

[23] Heavner JE. Cardiac toxicity of local anesthetics in the intact isolated heart model: a review[J]. Reg Anesth Pain Med, 2002, 27(6): 545-555.

[24] American College of Medical Toxicology. ACMT position

statement; interim guidance for the use of lipid resuscitation therapy[J]. J Med Toxicol, 2011, 7(1): 81-82.

(收稿日期: 2012-09-08 修回日期: 2012-12-12)

· 综述 ·

EML4-ALK 融合基因在非小细胞肺癌中的个体化治疗进展

孙 兵 综述, 陈 力[△] 审校

(重庆医科大学附属永川医院胸心外科, 重庆永川 402160)

关键词: 非小细胞肺癌; 个体化治疗; EML4-ALK 融合基因; ALK 抑制剂

doi: 10. 3969/j. issn. 1671-8348. 2013. 13. 037

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)13-1542-03

肺癌是最常见的恶性肿瘤, 发病率及死亡率居癌症首位, 而 75%~80% 为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)。多数患者确诊时已进入晚期, 标准化疗方案疗效已达稳定水平, 且效果较差, 不良反应明显。近年来, 针对特定靶点的个体化治疗成为研究的热点。棘皮动物微管相关蛋白 4-间变型淋巴瘤激酶(echinoderm microtubule-associated protein-like 4-anaplastic lymphoma kinase, EML4-ALK) 融合基因是最新发现的一个肿瘤相关基因^[1], 3%~13% 的 NSCLC 患者含有此基因^[1-4], 为 NSCLC 个体化治疗提供了一个新的靶点, 已有多种针对该靶点的 ALK 抑制剂进入临床研究。本文将从 EML4-ALK 融合基因阳性 NSCLC 患者的分子生物学特征、临床特征、检测、临床研究及耐药机制进行综述。

1 EML4-ALK 融合基因的分子生物学特征

EML4 属于棘皮动物微管相关蛋白样蛋白家族, 由 N 末端碱基区, 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 3 部分构成^[5]。ALK 属于胰岛素受体家族, 该蛋白由膜外部分、跨膜区域及膜内催化区域组成^[6]。在 EML4-ALK 融合基因中, 与 ALK 的细胞内近胞膜部分发生融合的是 EML4 的部分 N 末端碱基、HELP 和部分 WD 重复区。

EML4-ALK 融合基因由 2 号染色体短臂易位引起, 常见于肺癌患者和肺癌细胞株。然而, EML4 有多种截断方式, 产生多种 EML4-ALK 变体, 所有这些变体都涉及 ALK 的细胞内酪氨酸激酶域。EML4 N 末端卷曲螺旋结构域对于 EML4-ALK 的致瘤活性是必需的, 使 EML4-ALK 融合蛋白形成二聚体, 从而诱发下游增殖信号^[1]。到目前为止, 已经发现了 11 种变体, 经 NIH-3T3 细胞或 Ba/F3 细胞验证, 大部分都具有致瘤性。最常见的变体是 E13; A20 和 E6a/b; A20, 即变体 1 和 3a/b, 在 NSCLC 患者中检出率分别为 33.0% 和 29.0%, NSCLC 细胞株 H3122 和 DFCI032 含有 E13; A20, 而 H2228 含有 E6a/b^[3]。

2 EML4-ALK 融合基因阳性 NSCLC 患者的临床特征

EML4-ALK 阳性 NSCLC 患者是 NSCLC 中的一个独特群体, 这一群体和表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR) 突变患者似乎有相似的临床特征。针对 EML4-ALK 治疗的 EGFR 野生型肺腺癌患者有更好的疗效^[2,7]。然而, 除极少数例外^[4,8], EML4-ALK 融合基因和 EGFR 突变是互为独立的分子事件^[1-3,9]。

2.1 吸烟史 2007 年, Soda 等^[1]首次在 1 例吸烟患者肿瘤组织中发现了 EML4-ALK 融合基因。然而, 越来越多的研究表

明这一基因在无/少量吸烟(每年吸烟小于或等于 10 包及戒烟小于或等于 1 年)的 NSCLC 患者中更常见^[1-4,6,10]。在 NSCLC 患者中, 无/少量吸烟有 9.4% 含有此基因, 而吸烟者只有 2.9% 含有此基因($P < 0.01$)^[9]。

2.2 形态学特点 有研究报道, EML4-ALK 融合基因阳性 NSCLC 患者主要为腺癌, 从高分化的腺泡癌到分泌黏蛋白的印戒细胞癌^[2,4,10]。其他组织学类型也有少数报道, 如鳞癌、黏液表皮样癌^[1,2]。在亚洲人群中, 以腺泡癌为主^[10], 而西方患者以印戒细胞癌为主^[2]。

2.3 性别与年龄 Shaw 等^[2]研究发现与 EGFR 突变组以及 EGFR、ALK 突变均阴性的野生组相比, EML4-ALK 阳性的患者更年轻, 多为男性, 在 48 例男性及 94 例女性 NSCLC 患者, 发现男性 11 例(22.9%), 女性 8 例(8.5%), 差异有统计学意义($P < 0.05$), 在性别和年龄上的差异还需要更多样本来验证。

2.4 种族 EML4-ALK 融合基因阳性患者在东西方人群或不同种族、国家间没有较大差异^[1-4,11]。Soda 等^[1]用逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 在 75 例日本 NSCLC 患者中检测到 5 例(6.7%) 表达 EML4-ALK。Jin 等^[11]在 167 例 NSCLC 中检测到 10 例(6.0%) 表达 EML4-ALK, 10 例中有 8 例(80.0%) 为 E13; A20, 2 例(20.0%) 为 E6; A20。121 例腺癌有 9 例(7.4%) 表达 EML4-ALK。Zhang 等^[4]用 RACE-PCR 发现非选择性 NSCLC 的 EML4-ALK 融合基因的发生率为 11.6% (12/103), 但肺腺癌患者可升至 16.1% (10/62), 从不吸烟者为 19.2% (10/52), EGFR 和 KRAS 均为野生型的肺腺癌患者高达 42.8% (9/21)。此研究也发现 1 例女性不吸烟腺癌患者同时存在 EGFR 突变和 EML4-ALK 融合基因, 提示这两个基因的关系尚需进一步研究。

3 EML4-ALK 融合基因的检测方法

3.1 RT-PCR RT-PCR 能快速诊断 NSCLC 患者 ALK 重组, 它的优势就是对任何一种涉及 ALK 重组的转录产物都有极高的敏感性。然而, 这种技术面临许多挑战, (1) EML4-ALK 融合基因至少有 11 种变体, 并且还存在于非 EML4 重组。因此, 必须要有针对这些融合基因的有效引物。(2) 大多数肿瘤组织标本均用甲醛固定石蜡包埋(formalin fixed paraffin embedded, FFPE) 技术保存, 从 FFPE 中提取出来的 RNA 大多已降解, 而新鲜的冷冻组织很难得到; 有研究在 4 例用荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH) 和免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC) 证实的阳性患者, 用 RT-

PCR 法检测却为阴性^[12]。(3)已有研究发现在非肿瘤组织, RT-PCR 也检测到了 EML4-ALK 融合基因,因此,该技术可产生假阳性^[13]。此外,在临床上,这种方法很难实施。

3.2 FISH FISH 能特异性检测 ALK 重组。其优势是探针是商业化的,用于 ALK 重组的间变性大细胞淋巴瘤(anaplastic large cell lymphomas, ALCL)和肺腺癌的诊断。然而,在实际操作上却存在困难:(1)ALK5,端探针较难杂交,识别 ALK 断裂信号也较难;(2)对于 FFPE 组织,在镜下较难分别其结构形态。FISH 检测肺腺癌 ALK 重组有很高的敏感性和特异性,但这不是绝对的。而且,与 PCR 相比,FISH 不能区分 EML4-ALK 融合基因的几种变体。在 2012 版 NCCN 中推荐采用 FISH 检测 NSCLC 中 EML4-ALK 融合基因。

3.3 IHC IHC 是分析 FFPE 组织的一个常规方法。这种方法的主要优势是能检测肿瘤特异性抗原的表达,可区分正常和病理组织的细胞形态结构。已经有几种针对人 ALK 蛋白的抗体,其中被 IHC 证实的抗体如今被广泛用于诊断 ALK 重组的 ALCL。然而,在全世界的临床试验中,IHC 用于诊断 ALK 重组的 ALCL,却不能检测 ALK 重组的肺腺癌。因为和 ALK 重组的 ALCL 比较,ALK 重组的 NSCLC 的 ALK 表达水平很低。Takeuchi 等^[10]改进方法后,增加了阳性数,然而,即使是这样,也不是所有的都为阳性。最近,Mino-Kenadson 等^[14]发现一种新型抗体(D5F30)大大提高了 IHC 的敏感性和特异性(分别为 100.0%和 99.0%)。在 22 例 ALK 重组的肺腺癌均能检出,而在 131 例 ALK 野生型肺腺癌均未检出。在所有 ALK 重组的肺腺癌,与 ALK 重组的 ALCL 相比,ALK 蛋白的表达要低很多。开创了以常规 IHC 为基础的方法来诊断肿瘤,和 FISH 相比,其优势是在每一个病理实验室都可进行。这可能为病理医生对有 ALK 重组而需要 ALK 靶向治疗的患者提供了一种快速的筛选方法。

4 EML4-ALK 融合基因阳性 NSCLC 患者的临床研究

4.1 临床前研究 发现 EML4-ALK 后,提出了抑制 ALK 激酶活性可能是一种有效的临床治疗策略。表达 EML4-ALK 的转基因小鼠在肺上皮细胞形成了大量的腺癌结节,表明了此融合基因具有致癌性^[13]。临床前研究表明,用 ALK 激酶抑制剂可使表达 EML4-ALK 的 NSCLC 细胞株生存信号通路下调和细胞凋亡^[3,15]。与 EGFR-酪氨酸激酶抑制剂(TKI)作用于 EGFR 突变的 NSCLC 效果相似,在 EML4-ALK 阳性的 NSCLC 大鼠移植瘤模型上,ALK 抑制剂可使已形成的肿瘤明显缩小^[3,13]。目前,用于临床前研究的 ALK 抑制剂有 X-396、GSK-1838705A 和 AP-26113 等。

4.2 临床研究 PF-02341066(crizotinib)是一种口服的 ALK 抑制剂,最初是作为 MET 的抑制剂,已被证实能抑制 ALK 重组的癌细胞的生长,包括 EML4-ALK 阳性的 NSCLC^[13,15-16]。I 期临床研究开始于 2006 年,在发现 EML4-ALK 后,发现也可抑制 ALK。2009 年美国临床肿瘤学会(American society of clinical oncology, ASCO)年会上报道,crizotinib 有明显的缓解率 52.6%(10/19)和疾病控制率 78.9%(15/19)(部分缓解和病情稳定)。2011 年 ASCO 对 crizotinib 的 I 期临床试验结果进行了更新,入组 NSCLC 患者已达 119 例,中位无进展生存期达到 10 个月,客观有效率为 61.0%,中位有效应答时间为 48 周,中位生存时间达 1 年的概率为 81.0%。随后,crizotinib 进入 II/III 期临床试验,一项是 crizotinib 与标准二线化疗(培美曲塞或多西他赛)相比较的随机 III 期临床试验。另一项实验是单剂 crizotinib 在 EML4-ALK 阳性 NSCLC 患者的 II 期临床试验,这些患者不符合 III 期临床试验或患者随机化疗后,进入疾病进展期。2011 年 8 月,美国 FDA 批准 crizotinib 用于局部

晚期或转移性 ALK 阳性 NSCLC 的一线治疗。2012 版 NCCN 指南推荐对于 ALK 阳性的 NSCLC 患者一线治疗可选择 crizotinib。另一种 ALK 抑制剂 NVP-TAE684^[3,15,17-18]也已进入临床研究。

5 EML4-ALK 融合基因阳性 NSCLC 患者 ALK 靶向治疗的耐药机制

Choi 等^[19]报道在 1 例 EML4-ALK 阳性 NSCLC 患者,应用 crizotinib 成功治疗 5 个月后出现耐药。据报道,其耐药机制与肿瘤 ALK 酪氨酸激酶域突变体 C1156Y、L1196M、G1269A 和 F1174L 有关^[17,20]。在体外,与 ALK 融合蛋白野生型相比,表达任一种突变型 ALK 融合蛋白的细胞对 crizotinib 和其他 ALK 抑制剂耐药。L1196M 突变与 BCR-ABL T3151 突变伊马替尼对慢性粒细胞性白血病耐药和 EGFR T790M 突变吉非替尼和厄洛替尼对 NSCLC 耐药相似,通过改变三磷酸腺苷(ATP)结合位点,阻碍 ALK 与药物结合,从而产生耐药。对 L1196M 突变的耐药患者,可选择 CH5424802,它是一种口服的强有力的选择性 ALK 抑制剂,可阻断 EML4-ALK L1196M 突变所致的细胞生长,可用来治疗 crizotinib 耐药患者^[18]。Katayama 等^[21]提出可以用比 crizotinib 活性更强的 ALK 抑制剂如 TAE684 及 AP26113,或是 HSP90 抑制剂进行治疗。而 C1156Y 的耐药机制尚不清楚。

6 结 语

EML4-ALK 融合基因主要存在于无/少量吸烟、年轻肺腺癌患者中,是继 EGFR 突变与 KRAS 突变之后的另一个重要分子靶点。针对这一靶点的深入研究,将为 NSCLC 的个体化治疗开创新的领域。然而,在实际工作中,还有很多问题亟待解决。针对 EML4-ALK 融合基因在 NSCLC 中的疗效远不如在慢性淋巴瘤中的疗效,是否有更适合 NSCLC 靶向治疗的药物? 诊断方法有多种,但目前尚无一种金标准;既往研究认为 EML4-ALK 融合基因与 EGFR 突变不共存,但最近有研究发现二者可共存,二者的关系到底是怎样的? 尽管有多种针对 EML4-ALK 融合基因的 ALK 抑制剂,并显示出了很好的疗效,但又出现了耐药突变,这就需要寻找新型 ALK 抑制剂。期待更加深入的实验研究和临床研究来解决上述问题,使 NSCLC 治疗朝个体化治疗的目标更迈进一步。

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[J]. Nature,2007,448(7153):561-566.
- [2] 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]. J Clin Oncol, 2009, 27(26): 4247-4253.
- [3] 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): 4275-4283.
- [4] 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.
- [5] Pollmann M, Parwaresch R, Adam-Klages S, et al. Human EML4, a novel member of the EMAP family, is essential for microtubule formation[J]. Exp Cell Res, 2006, 312(17): 3241-3251.

- [6] Solomon B, Varella-Garcia M, Camidge DR. ALK gene rearrangements: a new therapeutic target in a molecularly defined subset of non-small cell lung cancer[J]. *J Thorac Oncol*, 2009, 4(12): 1450-1454.
- [7] Wu SG, Kuo YW, Chang YL, et al. EML4-ALK translocation predicts better outcome in lung adenocarcinoma patients with wild-type EGFR[J]. *J Thorac Oncol*, 2012, 7(1): 98-104.
- [8] Kuo YW, Wu SG, Ho CC, et al. Good response to gefitinib in lung adenocarcinoma harboring coexisting EML4-ALK fusion gene and EGFR mutation[J]. *J Thorac Oncol*, 2010, 5(12): 2039-2040.
- [9] Sasaki T, Rodig SJ, Chirieac LR, et al. The biology and treatment of EML4-ALK non-small cell lung cancer[J]. *Eur J Cancer*, 2010, 46(10): 1773-1780.
- [10] Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, et al. KIP5B-ALK, a novel fusion oncokine identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(9): 3143-3149.
- [11] Jin G, Jeon HS, Lee EB, et al. EML4-ALK fusion gene in Korean non-small cell lung cancer[J]. *J Korean Med Sci*, 2012, 27(2): 228-230.
- [12] Just PA, Cazes A, Audebourg A, et al. Histologic subtypes, immunohistochemistry, FISH or molecular screening for the accurate diagnosis of ALK-rearrangement in lung cancer: a comprehensive study of Caucasian non-smokers[J]. *Lung Cancer*, 2012, 76(3): 309-315.
- [13] Soda M, Takada S, Takeuchi K, et al. A mouse model for EML4-ALK-positive lung cancer[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(50): 19893-19897.
- [14] 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.
- [15] Tanizaki J, Okamoto I, Takezawa K, et al. Combined effect of ALK and MEK inhibitors in EML4-ALK-positive non-small-cell lung cancer cells[J]. *Br J Cancer*, 2012, 106(4): 763-767.
- [16] Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer[J]. *N Engl J Med*, 2010, 363(18): 1693-1703.
- [17] Zhang S, Wang F, Keats J, et al. Crizotinib-resistant mutants of EML4-ALK identified through an accelerated mutagenesis screen[J]. *Chem Biol Drug Des*, 2011, 78(6): 999-1005.
- [18] Sakamoto H, Tsukaguchi T, Hiroshima S, et al. CH5424802, a selective ALK inhibitor capable of blocking the resistant gatekeeper mutant[J]. *Cancer Cell*, 2011, 19(5): 679-690.
- [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] Doebele RC, Pilling AB, Aisner DL, et al. Mechanisms of resistance to crizotinib in patients with ALK gene rearranged non-small cell lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(5): 1472-1482.
- [21] Katayama R, Khan TM, Benes C, et al. Therapeutic strategies to overcome crizotinib resistance in non-small cell lung cancers harboring the fusion oncogene EML4-ALK[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(18): 7535-7540.

(收稿日期: 2012-09-08 修回日期: 2012-10-22)

(上接第 1560 页)

进一步检查发现红细胞沉降率(ESR)正常;结核菌素试验阴性。未予抗结核治疗,予以出院。出院后随访 2 年未见右耳垂肿物复发。

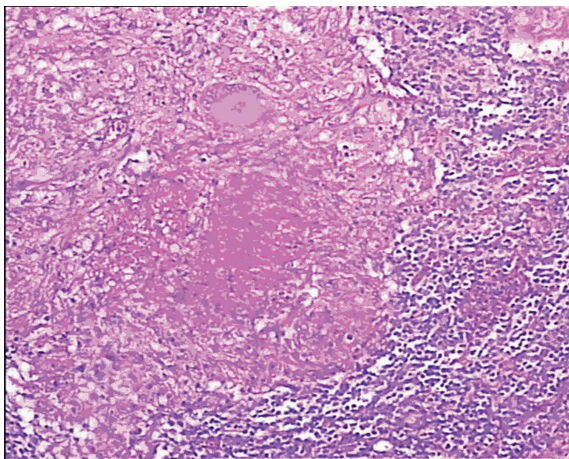


图 1 送检组织中可见结核结节(HE 染色×100)

2 讨论

结核病是由结核杆菌引起的慢性感染性疾病,可累及全身多器官系统,最常见的患病部位是肺脏,占各器官结核病总数的 80%~90%。也可以累及肝、肾、脑、淋巴结等器官。主要

的传播途径有呼吸道、消化道、皮肤和子宫,但主要是通过呼吸道。耳部结核十分少见,又以中耳结核为多,外耳结核极为罕见。本例患者既往无结核病史及其接触史,发病以来无低热、盗汗、消瘦、疲乏、纳差等结核全身中毒症状,也无咳嗽、咳痰、咯血等结核肺部症状,入院心肺及 ESR、胸片检查正常,结核菌素试验为阴性,因此,可以排除其他部位结核可能,仅为右耳垂孤立结核病灶,经手术完全切除可达到彻底治愈的目的,不必再行抗结核治疗。临床上穿耳洞引起的瘢痕疙瘩较为常见,而瘢痕疙瘩临床表现为质地坚硬,色淡红,边缘不规则,表面凹凸不平^[1-4],易于与本病相鉴别。

参考文献:

- [1] 谷京城,张荣明,杨青山,等.耳郭瘢痕疙瘩 32 例治疗体会[J]. *辽宁医学院学报*, 2011, 32(5): 421, 483.
- [2] 宋毅.耳部瘢痕疙瘩临床治疗及其机制探讨[J]. *医学美容美容*;中旬刊, 2012(9): 186-188.
- [3] 赵剑虹.耳垂瘢痕疙瘩的综合治疗[J]. *中国社区医师:医学专业*, 2012, 14(26): 106.
- [4] 蒋慧琳.皮肤组织迷走穿耳孔后形成瘢痕疙瘩原因分析[J]. *吉林医学*, 2012, 33(22): 4837.

(收稿日期: 2012-12-11 修回日期: 2013-01-23)