

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2016.12.013

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2016.12.013

非小细胞肺癌胸水细胞块ALK融合基因检测分析

朱礼阳¹, 徐建平², 于忠和¹, 赵洁婷², 叶伟², 朱东波², 孙晓², 宋蓉蓉², 许春伟³

(1. 陆军总医院肿瘤科, 北京 100700; 2. 安徽省胸科医院病理科, 合肥 230032;
3. 福建省肿瘤医院病理科, 福州 350014)

[摘要] 目的: 探讨非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)胸水细胞块在间变性淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase, ALK)融合基因检测中的临床价值。方法: 采用突变扩增系统PCR(ARMS-PCR)法检测215例NSCLC细胞块和404例NSCLC组织块中ALK基因三类融合类型, 并检测细胞块同时送检组织块的患者74例的一致性。结果: 细胞块ALK基因融合阳性26例, 阳性率12.09%(26/215); 组织块ALK基因融合阳性25例, 阳性率6.19%(25/404); 74例有组织块对照的细胞块ALK融合基因结果一致性有67例, 一致率达90.54%(67/74), 其中细胞块ALK融合基因的阳性率14.86%(11/74), 组织块阳性率18.92%(14/74)。结论: NSCLC胸水细胞块ALK融合基因的阳性率略高于组织块; 有恶性胸水的NSCLC患者原发灶组织发生ALK融合基因阳性的概率较高。

[关键词] 肺肿瘤; 非小细胞肺癌; 细胞块; 间变性淋巴瘤激酶

Analysis of cell blocks ALK fusion gene in pleural effusion of non-small cell lung cancer

ZHU Liyang¹, XU Jianping², YU Zhonghe¹, ZHAO Jieting², YE Wei², ZHU Dongbo², SUN Xiao²,
SONG Rongrong², XU Chunwei³

(1. Department of Oncology, Army General Hospital, Beijing 100700; 2. Department of Pathology, Anhui Chest Hospital, Hefei 230032;
3. Department of Pathology, Fujian Provincial Cancer Hospital, Fuzhou 350014, China)

Abstract **Objective:** To investigate the clinical value of the cell blocks for anaplastic lymphoma kinase (ALK) fusion gene detection in non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods:** 215 cases of cell block from pleural effusion of non-small cell lung cancer were collected. Three types of ALK fusion and 404 cases of tissue block were detected by ARMS-PCR method. The consistency of ALK fusion was examined in 74 cases of patients with tissue block and cell block. **Results:** ALK fusion was found in 26 of 215 cell blocks, the positive detection rate was 12.09%. ALK fusion was detected in 25 of 404 tissue blocks, the positive detection rate was 6.19%. 67 cases in the 74 (90.54%) cases had the same result as tissue block. ALK fusion was detected in 11 of 74 (14.86%) cell blocks, and 14 of 74

收稿日期 (Date of reception): 2016-10-14

通信作者 (Corresponding author): 许春伟, Email: xuchunweibbb@163.com; 于忠和, Email: 773080192@qq.com

基金项目 (Foundation item): 国家自然科学基金 (81372489), 北京市科技计划课题 (2131100006813032)。This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81372489), Beijing Municipal Science and Technology Plan Project (2131100006813032), P. R. China.

(18.92%) tissue blocks. **Conclusion:** The rate of *ALK* fusion in cell blocks of non-small cell lung cancer is higher than that in matched tissue blocks. The patients with malignant pleural effusion are likely to tend to *ALK* fusion.

Keywords lung neoplasm; non-small cell lung cancer; cell block; *ALK*

肺癌作为常见恶性肿瘤之一, 基于生物学特性、治疗和预后, 可将肺癌可分为非小细胞肺癌和小细胞肺癌, 其中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占80%~85%^[1-4]。随着靶向药物的不断更新, 间变性淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase, *ALK*)融合基因依然是靶向治疗前的必检基因。研究^[5-6]发现*ALK*融合基因中所有*ALK*基因融合都发生在20号外显子编码的一段序列, NSCLC中90%以上均为*EML4-ALK*基因融合, 而*EML4*断裂点则表现出多变性, 已经检测到的断裂点有2、6、13、14、15、17、18、20号外显子, 形成了多种*EML4-ALK*融合基因型, 非*EML4-ALK*融合基因(包括*KIF5B-*、*KLC1-*、*TFG*、*GCC2-*、*CUX11-*、*KIF3A-*、*PPFIBP1-*、*ZNF2-*)等仅占不到10%。它们中的大部分被证实有促进肿瘤生成的活性^[5]。在NSCLC中, *EML4*以及非*EML4*的*ALK*融合基因因其对*ALK*抑制剂Crizotinib应答良好^[7], 已成为当前研究的热点。目前*ALK*融合基因检测样本类型也在组织块、细胞涂片、细胞蜡块和血液样本均得到验证。目前, 脱落细胞制成细胞块的*ALK*融合基因检测的报道较少, 本文着重探讨NSCLC胸水细胞块检测*ALK*融合基因的临床价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本

收集安徽省胸科医院自2012年1月至2016年8月诊断为NSCLC的组织标本404例和细胞块215例。组织块标本来源于胸膜、肺穿刺和手术标本, 细胞块标本来源于胸水。本研究经安徽省胸科医院伦

理委员会批准, 所有患者均知情同意。

1.1.2 细胞块的制备

将新鲜胸水混匀后收集50 mL于离心管内, 2 000 r/min离心5 min, 弃上清液, 如沉淀量不够, 可反复离心收集(血性标本先加入3%醋酸乙醇10 mL, 振荡均匀, 2 000 r/min 5 min, 去除血细胞干扰); 向沉淀中加10%中性福尔马林5 mL, 振荡, 2 000 r/min离心5 min, 弃上清液; 向沉淀中加95%乙醇10 mL, 振荡混匀, 2 000 r/min离心10 min, 弃上清液; 底部沉淀镊取到擦镜纸上, 包好, 与常规组织一起行脱水处理, 制成细胞石蜡块。

1.1.3 实时荧光定量PCR检测NSCLC细胞块和组织中*ALK*融合基因

实时荧光定量PCR对*ALK*融合基因进行体外扩增: 显微镜下确认肿瘤细胞后, 取4 μ m厚度的细胞块和组织块切片4~8片, 脱蜡; 并按照提取基因组RNA试剂盒(QIAamp RNA FFPE Kit, 德国QIAGEN公司)说明书提供的方法提取组织RNA。应用分光光度计检测所提取RNA的纯度和浓度按照*ALK*融合基因定性检测试剂盒(厦门艾德生物医药科技有限公司)说明书提供的方法, 反转录为cDNA后, 在Mx3000P实时荧光定量PCR仪(美国Stratagene公司)中进行扩增。该试剂盒包含*ALK*融合基因类型改变见表1。

1.2 统计学处理

所有数据采用SPSS19.0统计软件, 结果运用 χ^2 及Fisher确切概率法, 检验水准 $\alpha=0.05$, 并设定P值为双侧分布, 且以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。Kappa >0.75 为一致性极好, $0.4 \leq \text{Kappa} \leq 0.75$ 为一致性良好, Kappa <0.4 为一致性差。

表1 *ALK*融合基因类型

Table 1 The subtypes of *ALK* fusion gene

| 类别 | <i>ALK</i> 融合基因 |
|----|---|
| A | <i>E6:A19</i> 、 <i>E6:A20</i> 、 <i>E6ins33:A20</i> 、 <i>E6;ins18A20</i> 、 <i>E13:A20</i> 、 <i>E13;ins69A20</i> 、 <i>E20:A20</i> 、 <i>E20;ins18A20</i> |
| B | <i>E14ins11;del49A20</i> 、 <i>E14;del14A20</i> 、 <i>E14;del38A20</i> 、 <i>E15del60;del71A20</i> |
| C | <i>E2:A20</i> 、 <i>E2;ins117A20</i> 、 <i>E3;ins53A20</i> 、 <i>E17;ins30A20</i> 、 <i>E17ins61;ins34A20</i> 、 <i>E17ins65;A20</i> 、 <i>E17;ins68A20</i> 、 <i>E17del58;ins39A20</i> 、 <i>E18:A20</i> |
| D | <i>KI17;A20</i> 、 <i>KI24;A20</i> 、 <i>KL9;A20</i> 、 <i>T4;A20</i> |

2 结果

2.1 细胞块和组织块 ALK 融合基因阳性率

215例细胞块中, ALK融合基因阳性26例, 阳性率为12.09%(26/215), 其中女性19例, 男性7例。404例组织块中, ALK融合基因阳性25例, 阳性率为6.19%(25/404), 其中女性16例, 男性9例(表2)。

表2 ALK融合基因阳性检测结果

Table 2 The results of ALK gene fusion detection

| 分组 | n | ALK融合基因 | |
|-----|-----|---------|-------|
| | | 阳性数 | 阳性率/% |
| 细胞块 | 215 | 26 | 12.09 |
| 组织块 | 404 | 25 | 6.19 |

2.2 配对细胞块和组织块 ALK 融合基因检测

74例有组织块对照的细胞块中, ALK融合基因阳性11例, 阳性率为14.86%; 74例组织块中, ALK融合基因阳性14例, 阳性率为18.92%。两种蜡块检测结果一致的有67例, 其中二者共同阳性9例, 共同阴性58例, 一致率为90.54%(67/74); 细胞块阳性、组织块阴性2例, 细胞块阴性、组织块阳性5例, 两组相比差异有统计学意义($\chi^2=28.682$, $P<0.001$), Kappa=0.671(表3)。

表3 组织块对照的细胞块检测对比结果

Table 3 Comparison of detection result between cell blocks and tissues

| 组织蜡块 | 细胞块 | | χ^2 | P |
|------|-----|----|----------|--------|
| | 阳性 | 阴性 | | |
| 阳性 | 9 | 5 | 28.682 | <0.001 |
| 阴性 | 2 | 58 | | |

3 讨论

ALK融合基因可见于多种肿瘤, 例如间变性大细胞淋巴瘤、炎性成肌纤维细胞瘤、成神经细胞瘤和NSCLC等。目前NSCLC患者或细胞株中发现的EML4-ALK融合基因类型常见的有21种, 非EML4-ALK融合基因包括KIF5B、KLC1、TFG、GCC2、CUX11、KIF3A、PPFIBP1、ZNF2、SOCS5和HIP1^[8-20]; NSCLC患者发生率3%~10%; EML4-ALK融合基因在年轻非/少吸烟腺

癌患者中流行程度高^[21]; 针对ALK融合的抑制剂Crizotinib、Ceritinib以及Alectinib在治疗ALK融合基因阳性的NSCLC患者中都取得了巨大成功, 而ALK融合基因检测是靶向ALK治疗的前提。

目前国内研究报道指出胸水细胞块是检测NSCLC中ALK融合基因的有效途径。2016年Wang等^[22]研究发现NSCLC胸水细胞块ALK融合基因检测结果与组织学一致。2014年王逸飞等^[23]研究发现难以获得组织标本的肺癌患者可选用ARMS法检测肺癌患者胸水细胞块中ALK以指导Crizotinib的应用。本组结果显示, 细胞块的NSCLC患者ALK融合基因阳性率略高于组织块, 提示具有转移性的NSCLC患者有更高的ALK融合基因阳性率。在既有组织块对照的细胞块中, ALK融合基因阳性11例, 阳性率为14.86%; 对应组织块中, ALK融合基因阳性14例, 阳性率为18.92%。两种蜡块检测结果一致的有67例, 其中二者共同阳性9例, 共同阴性58例, 一致率为90.54%(67/74); 细胞块阳性、组织块阴性2例, 细胞块阴性、组织块阳性5例, 两组相比差异有统计学意义($\chi^2=28.682$, $P<0.001$), Kappa=0.671, 结果不一致的原因可能由于肿瘤空间异质性引起或肿瘤中ALK融合基因阳性细胞含量多少引起, 胸水细胞块中若低于检测阳性阈值则会导致假阴性结果产生。

综上所述, 应用细胞学标本、细胞块检测ALK融合基因, 结果确实可信; 细胞块解决了脱落细胞无法检测融合基因和连续切片的问题, 具有一定临床应用价值。

参考文献

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(1): 10-29.
2. Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
3. Sher T, Dy GK, Adjei AA. Small cell lung cancer[J]. Mayo Clin Proc, 2008, 83(3): 355-367.
4. Burgess TL, Sun J, Meyer S, et al. Biochemical characterization of AMG 102: a neutralizing, fully human monoclonal antibody to human and nonhuman primate hepatocyte growth factor[J]. Mol Cancer Ther, 2010, 9(2): 400-409.
5. 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.
6. Takahashi T, Sonobe M, Kobayashi M, et al. Clinicopathologic Features

- of Non-Small-Cell Lung Cancer with EML4-ALK Fusion Gene[J]. *Ann Surg Oncol*, 2010, 17(3): 889-897.
7. Camidge D, Bang Y, Kwak E, et al. Progression-free survival (PFS) from a phase I study of crizotinib (PF 02341066) in patients with ALK-positive non-small cell lung cancer (NSCLC)[J]. *J Clin Oncol*, 2010, 29(15): 2696.
 8. Merlin E, Chabrier SV, Cramer E, et al. Primary leptomeningeal ALK+ lymphoma in a 13-year-old child[J]. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2008, 30(12): 963-967.
 9. Garber K. ALK, lung cancer, and personalized therapy: portent of the future?[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2010, 102(10): 672-675.
 10. Röttgers S, Gombert M, Teiglerschlegel A, et al. ALK fusion genes in children with atypical myeloproliferative leukemia[J]. *Leukemia*, 2010, 24(6): 1197-1200.
 11. Roosbroeck KV, Cools J, Dierickx D, et al. ALK-positive large B-cell lymphomas with cryptic SEC31A-ALK and NPM1-ALK fusions[J]. *Haematologica*, 2010, 95(3): 509-513.
 12. Barreca A, Lasorsa E, Riera L, et al. Anaplastic lymphoma kinase in human cancer[J]. *J Mol Endocrinol*, 2011, 47(1): 123-143.
 13. Grande E, Bolós MV, Arriola E. Targeting oncogenic ALK: a promising strategy for cancer treatment[J]. *Mol Cancer Ther*, 2011, 10(4): 569-579.
 14. Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, et al. Pulmonary Inflammatory Myofibroblastic Tumor Expressing a Novel Fusion, PPFIBP1-ALK: Reappraisal of Anti-ALK Immunohistochemistry as a Tool for Novel ALK Fusion Identification[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(10): 3341-3348.
 15. Wang WY, Gu L, Liu WP, et al. ALK-positive extramedullary plasmacytoma with expression of the CLTC-ALK fusion transcript[J]. *Pathol Res Pract*, 2011, 207(9): 587-591.
 16. Jung Y, Kim P, Jung Y, et al. Discovery of ALK-PTPN3 gene fusion from human non-small cell lung carcinoma cell line using next generation RNA sequencing[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2012, 51(6): 590-597.
 17. 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*, 2011, 18(3): 382-384.
 18. Ren H, Tan ZP, Zhu X, et al. Identification of Anaplastic Lymphoma Kinase as a Potential Therapeutic Target in Ovarian Cancer[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(13): 3312-3323.
 19. Togashi Y, Soda M, Sakata S, et al. KLC1-ALK: A Novel Fusion in Lung Cancer Identified Using a Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Only[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e31323.
 20. Shan L, Jiang P, Xu F, et al. BIRC6-ALK, a Novel Fusion Gene in ALK Break-Apart FISH-Negative Lung Adenocarcinoma, Responds to Crizotinib[J]. *J Thorac Oncol*, 2015, 10(6): 37-39.
 21. Chunwei XU, Wang G, Wang W, et al. Association between EML4-ALK fusion gene and thymidylate synthase mRNA expression in non-small cell lung cancer tissues[J]. *Exp Ther Med*, 2015, 9(6): 2151-2154.
 22. Wang Y, Liu Y, Zhao C, et al. Feasibility of cytological specimens for ALK fusion detection in patients with advanced NSCLC using the method of RT-PCR[J]. *Lung Cancer*, 2016, 94(3): 28-34.
 23. 王逸飞, 于忠和. 实时荧光定量PCR法检测肺腺癌患者恶性胸腔积液中EML4-ALK融合基因突变的研究[J]. *临床肺科杂志*, 2014, 19(7): 1286-1288.
- WANG Yifei, YU Zhonghe. Research of real-time fluorescent PCR to test the expression of EML4-ALK in pleural effusion fluid of patients with lung adenocarcinoma[J]. *Journal of Clinical Pulmonary Medicine*, 2014, 19(7): 1286-1288.

本文引用: 朱礼阳, 徐建平, 于忠和, 赵洁婷, 叶伟, 朱东波, 孙晓, 宋蓉蓉, 许春伟. 非小细胞肺癌胸水细胞块间ALK融合基因检测分析[J]. *临床与病理杂志*, 2016, 36(12): 1961-1964. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2016.12.013

Cite this article as: ZHU Liyang, XU Jianping, YU Zhonghe, ZHAO Jieting, YE Wei, ZHU Dongbo, SUN Xiao, SONG Rongrong, XU Chunwei. Analysis of cell blocks ALK fusion gene in pleural effusion of non-small cell lung cancer[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2016, 36(12): 1961-1964. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2016.12.013