

非小细胞肺癌组织中 ALK、ROS1 和 RET 融合基因的表达及其临床意义

钟山 张海萍 白冬雨 高德宏 郑捷 丁毅

【摘要】 **目的** 探讨非小细胞肺癌组织中 ALK、ROS1 和 RET 融合基因的表达情况及其与临床病理特征的关系。**方法** 应用特异引物即时 PCR 法及 Sanger DNA 测序法分别检测 302 例非小细胞肺癌组织的 ALK、ROS1 和 RET 融合基因的表达情况,并与患者临床病理特征进行分析。**结果** (1) 302 例非小细胞肺癌患者组织中 12 例存在 ALK 基因融合(3.97%,12/302),其中 E13;A20、E6;A20、E20;A20 基因融合各 3 例,占总阳性比例的 9/12。ALK 融合基因在不同性别、年龄、吸烟史、组织学类型间均差异无统计学意义。(2) 在 302 例患者中 12 例存在 ROS1 基因融合(3.97%,12/302),其中 9 例为 CD74-ROS1 基因融合;ROS1 融合基因在不同性别、年龄、吸烟史、组织学类型间均差异无统计学意义。(3) 1 例患者检测出 RET 基因融合,患者为老年女性,腺癌患者,无吸烟史。(4) 未发现 ALK、ROS1、RET 同时突变的患者。**结论** ALK、ROS1、RET 融合基因在非小细胞肺癌组织中突变率较低,但代表了非小细胞肺癌特定的分子亚型,对指导临床靶向治疗意义重大。

【关键词】 肺肿瘤; 癌,非小细胞肺; 癌基因融合; 病理学,临床

Detection of ALK, ROS1 and RET fusion genes in non-small cell lung cancer patients and its clinicopathologic correlation Zhong Shan, Zhang Haiping, Bai Dongyu, Gao Dehong, Zheng Jie, Ding Yi. Department of Pathology, First Hospital of Xiamen, Xiamen University, Xiamen 361003, China
Corresponding author: Zhang Haiping, E-mail: zhp3398@163.com

【Abstract】 Objective To study the prevalence of ALK, ROS1 and RET fusion genes in non-small cell lung cancer (NSCLC), and its correlation with clinicopathologic features. **Methods** Formalin-fixed and paraffin-embedded tissue sections from samples of 302 patients with NSCLC were screened for ALK, ROS1, RET fusions by real-time polymerase chain reaction (PCR). All of the cases were validated by Sanger DNA sequencing. The relationship between ALK, ROS1, RET fusion genes and clinicopathologic features were analyzed. **Results** In the cohort of 302 NSCLC samples, 3.97% (12/302) were found to contain ALK fusion genes, including 3 cases with E13; A20 gene fusion, 3 cases with E6; A20 gene fusion and 3 cases with E20; A20 gene fusion. There was no statistically significant difference in patient's gender, age, smoking history and histologic type. Moreover, in the 302 NSCLC samples studied, 3.97% (12/302) were found to contain ROS1 fusion genes, with CD74-ROS1 fusion identified in 9 cases. There was no statistically significant difference in patients' gender, age, smoking history and histologic type. One non-smoking elderly female patient with pulmonary adenocarcinoma had RET gene fusion. None of the cases studied had concurrent ALK, ROS1 and RET mutations. **Conclusions** The ALK, ROS1 and RET fusion gene mutation rates in NSCLC are low, they represent some specific molecular subtypes of NSCLC. Genetic testing has significant meaning to guide clinical targeted therapy.

【Key words】 Lung neoplasms; Carcinoma, non-small-cell Lung; Oncogene fusion; Pathology, clinical

肺癌是当今世界危害人类最常见的恶性肿瘤之一。大部分肺癌患者确诊时已经是晚期阶段了,晚期肺癌的治疗效果及生存率又不尽如人意。近年来,随着非小细胞肺癌驱动基因研究的深入,靶向治

疗成为目前研究的热点。表皮生长因子受体(EGFR)靶向治疗在临床上取得了一定的疗效后,间变性淋巴瘤激酶(ALK)、ROS1、RET 等基因突变也相继在非小细胞肺癌治疗中被报道。以吉非替尼、厄洛替尼、克唑替尼等小分子酪氨酸激酶抑制剂为代表的新型分子靶向药物为肺癌的治疗带来了新的曙光。关于 ALK、ROS1、RET 等基因突变情况是我们关注的焦点。

材料与方法

1. 研究对象:收集 302 例来自厦门大学附属第一医院 2007 年 1 月至 2012 年 10 月期间手术切除且经病理确诊的非小细胞肺癌患者石蜡包埋组织。其中男性 209 例,女性 93 例;年龄范围 19 ~ 82 岁,中位年龄 60 岁,按中位年龄分两组:<60 岁 149 例,≥60 岁 149 例(4 例因病历没有年龄记录,未计算在内);明确吸烟史的患者 277 例,其中有吸烟史 136 例,无吸烟史 141 例。腺癌 148 例,鳞癌 90 例,其他类型 64 例。

2. RNA 提取:取 ≥5 片 5 μm 厚度石蜡切片组织,置于 1.5 mL EP 管内。使用厦门艾德生物医药有限公司的甲醛固定石蜡包埋样本 RNA 分离试剂盒(离心柱型)提取 RNA。具体步骤按试剂盒操作说明。

3. ALK、ROS1 和 RET 融合基因检测:采用特异引物即时荧光 PCR 法(厦门艾德生物医药有限公司提供人类 ALK 基因融合和 ROS1 基因融合联合检测试剂盒,产品批号为 P213042502;RET 基因融合检测试剂盒,产品批号为 P213042302),检测 ALK、ROS1 和 RET 融合基因突变,引物设计参考文献[1]。将从石蜡包埋组织中提取的 RNA 逆转录生成 cDNA,再进行即时荧光 PCR。荧光 PCR 仪型号为 Stratagene MX 3000P。PCR 反应条件分别为:95 °C 5 min;95 °C 25 s,64 °C 20 s,72 °C 20 s,15 个循环;93 °C 25 s,60 °C 35 s,72 °C 20 s,31 个循环。收集荧光信号,进行数据分析。

4. Sanger 测序法:针对 ALK 14 种融合突变、ROS1 14 种融合基因及 RET 9 种融合基因设计引物^[1],并委托上海生工生物工程有限公司合成。PCR 反应总体系为 25 μL,包括 5 μL 10 × buffer,1.2 μL 25 mmol/L MgCl₂,每种 dNTP 0.25 μL,100 μmol/L 上游及下游引物,每种 0.04 μL,0.16 μL Takara Hs-Taq 聚合酶,5 μL cDNA。PCR 反应条件为:95 °C 预变性 5 min,随后 95 °C 30 s,50 °C 30 s,72 °C 40 s,50 个循环;72 °C 7 min。每个样品分别经过 ALK(或 ROS1、RET)融合突变的测序引物和 ALK(或 ROS1、RET)断裂点的上下游引物进行扩增,将扩增出的 PCR 产物送至上海生工生物工程公司纯化、测序。

5. 统计学分析:采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析。运用 χ^2 检验评价 EML4-ALK 融合基因突变与临床病理特征的关系, $P < 0.05$ 判断为差异有

统计学意义。

结 果

1. ALK 融合基因检测结果及与临床病理特征的关系:(1) ALK 融合基因检测结果:即时 PCR 法检测 302 例非小细胞肺癌组织中有 12 例检测出 ALK 融合基因阳性,总阳性检出率为 3.97%。其中 9 例为 ALK-M1 ~ 3 三种 ALK 融合基因,占总阳性例数的 9/12。全部病例均进行 Sanger 测序法检测,M1 型[EML4-ALK(E13; A20)]3 例、M2 型[EML4-ALK(E6; A20)]3 例、M3 型[EML4-ALK(E20; A20)]3 例、M4 型[EML4-ALK(E15del60; del71A20)]1 例、M6 型[EML4-ALK(E18; A20)]2 例,未检测到 M5、M7、M8、M9、M10、M11、M12、M13 和 M14 型。测序法 EML4-ALK 阳性检出与即时荧光 PCR 法结果一致,两种方法总体符合(图 1 ~ 6)。(2) ALK 融合基因与患者临床病理特征的关系:302 例患者中女性患者 ALK 融合基因阳性率(6.45%, 6/93)高于男性患者(2.87%, 6/209),两者差异无统计学意义($\chi^2 = 1.326, P = 0.249$);年龄 < 60 岁者的 ALK 融合基因阳性率

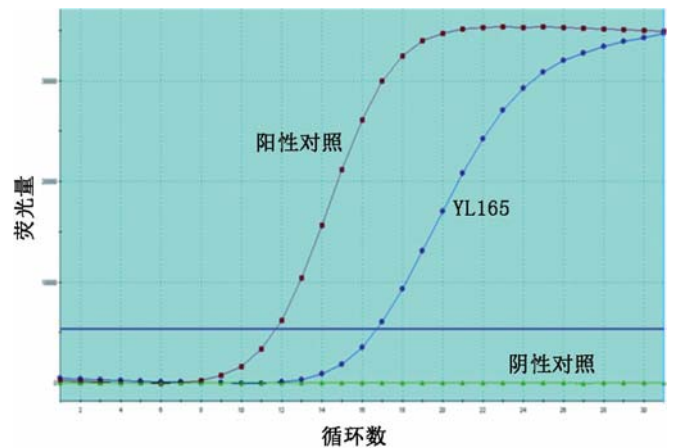


图 1 EML4 外显子 13; ALK 外显子 20 融合基因(ALK-M1), (反向)融合荧光 PCR 法结果(样品名称:YL165)

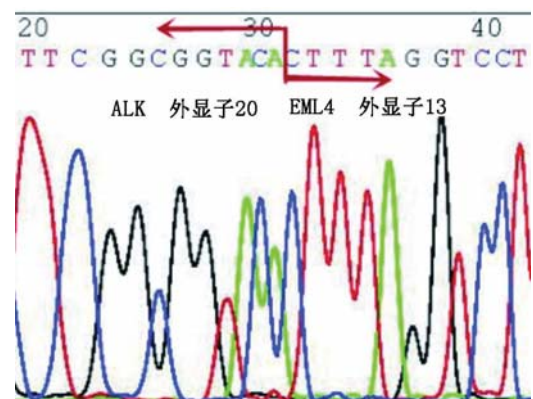


图 2 EML4 外显子 13; ALK 外显子 20 融合基因(ALK-M1), 反向测序结果(样品名称:YL165)

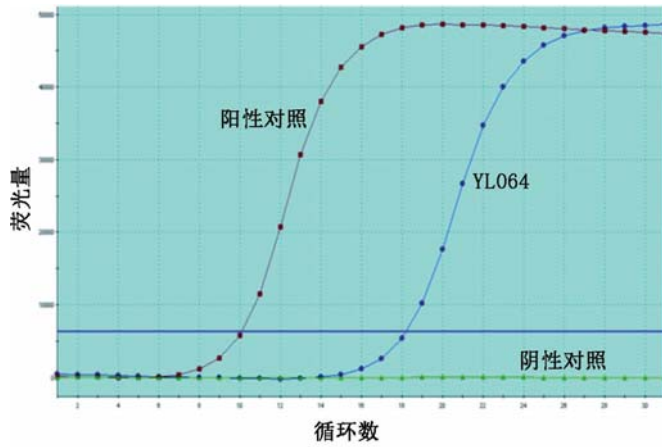


图 3 EML4 外显子 6 ins33; ALK 外显子 20 融合基因 (ALK-M2), (反向)融合荧光 PCR 法结果(样品名称:YL064)

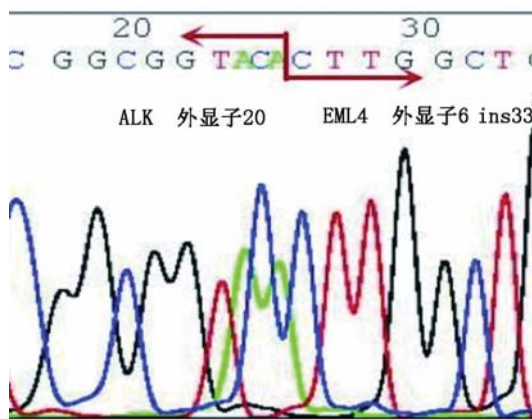


图 4 EML4 外显子 6 ins33; ALK 外显子 20 融合基因 (ALK-M2), 反向测序结果(样品名称:YL064)

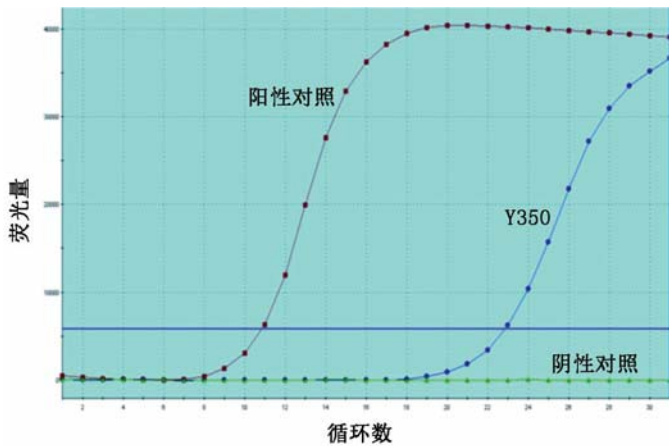


图 5 EML4 外显子 20; ALK 外显子 20 融合基因 (ALK-M3), (反向)融合荧光 PCR 法结果(样品名称:YL350)

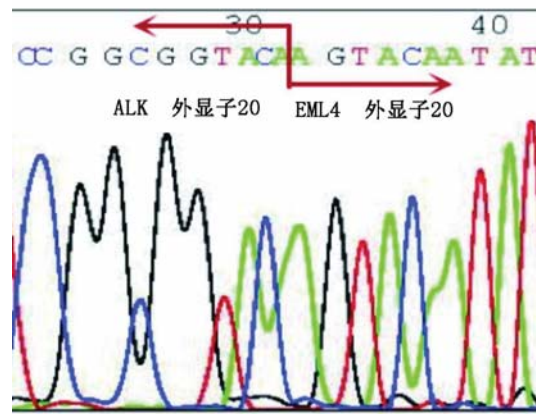


图 6 EML4 外显子 20; ALK 外显子 20 融合基因 (ALK-M3), 反向测序结果(样品名称:YL350)

的关系:(1) ROS1 融合基因检测结果:运用即时 PCR 法检测 302 例肺癌肿瘤组织样本,12 例检测出 ROS1 融合基因阳性,总阳性检出率为 3.97%。其中 10 例为 ROS1-M6 ~ 10 融合基因,占总阳性例数比例为 10/12。全部病例均进行 Sanger 测序检测,共检测到 M8 型 [CD74-ROS1 (CD6; R34)] 9 例、M3 型 [CD74-ROS1 (CD6; R32)] 1 例(其中 1 例为 M3 和 M8 双融合阳性)、M7 型 [SLC34A2-ROS1 (SL14del; R34)] 1 例、M12 型 [LRIG3-ROS1 (LR16; R35)] 1 例、M14 型 [GOPC-ROS1 (GO4; R36)] 1 例、未检测到 M1、M2、M4、M5、M6、M9、M10、M11 和 M13 型。两种方法总体符合(图 7,8)。(2) ROS1 融合基因与患者临床病理特征的关系:在 302 例患者中女性患者 ROS1 融合基因阳性率(7.53%, 7/93)高于男性患者(2.39%, 5/209),两者差异无统计学意义($\chi^2 = 3.203, P = 0.074$);年龄 ≥ 60 岁者(4.70%, 7/149)略高于 < 60 岁者的 ROS1 融合基因阳性率(3.36%, 5/149),两者差异无统计学意义($\chi^2 = 0.346, P = 0.556$);非吸烟者的 ROS1 融合基因阳性率(5.67%, 8/141)高于吸烟者(2.94%,

(5.37%, 8/149)略高于 ≥ 60 岁者(2.68%, 4/149),两者差异无统计学意义($\chi^2 = 1.385, P = 0.239$);非吸烟者的 ALK 融合基因阳性率(6.38%, 9/141)高于吸烟者(2.21%, 3/136),两者差异无统计学意义($\chi^2 = 2.904, P = 0.088$);腺癌患者 ALK 融合基因阳性率(6.08%, 9/148)高于鳞癌患者(1.11%, 1/90),两者差异无统计学意义($\chi^2 = 2.311, P = 0.128$)。

2. ROS1 融合基因检测结果及与临床病理特征

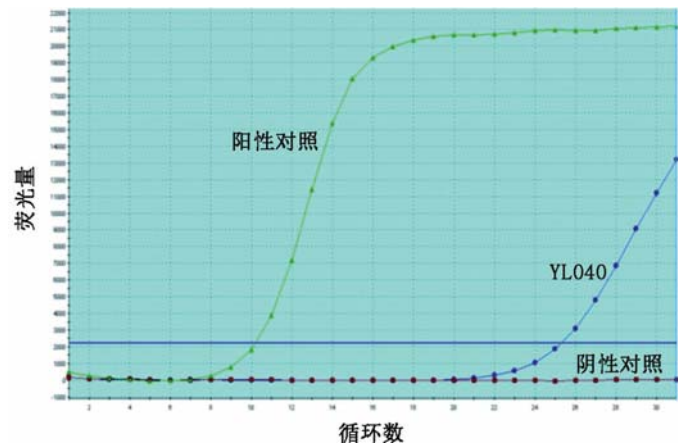


图 7 CD74 外显子 6; ROS1 外显子 34 融合基因 (ROS1-M8), (反向)融合荧光 PCR 法结果(样品名称:YL040)

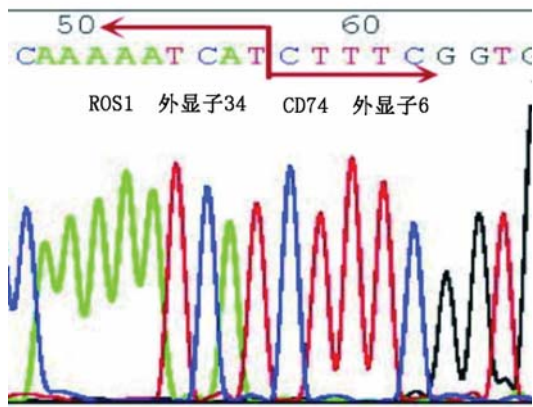


图 8 CD74 外显子 6;ROS1 外显子 34 融合基因(ROS1-M8),反向测序法结果(样品名称:YL040)

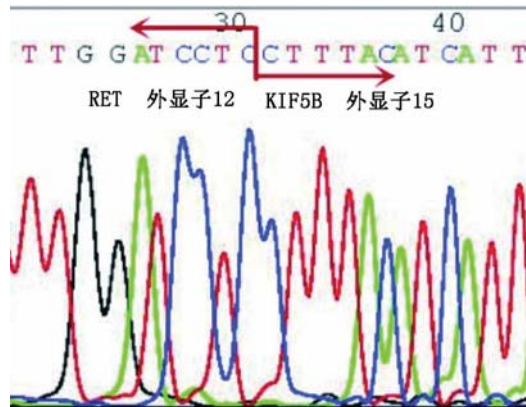


图 10 KIF5B 外显子 15;RET 外显子 12 融合基因(RET-M15),反向测序结果(样品名称:YL235)

4/136),两者差异无统计学意义($\chi^2 = 1.243, P = 0.265$);腺癌患者 ROS1 融合基因阳性率(4.05%, 6/148)高于鳞癌患者(2.22%, 2/90),两者差异无统计学意义($\chi^2 = 0.152, P = 0.697$)。

3. RET 融合基因检测结果及与临床病理特征的关系:(1)RET 融合基因检测结果:即时 PCR 法检测 302 例临床肺癌肿瘤病理组织样本中检出 RET 基因融合阳性 1 例,RET 基因融合阳性检出率为 0.33% (1/302)。运用测序法检测出 M15 [KIF5B-RET(K15;R12)] 融合基因阳性 1 例。即时 PCR 法与测序法完全符合(图9,10)。(2)临床样本检测

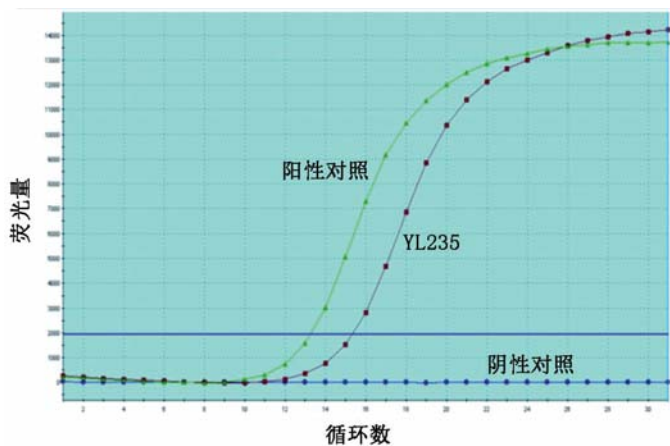


图 9 KIF5B 外显子 15;RET 外显子 12 融合基因(RET-M15),(反向)融合荧光 PCR 法结果(样品名称:YL235)

结果与临床特征相关性:此次临床试验入组的 302 例样本仅检测出 RET 基因融合阳性 1 例,为 61 岁的女性肺腺癌患者,无吸烟史。因阳性样本例数太少,故不进行统计分析。

讨 论

驱动性基因突变和基因融合是肿瘤发生、发展过程中的重要因素。因此,准确检测 ALK 基因融

合、ROS1 基因融合和 RET 基因融合存在状态,可为肿瘤患者的靶向用药治疗提供必要依据。目前上述三种基因融合的主要检测方法包括荧光原位杂交(FISH)技术、即时荧光 PCR 法、Sanger DNA 测序法以及免疫组织化学技术等,各有优缺点。FISH 法检测基因融合的灵敏度高、特异性好,但其操作繁琐、耗时长,且实验条件要求高,易造成误差;此外,由于实验判定标准复杂,不易掌握,检测通量低。即时荧光 PCR 法特异性和灵敏度高,检测结果重复性好,而且引入了荧光检测技术,操作简便快捷,同时克服了传统 PCR 产物遗留污染的问题,但是只能检测已知的基因融合。Sanger DNA 测序法的检测可以发现未知的突变位点,但是灵敏度有限,操作步骤繁琐,需要对 PCR 产物进行后处理,在操作过程中易发生污染,造成假阳性的检测结果。免疫组织化学法存在灵敏度低、特异性和重复性较差、质量控制较难等缺点。我们选用了 Sanger DNA 测序法及即时荧光 PCR 法两种方法进行实验及互相印证。

ALK 基因定位于人类第 2 号染色体的 p23 带,其编码的 ALK 属于胰岛素受体家族,通过基因重排而活化的 ALK 可通过激活下游信号通路促使细胞异常增殖,进而发生癌变。研究发现,ALK 基因能与多种基因发生融合,如 EML4、NPM、TPM3、KIF5B 等,其中以 EML4-ALK 基因融合最为常见。Soda 等^[2]于 2007 年首次在非小细胞肺癌中发现了新型的融合基因 EML4-ALK,该融合基因由 EML4 和 ALK 基因两者的部分位于第 2 号染色体短臂上相互融合而成。文献报道约 2.9%~6.7%^[2-6]的非小细胞肺癌存在 ALK 基因融合。本组检测结果为 3.97%。朱翔等^[6]报道了 525 例肺癌病例 ALK 阳性组中年轻、女性患者、实体型腺癌比例高。本试验

结果提示女性患者、年龄 < 60 岁者、非吸烟者、腺癌患者的 ALK 融合基因阳性率比较高,但差异均无统计学意义,考虑可能与病例数较少有关。

ROS1 基因是一种新的致癌基因,定位于人类第 6 号染色体 q22 上,编码一种对细胞生存和生长均具有重要作用的受体酪氨酸激酶,通过染色体重排而激活的 ROS1 可促进肿瘤细胞的生长。ROS1 基因也可与多种基因发生融合,如 SLC34A2、CD74、SDC4、EZR 等。ROS1 基因融合最先是在胶质母细胞瘤和胆管癌中发现的。2007 年, Rikova 等^[7] 在肺癌细胞系中发现了 ROS1 重排。Bergethon 等^[4] 研究了 1 073 例肺癌标本,发现有 1.7% (18/1 073) 存在 ROS1 重排。Cai 等^[8] 对 392 例中国非小细胞肺癌患者进行检测,发现 2% (8/392) 有 ROS1 基因重排,其中腺癌患者的 ROS1 基因重排率为 3.03% (7/231)。本组结果为 ROS1 融合基因阳性检出率为 3.97%,其中腺癌患者 ROS1 融合基因检出率为 4.05% (6/148),与 Cai 等^[8] 的报道类似,比 Bergethon 等^[4] 的百分比高,考虑系本实验检测的 ROS1 融合基因类型除了 CD74-ROS1 和 SLC34A2-ROS1 外还增加了 LRIG3-ROS1、GOPC-ROS1 等其他类型有关。有学者报道 ROS1 基因融合的优势人群通常为年轻、非吸烟的肺腺癌患者^[4]。Cai 等^[8] 的研究未能发现在临床病理特征上有差别。本组研究显示女性患者、年龄 ≥ 60 岁者、非吸烟者、腺癌患者的 ROS1 融合基因阳性率比较高,但均无统计学意义。考虑可能与样本量较小有关。已有的研究还表明^[9], ROS1 激酶催化区的 ATP 结合位点与 ALK 激酶催化区的 ATP 结合位点二者同源性高,因此 ALK 酪氨酸激酶小分子抑制剂克唑替尼在治疗 ALK 及 ROS1 基因融合的非小细胞肺癌中具有明显疗效^[10-11]。

1985 年 Takahashi 等^[12] 首先发现了 RET 原癌基因。它位于第 10 号染色体的 q11.21 区,含有 21 个外显子,与其他染色体易位或第 10 号染色体发生倒置可使 RET 活化。RET 原癌基因编码一种跨膜的酪氨酸激酶受体 RET 蛋白,调节细胞的生长、分化。RET 融合基因最初由 Alberti 等^[13] 在甲状腺乳头状癌中发现,研究发现其主要是由 RET 基因重排造成的。已有的研究认为 RET 基因融合率在 0.92% ~ 2.00%^[14-15]。Mukhopadhyay 等^[16] 的研究提示应该增加 RET 融合基因的检测,特别是对于不吸烟、EGFR 和 ALK 基因检测阴性的患者。本实

验组的 RET 基因融合阳性检出率为 0.33%。该 RET 基因融合阳性病例为女性肺腺癌患者,无吸烟史。同时本实验未发现 ALK、ROS1、RET 同时突变的患者。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 钟山,张海萍,郑捷,等. 非小细胞肺癌患者 EML4-ALK 融合基因检测及其与临床病理特征的关系 [J]. 中华病理学杂志, 2013, 42(4):252-256.
- [4] Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers [J]. J Clin Oncol, 2012, 30(8):863-870.
- [5] 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 [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(9):3143-3149.
- [6] 朱翔,李红威,曹宝山,等. 525 例肺癌中 ALK 阳性病例临床病理特征研究及检测方法探讨 [J]. 中国肺癌杂志, 2014, 17(3):226-232.
- [7] Rikova K, Guo A, Zeng Q, et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer [J]. Cell, 2007, 131(6):1190-1203.
- [8] Cai W, Li X, Su C, et al. ROS1 fusions in Chinese patients with non-small-cell lung cancer [J]. Ann Oncol, 2013, 24(7):1822-1827.
- [9] Ou SH, Tan J, Yen Y, et al. ROS1 as a 'druggable' receptor tyrosine kinase: lessons learned from inhibiting the ALK pathway [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2012, 12(4):447-456.
- [10] Gandhi L, Jänne PA. Crizotinib for ALK-rearranged non-small cell lung cancer: a new targeted therapy for a new target [J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(14):3737-3742.
- [11] Bos M, Gardizi M, Schildhaus HU, et al. Complete metabolic response in a patient with repeatedly relapsed non-small cell lung cancer harboring ROS1 gene rearrangement after treatment with crizotinib [J]. Lung Cancer, 2013, 81(1):142-143.
- [12] Takahashi M, Ritz J, Cooper GM. Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement [J]. Cell, 1985, 42(2):581-588.
- [13] Alberti L, Carniti C, Miranda C, et al. RET and NTRK1 proto-oncogenes in human diseases [J]. J Cell Physiol, 2003, 195(2):168-186.
- [14] Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer [J]. Nat Med, 2012, 18(3):378-381.
- [15] Lipson D, Capelletti M, Yelensky R, et al. Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies [J]. Nat Med, 2012, 18(3):382-384.
- [16] Mukhopadhyay S, Pennell NA, Ali SM, et al. RET-rearranged lung adenocarcinomas with lymphangitic spread, psammoma bodies, and clinical responses to cabozantinib [J]. J Thorac Oncol, 2014, 9(11):1714-1719.

(收稿日期:2015-01-20)

(本文编辑:常秀青)