

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2015.02.005

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2015.02.005>

## · AME 科研时间专栏 ·

**专栏导读:** AME Groups 旗下出版了 *Journal of Thoracic Disease* (《胸部疾病杂志》)、*Annals of Cardiothoracic Surgery* (《心胸外科年鉴》)、*Chinese Journal of Cancer Research* (《中国癌症研究》) 和 *Annals of Translational Medicine* (《转化医学年鉴》) 等近 20 本英文医学学术期刊。2014 年, AME Groups 中文平台——“科研时间”的诞生, 为广大从事临床和基础研究的科研工作者带来了福音, 提供了更多科研交流和学习分享的机会。欢迎广大读者关注我们“AME 科研时间专栏”, 订阅我们的公众微信号 (AME 科研时间: amegroups), 给我们提出宝贵的建议和意见, 以便于将这个专栏建设得更好, 成为读者喜闻乐见的一个栏目。

# IHC、FISH和RT-PCR检测对EML4-ALK重排的一致性

Cristina Teixidó<sup>1</sup>, Niki Karachaliou<sup>2</sup>, Vicente Peg<sup>1</sup>, Ana Gimenez-Capitan<sup>1</sup>, Rafael Rosell<sup>1,3</sup>

(1. Pangaea Biotech, Quirón Dexeus University Institute, Barcelona, Spain; 2. Dr Rosell Oncology Institute, Quirón Dexeus University Institute, Barcelona, Spain; 3. Catalan Institute of Oncology, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain)

魏建国<sup>1</sup> 译 许春伟<sup>2</sup>, 张博<sup>2</sup> 审校

(1. 浙江省绍兴市人民医院病理科, 浙江 绍兴 312000; 2. 解放军307医院病理科, 北京 100071)

**[摘要]** 棘皮动物微管结合蛋白-间变性淋巴瘤激酶(echinoderm microtubule-associated protein-like 4-anaplastic lymphoma kinase, EML4-ALK)在肺癌中已成为第二个最重要的驱动致癌基因, 在4%~6%的肺腺癌中EML4-ALK已经成为第一个可以靶向治疗的融合基因位点。伴随着ALK分离探针荧光原位杂交(fluorescent in situ hybridization, FISH)试剂盒的上市, 克唑替尼已经被批准治疗ALK阳性的进展期非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)。然而, 一种靶向药物的成功主要取决于一种敏感且特异的筛选实验方法来检测分子药物作用的靶点。以作者的经验看, 用RT-PCR来检测EML4-ALK, 比用FISH和免疫组化(immunohistochemistry, IHC)方法更敏感, 结果更可靠。尽管通过FISH检测ALK已经经过大量的临床实验验证, 然而该方法在技术层面仍存在许多具有挑战性的问题, 而通过IHC和RT-PCR方法检测ALK仍需要临床进一步的探索。

**[关键词]** 间变性淋巴瘤激酶(ALK); 荧光原位杂交(FISH); 免疫组化(IHC); 非小细胞肺癌(NSCLC); 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)

棘皮动物微管结合蛋白-间变性淋巴瘤激酶(echinoderm microtubule-associated protein-like 4-anaplastic lymphoma kinase, EML4-ALK)是一种由棘皮动物微管结合蛋白EML4和ALK基因构成的融合基因, 最先在一组非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)中发现<sup>[1]</sup>。EML4-ALK的

形成是由EML4基因位于13号外显子约3.6 kb处下游区域的破坏, 然后融合拼接到ALK基因21号外显子297 bp上游位置。EML4-ALK的转化潜能主要依赖于其激酶的活性, 而EML4基因卷曲螺旋结构域能够调节EML4-ALK细胞质的活化和二聚化作用, 进而共同促进融合蛋白的致癌活性<sup>[1]</sup>。

收稿日期 (Date of reception): 2014-10-25

通信作者 (Corresponding author): Rafael Rosell, Email: rrosell@iconcologia.net

在NSCLC中发现EML4-ALK短短的四年后, 克唑替尼, 一种双重的ALK-MET抑制剂, 被FDA批准用于治疗ALK重排的进展期NSCLC<sup>[2-3]</sup>。检测ALK改变的一个最关键问题就是寻找一种最可靠的能够定义ALK状态的方法。目前可预测性ALK重排检测的金标准是利用荧光原位杂交(fluorescent in situ hybridization, FISH), 因为该方法能够检测所有已知的ALK重排, 并且在克唑替尼的临床试验中通过了充分的临床验证<sup>[4-6]</sup>。然而, 通过FISH检测ALK重排的方法存在一些技术上的挑战, 包括FISH信号的不稳定性和评分困难。在2011年Chihara和Suzuki等<sup>[7-9]</sup>就指出了FISH方法在诊断中存在的局限性, 为了ALK抑制剂的进一步研究, 应该重新考虑寻找一种新的诊断性方法。在NSCLC中测定ALK状态一个可供选择的方法就是通过免疫组化(immunohistochemistry, IHC)方法来检测ALK蛋白是否过表达, 然而IHC方法检测ALK蛋白在敏感性和可重复性方面存在重要的挑战, 因为ALK蛋白的差异表达发生在较低的水平<sup>[10-12]</sup>。RT-PCR能够非常敏感的检测某些变异的ALK融合基因, 尽管从福尔马林固定-石蜡包埋(formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE)的组织切片中很难获得可重复性的RT-PCR结果<sup>[12-13]</sup>。新鲜组织的保存, ALK阳性的准确定义, ALK改变检测的最好方法具有非常重要的临床意义, 因为这些改变具有显著的预后意义, 并且患者是否能够选择靶向治疗都是建立在分子检测的基础上的。因此, 我们总结下目前在NSCLC中检测EML4-ALK变异亚型的最佳方法。

## 1 NSCLC 中 ALK 的检测: 采用 FISH, IHC 还是 RT-PCR?

在癌症个体化治疗发展的今天, 寻求一种快速且经济的能够检测NSCLC中不同寻常分子亚型(比如EML4-ALK)的方法成为目前亟待解决的问题之一<sup>[14]</sup>。尽管大多数EML4-ALK阳性的NSCLC患者从ALK-TKIs的治疗中能够获益, 然而不同患者间临床疗效的差异和其不同的分子作用机制仍然不清楚。例如, 在H3122细胞中(存在EML4-ALK v1融合), 克唑替尼能够显著的抑制该肿瘤细胞的增殖和促进其凋亡, 而在H2228细胞中(存在EML4-ALK v3融合), 却抵制该药物的效应<sup>[15]</sup>。有趣的是, 在最长的变异亚型v2(EML4-ALK v2)中, 三者中最不稳定的一种亚型, 却显示出对ALK抑制剂最高的敏感性<sup>[16]</sup>。因此, 对于ALK阳性肺癌患者的分子靶向治疗应该考虑到精确的ALK基因分型。尽管

FISH被用于注册患者的临床试验, 但经FDA批准的ALK探针不能够识别特定的融合位点或断裂变异亚型。此外, 仍然没有找到一种能够用于临床上大规模筛选的最佳技术。

我们在对一组200例NSCLC患者的检测中发现, 通过RT-PCR方法发现12.5%的病例中存在EML4-ALK的融合, 明显高于用IHC方法检测出的结果(6.7%)和FISH方法分析获得的数据(4.5%)。RT-PCR检测的EML4-ALK阳性病例中包括EML4-v1、EML4-v2和EML4-v3三种变异亚型, 分别为13号内含子、20号内含子和6号内含子融合到ALK基因的19号内含子上(图1)。在日常病例检测中, 我们同时运用3种方法来检测EML4-ALK重排, 发现通过RT-PCR技术检出EML4-ALK重排的阳性率明显高于其它两种方法。在139例NSCLC患者中, IHC方法发现14例(10.1%)中存在EML4-ALK融合基因, FISH分析发现8例中存在EML4-ALK融合基因(5.8%), 而应用RT-PCR技术发现高达24例(17.3%)中存在EML4-ALK融合基因。

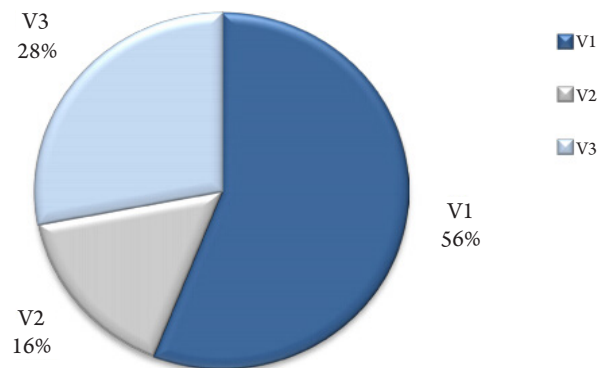


图1 NSCLC肿瘤中EML4-ALK阳性的变异亚型(最重要的EML4-ALK融合变异亚型的分布)

我们的研究<sup>[17-19]</sup>结果极大的丰富了那些建立在临床和组织学特征基础的研究内容。在最近的一项研究<sup>[20]</sup>中, 利用RT-PCR技术在46个野生型EGFR的肺腺癌中, 11例(24%)检测到了EML4-ALK v1或3a/b的亚型; 其中9例/46例(20%)为EML4-ALK v1阳性, 这9例中, 只有1例(11%)通过FISH检测发现EML4-ALK一致性阳性。Zhang等<sup>[19]</sup>人利用RACE-配对PCR测序技术同样在43% (9/21)的缺乏EGFR和KRAS突变的肺腺癌中检测到了EML4-ALK融合。另外, Wallander等人的研究<sup>[20]</sup>指出, FISH结果的判读有很大的主观性, 不同观察者间存在很大的差异, RT-PCR方法是检测EML4-ALK融合

最敏感且最缺少主观性的方法。相反, Li组的研究<sup>[14]</sup>中, 在对7 344例FFPE NSCLC样本的大规模筛查中, 通过定量RT-PCR方法仅仅在200例(2.7%)中检测到了EML4-ALK阳性转录体。Tuononen等人最近的研究<sup>[21]</sup>指出, 通过FISH、IHC、RT-PCR和靶向重新测序技术四中不同的方法, 对FFPE肿瘤样本检测中, 能够得出显著的一致性结论。

目前国际综合癌症协会和美国临床肿瘤学会推荐所有的NSCLC, 只要包含腺癌的成分, 不管组织学级别或主要的组织学亚型, 都应行EGFR突变和ALK检测<sup>[22-23]</sup>。我们研究小组首先通过RT-PCR检测发现EML4-ALK重排与EGFR突变在相当数量的EGFR突变型NSCLC患者中有协同作用, 提示可能与好的治疗结果有关<sup>[24]</sup>。

FISH是一种相对快速、标准化但比较昂贵的方法, 仅仅需要肿瘤活检组织就可以完成, 然而其不能够识别融合位点, 同样不能鉴别不同的融合变异亚型, 甚至一些罕见的、复杂性重排。FISH结果的判读也相当主观, 并且要求专业化的培训。在解释FISH结果时, 不同观察者间存在相当大的差异<sup>[20]</sup>。此外, 通过FISH检测EML4-ALK融合时, 评估样本阳性细胞占15%以上这一分割点作为阳性, 同样影响测试的敏感性和特异性。并且经FDA核准的“细胞阳性百分比”这一分割点的选择, 真正阳性的肿瘤细胞与通过试验测定出来的有着本质上的差别<sup>[18]</sup>。

对于诊断ALK-重排性NSCLC, IHC是一种快速、相对经济且仅仅需要小的活检样本就可以完成的方法。IHC最大的优点就在于分析结果时组织形态学的保存, 这样ALK表达的测定能够集中在肿瘤区域。理论上, IHC通过ALK的表达测定ALK融合基因, 不管其变异亚型或者融合位点, 然而不同的变异亚型和融合位点会影响蛋白的表达水平和蛋白的定位<sup>[25]</sup>。和FISH相比, IHC的另外一个优点就是在多数实验室都有IHC的配套设施, 但是目前仍然没有经过FDA认证的ALK抗体。已经报道的IHC检测ALK的敏感性和特异性分别为67%~100%, 93%~100%不等(FISH做为标准程序对比验证)<sup>[26-27]</sup>; IHC有非常高的阴性预测价值( $\geq 98.9\%$ )<sup>[27]</sup>。文献<sup>[28-29]</sup>指出, 目前欧洲市场上已经商业化的可以买到的两种抗体DSF3 (Signaling Technology, USA)和5A4 (Novocastra, UK), 能够高度准确和可靠的预测NSCLC患者中ALK的重排。我们通过使用克隆号5A4的ALK抗体, IHC同样在肺癌ALK融合的测定中显示了非常好的敏感性<sup>[30]</sup>。在一定程度上, IHC可能最终取代FISH来

测定ALK<sup>[26]</sup>。一些学者推荐使用两种方法来测定ALK, 目前几乎所有的患者最初就没有被使用IHC测定来ALK<sup>[10,25]</sup>。那些微弱、中等或高强度的标记提示ALK基因的表达, 然后通过FISH检测来证实ALK的阳性; IHC评分1+或者2+的, 应该经过FISH检测确认, 而IHC评分为3+的直接被认定为ALK阳性; IHC评分阴性患者提示ALK基因不表达, 没有必要利用其它方法再行检测<sup>[25]</sup>。然而, 这种方法要求大规模的临床研究来证实。

我们的经验, 通过IHC在10.1%的病例中可以检测到EML4-ALK的重排, 能够很容易的解释以上结果。在欧洲, 克唑替尼的使用, 没有特别规定必须要进行ALK重排检测, 而在美国必须要先经过FDA认证的检测才能够使用该药物<sup>[31]</sup>。

我们评价的第三种方法: RT-PCR, 可能是最敏感和特异性的方法, 但是当使用FFPE组织测定时, 要求多重引物来检测所有EML4-ALK变异亚型。以RT-PCR为基础诊断的准确性很大程度上取决于样本RNA的质量<sup>[32]</sup>。因为变异亚型1、2和3a/b占已报道阳性病例数的80%左右, 仅检测这3种变异亚型似乎非常有实用性<sup>[4]</sup>。RT-PCR最大的优点就在于其适用于支气管冲洗液、胸腔积液和血液等样本, 而不适用于FFPE样本<sup>[12]</sup>。我们通过RT-PCR在血小板中首先检测了EML4-ALK, 对于EML4-ALK阳性患者行克唑替尼治疗, 并通过连续的CT检查来判断其临床反应<sup>[33]</sup>。尽管作为一种筛选方法, RT-PCR的特异性是相当高的, 尤其对于cDNA扩增区域的测序, 然而其存在交叉污染的可能性会导致假阳性结果的存在; 此外, 假如实验中所设计的引物不是特异的针对融合位点或断裂变异体配对时, 会错过这些实验结果。当对那些FISH检测ALK阳性的病例再次通过RT-PCR回顾性分析EML4-ALK转录体时, 即在克唑替尼的初期临床I期阶段研究时, 发现31%的病例检测不到转录体的存在<sup>[4]</sup>。尽管这些RT-PCR阴性病例的一部分可能由于技术上的操作引起的, 也可能由于实验过程中引物的设计不合理会错过一些罕见的EML4-ALK变异亚型或者非EML4融合变异亚型。

## 2 总结

由于科学工作者们的努力和合理的临床试验设计, 在给患者选择治疗方案前, 我们才能利用基因组学特征, 更加接近并且细分患者的实际情况, 最终形成最精确的治疗方案。ALK抑制剂能够根据肿瘤的基因组学特征为癌症患者的治疗提供

新的机会, 并且能够改善其治疗效果。对于EML4-ALK变异亚型1、2和3a/b的检测, RT-PCR是一种非常敏感的方法, 不像IHC和FISH在分析结果时存在主观性, RT-PCR不存在主观性。只有通过RT-PCR才能识别特殊的变异亚型, 对于今后预测患者对治疗的反应变得非常重要。在今后检测已经报道过剩余20%的EML4-ALK变异亚型时, 另外的引物设计会非常容易的应用到RT-PCR方法中。目前正在发展的靶向测序技术来检测ALK基因融合需要进一步的探索, 在今后的临床研究中, 关于ALK基因融合的检测, 像FISH及IHC技术一样, RT-PCR的临床实用性应该被重新评估。

## 志谢

感谢Ms. Sonia Rodriguez, Erika Aldeguer和Zaira Yeste技术上的帮助。

声明: 作者宣称没有利益冲突。

## 参考文献

- 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.
- Chabner BA. Early accelerated approval for highly targeted cancer drugs[J]. *N Engl J Med*, 2011, 364(12): 1087-1089.
- Savic S, Bode B, Diebold J, et al. Detection of ALK-positive non-small-cell lung cancers on cytological specimens: high accuracy of immunocytochemistry with the 5A4 clone[J]. *J Thorac Oncol*, 2013, 8(8): 1004-1011.
- 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.
- Camidge DR, Bang YJ, Kwak EL, et al. Activity and safety of crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: updated results from a phase 1 study[J]. *Lancet Oncol*, 2012, 13(10): 1011-1019.
- Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(25): 2385-2394.
- Rodrig SJ, Mino-Kenudson M, Dacic S, et al. Unique clinicopathologic features characterize ALK-rearranged lung adenocarcinoma in the western population[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(16): 5216-5223.
- Chihara D, Suzuki R. More on crizotinib[J]. *N Engl J Med*, 2011, 364(8): 776-777; author reply 778.
- Sholl LM, Weremowicz S, Gray SW, et al. Combined use of ALK immunohistochemistry and FISH for optimal detection of ALK-rearranged lung adenocarcinomas[J]. *J Thorac Oncol*, 2013, 8(3): 322-328.
- Thunnissen E, Bubendorf L, Dietel M, et al. EML4-ALK testing in non-small cell carcinomas of the lung: a review with recommendations[J]. *Virchows Arch*, 2012, 461(3): 245-257.
- Park HS, Lee JK, Kim DW, et al. Immunohistochemical screening for anaplastic lymphoma kinase (ALK) rearrangement in advanced non-small cell lung cancer patients[J]. *Lung Cancer*, 2012, 77(2): 288-292.
- Karachaliou N, Rosell R. Optimal detection of ALK rearranged lung adenocarcinomas[J]. *J Thorac Oncol*, 2013, 8(3): 255-256.
- Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, et al. EML4-ALK fusion is linked to histological characteristics in a subset of lung cancers[J]. *J Thorac Oncol*, 2008, 3(1): 13-17.
- Li T, Maus MK, Desai SJ, et al. Large-scale screening and molecular characterization of EML4-ALK fusion variants in archival non-small-cell lung cancer tumor specimens using quantitative reverse transcription polymerase chain reaction assays[J]. *J Thorac Oncol*, 2014, 9(1): 18-25.
- 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.
- Heuckmann JM, Balke-Want H, Malchers F, et al. Differential protein stability and ALK inhibitor sensitivity of EML4-ALK fusion variants[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(17): 4682-4690.
- 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.
- 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[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(22): 5581-5590.
- 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(1): 188-200.
- 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[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2012, 136(7): 796-803.
- Tuononen K, Sarhadi V K, Wirtanen A, et al. Targeted resequencing reveals ALK fusions in non-small cell lung carcinomas detected by FISH, immunohistochemistry, and real-time RT-PCR: a comparison of four methods[J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 757490.

22. Keedy VL, Temin S, Somerfield MR, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion:epidermal growth factor receptor (EGFR) Mutation testing for patients with advanced non-small-cell lung cancer considering first-line EGFR tyrosine kinase inhibitor therapy[J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(15): 2121-2127.
23. Cancer NSCL. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology[EB]. Available online: www.nccn.com. Accessed on May 25. Version 3.2012.
24. Karachaliou N, Costa C, Gimenez-Capitan A, et al. The concomitant presence of echinoderm microtubule associated protein like 4 - anaplastic lymphoma kinase (EML4-ALK) EML4-ALK fusion gene in EGFR-mutant non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients treated with erlotinib or chemotherapy in the EURTAC trial. MO26.08 Topic: Pathology, Session: MO26-Anatomical Pathology II[C]. WCLC 2013, Mini Oral.
25. Weickhardt AJ, Aisner DL, Franklin WA, et al. Diagnostic assays for identification of anaplastic lymphoma kinase-positive non-small cell lung cancer[J]. *Cancer*, 2013, 119(8): 1467-1477.
26. Lee JA, Bubendorf L, Stahel R, et al. Testing for anaplastic lymphoma kinase rearrangement to target crizotinib therapy: oncology, pathology and health economic perspectives[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2013, 13(5): 625-636.
27. Yi ES, Chung JH, Kulig K, et al. Detection of anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene rearrangement in non-small cell lung cancer and related issues in ALK inhibitor therapy:a literature review[J]. *Mol Diagn Ther*, 2012, 16(3): 143-150.
28. Conklin CM, Craddock KJ, Have C, et al. Immunohistochemistry is a reliable screening tool for identification of ALK rearrangement in non-small-cell lung carcinoma and is antibody dependent[J]. *J Thorac Oncol*, 2013, 8(1): 45-51.
29. Martinez P, Hernández-Losa J, Montero MÁ, et al. Fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry as diagnostic methods for ALK positive non-small cell lung cancer patients[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e52261.
30. Paik JH, Choi CM, Kim H, et al. Clinicopathologic implication of ALK rearrangement in surgically resected lung cancer: a proposal of diagnostic algorithm for ALK-rearranged adenocarcinoma[J]. *Lung Cancer*, 2012, 76(3): 403-409.
31. Riely GJ, Chaft JE, Ladanyi M, et al. Incorporation of crizotinib into the NCCN guidelines[J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2011, 9(12): 1328-1330.
32. Hallberg B, Palmer RH. Mechanistic insight into ALK receptor tyrosine kinase in human cancer biology[J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(10): 685-700.
33. EML4-ALK monitoring of crizotinib response in blood platelets and plasma of NSCLC patients[C]. 15th World Conference on Lung Cancer October 27-30, 2013; Sydney, Australia. Poster Session 2: Prognostic and Predictive Biomarkers, P2.06-046.

本文引用: Teixidó C, Karachaliou N, Peg V, Gimenez-Capitan A, Rosell R. IHC、FISH和RT-PCR检测对EML4-ALK重排的一致性[J]. *临床与病理杂志*, 2015, 35(2): 189-193. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2015.02.005

本文首先以英文发表于 *Transl Lung Cancer Res*, 2014, 3(2): 70-74. 本文已获 *Translational lung cancer research* 和作者同意将该文内容以中文在本刊发表。