辑:齐文安)

## 免疫组织化学染色在诊断间变性淋巴瘤激酶阳性非小细胞肺癌中的应用

杜祥 周晓燕 吕宁 李向红 应建明 杨飞 李媛 孙宇 赵敏 周立新

在全球范围内,肺癌是发病率和病死率最高的恶性肿瘤,成为患者、医院以及社会的巨大负担,其中非小细胞肺癌(NSCLC)占了80%<sup>[1-2]</sup>。与小细胞肺癌相比,NSCLC对化疗的初始反应率更低。NSCLC的一个亚群存在棘皮动物微管结合蛋白(EML4)-间变性淋巴瘤激酶(ALK)异常融合基因,编码一种具有结构性激酶活性的细胞质嵌合蛋白,对小分子ALK激酶抑制剂克唑替尼(crizotinib)高度敏感。因此检测ALK的表达状态以便筛选出适合克唑替尼治疗的肺癌患

者,成为NSCLC的重要指标。本文简述了免疫组织化学染色在检测肺癌ALK基因异位中的应用。

### 一、ALK检测的常见方法

随着克唑替尼临床数据的发表,ALK的检测成为指导NSCLC患者个体化用药的明确指标。现有的ALK检测方法主要有荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)、逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)和免疫组织化学染色。

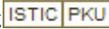
1. FISH: FISH是获得美国食品药品监督管理局批准用于检测NSCLC中ALK基因重排的伴随诊断方法<sup>[3]</sup>,相应的ALK FISH检测试剂盒已上市并应用于临床。虽然FISH是检测肺癌ALK融合基因敏感和特异的方法,但是作为手工染色方法,对操作人员所要求的技巧以及经验较高,其次,有限的探针片段会降低其敏感性;另外,对细胞数量的要求和

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2013.12.022

作者单位:200032 复旦大学附属肿瘤医院病理科 复旦大学上海医学院肿瘤学系(杜祥、周晓燕、杨飞、李媛);北京,中国医学科学院附属肿瘤医院病理科(吕宁、应建明);北京大学肿瘤医院病理科(李向红、孙宇、赵敏、周立新)

通信作者:杜祥, E-mail: dx2008cn@163.com

# 聚合酶链反应技术在非小细胞肺癌EML4-ALK融合基因检测中的应用

作者: [张杰](#),  
作者单位: [200030, 上海市胸科医院病理科](#)  
刊名: [中华病理学杂志](#)   
英文刊名: [Chinese Journal of Pathology](#)  
年, 卷(期): 2013, 42(12)

本文链接: [http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_zhblx201312021.aspx](http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zhblx201312021.aspx)