

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.24.007

文章编号: 1005-8982(2017)24-0034-05

非小细胞肺癌恶性胸水中癌细胞 *EML4-ALK* 重排检测及其临床意义

王莉, 韩永红, 曾娟, 李军

(华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院 肿瘤科, 湖北 武汉 430014)

摘要:目的 探讨非小细胞肺癌(NSCLC)患者恶性胸水(MPE)中癌细胞 *EML4-ALK* 基因重排的可行性及其与病理特征之间的关系。**方法** 选取 138 例伴有 MPE 的 NSCLC 患者,用瑞氏染色法鉴定 MPE 中的癌细胞,用免疫组织化学法鉴定肿瘤组织中 *EML4-ALK* 基因重排,运用微流控芯片技术检测 NSCLC 患者 MPE 中癌细胞,采用荧光染色法确定癌细胞,采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 *ALK* 基因重排状态。**结果** 在 138 例 NSCLC 患者中,肿瘤组织免疫组织化学(IHC)染色有 10 例 *EML4-ALK* 基因阳性,qRT-PCR 检测到 10 例 *EML4-ALK* 融合基因重排。IHC 和 qRT-PCR 的一致性为 100%,两者敏感性和特异性均为 100%。*ALK* 基因重排状况与患者 *EGFR* 突变等差异有统计学意义($P < 0.05$),而与病理分型、原发部位、临床分期及淋巴结转移等差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** qRT-PCR 检测 NSCLC 患者 MPE 中癌细胞 *EML4-ALK* 融合基因是筛选 *ALK* 基因重排方法的一种补充,值得在临床中推广。

关键词: 非小细胞肺癌;恶性胸水;棘皮动物微管相关类蛋白 4 和间变性淋巴瘤激酶

中图分类号: R730.43

文献标识码: A

Detection of *EML4-ALK* gene rearrangement in NSCLC cells and its clinical significance

Li Wang, Yong-hong Han, Juan Zeng, Jun Li

(Department of Oncology, The Central Hospital of Wuhan, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430014, China)

Abstract: Objective To investigate the application of detecting echinoderm microtubule-associated protein-like 4-anaplastic lymphoma kinase (*EML4-ALK*) gene rearrangement by qRT-PCR in non-small cell lung cancer cells (NSCLC), and to evaluate the relationship between *EML4-ALK* gene rearrangement and clinical relevance. **Methods** A total of 138 patients confirmed with NSCLC in malignant pleural effusion (MPE) were recruited in this study. Cancer cells in MPE were identified by Wright's staining and microfluidic chip technology. *EML4-ALK* gene rearrangement in cancer cells was determined by Immunohistochemistry (IHC), and quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR). **Results** Ten out of 138 (7.25%) patients were identified with *EML4-ALK* rearrangement by IHC, who were also verified by qRT-PCR. Sensitivity and specificity of IHC and qRT-PCR were 100%. The *EML4-ALK* gene rearrangement was correlated with *EGFR* mutation ($P < 0.05$), while no relation between the *EML4-ALK* gene rearrangement and tumor characters including histological type, site of primary onset, clinical stage and lymphatic metastasis ($P > 0.05$). **Conclusions** qRT-PCR is a reliable method for detection of *EML4-ALK* rearrangement detection in NSCLC.

Keywords: non-small-cell lung cancer; malignant pleural effusions; echinoderm microtubule-associated protein-like4 -anaplastic lymphoma kinase

肺癌每年新发病例约 150 万,其中,约 85%为非小细胞肺癌(non small cell lung cancer, NSCLC),肺癌是全世界癌症相关性死亡的首要原因。化疗是治疗恶性肿瘤最重要的手段之一,然而肿瘤细胞对化疗药物产生耐药使得效果不尽人意。靶向药物在肿瘤临床中应用越来越广泛,棘皮动物微管相关类蛋白 4(echinoderm microtubule-associated protein-like 4, *EML4*) 基因和间变性淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase, *ALK*)融合基因,被证实为 NSCLC 的一个重要致癌驱动因子,也是克唑替尼的主要治疗靶基因^[1]。恶性胸水(malignant pleural effusions, MPE)是中晚期 NSCLC 的一种常见的严重并发症,约 15%的肺癌患者在诊断时就出现 MPE,而且 50%的 NSCLC 患者 MPE 为细胞学检查阳性。临床上获得 MPE 具有微创、反复多次及易于操作等特点,使得 MPE 可能替代肿瘤组织用于基因检测,但是 MPE 中癌细胞数量较少,还混有炎症细胞、间皮细胞等, MPE 中癌细胞纯度较低。笔者用微流控芯片技术提取 MPE 中的癌细胞,然后用实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测 *EML4-ALK* 重排,探讨检测 MPE 中癌细胞 *EML4-ALK* 重排能否作为一种非组织来源的替代方法。

1 材料与与方法

1.1 一般资料

选取 2012 年 4 月 -2014 年 4 月在本院入住的患者 138 例经组织病理学证实 III - IV 期的 NSCLC。其中,男性 98 例,女性 40 例。详细记录患者的病理分型、原发部位、临床分期、淋巴结转移及表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)突变等资料。本研究经医院伦理委员会的批准和受试对象知情同意。

1.2 恶性胸水中癌细胞的鉴定

取 50 ml 恶性胸水行常规的瑞氏染色,紫色为癌细胞,由 2 位有经验的病理医师在荧光显微镜下独立观察细胞染色情况,有分歧时由第 3 人协助判定。

1.3 NSCLC 癌组织中 *EML4-ALK* 基因免疫组织化学染色

术中取得的肿瘤组织或者纤维支气管镜活检取得的组织,采用 EnVision 二部法。所用一抗克隆号为 D5F3,一抗和二抗(购自瑞士罗氏公司),操作采用全自动免疫组织化学(免疫组化)染色机进行。

1.4 恶性胸水中癌细胞捕获和释放

在诊断性或治疗性排放恶性胸水时取最后一管恶性胸水 50 ml,以 3 000 r/min 离心 10 min,取沉淀物再悬浮于 1 ml 磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)中备用。微流控纳米芯片的制作和修饰过程请参见文献[2],每个芯片加上 250 μ l 的 Streptavidin(浓度为 250 μ g/ml),置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜;组装芯片,并用 0.5 ml 的 PBS 冲洗 1 次,流速为 0.5 ml/h;用注射器加入 500 μ l 浓度为 200 μ g/ml 的上皮细胞黏附分子,在常温下孵育 45 min,再用 0.5 ml 的 PBS 冲洗 1 次;将 1 ml 的恶性胸水以 0.5 ml/h 的速度流过芯片,最后用并用 0.5 ml 的 PBS 冲洗 1 次,流速为 0.5 ml/h,卸载芯片并保存在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中。

1.5 免疫组化染色

将捕获癌细胞的芯片用 4%的甲醛溶液固定 15 min,然后用 200 μ l 的 PBS 冲洗。对样品进行免疫组化染色,其中先用异硫氰酸荧光素标记的细胞角蛋白抗体(200 μ g/ml)200 μ l 在常温下孵育 45 min,然后用 200 μ l 的 PBS 轻轻冲洗芯片;再用花氰染料 5 荧光染料标记的白细胞共同抗原 CD45 抗体(200 μ g/ml)在常温下孵育 45 min,然后用 200 μ l 的 PBS 轻轻冲洗芯片;最后用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(10 μ g/ml)200 μ l 在常温下孵育 10 min,然后用 200 μ l 的 PBS 轻轻冲洗芯片。对固定在纳米芯片上特异性捕获的癌细胞和非特异性捕获的白细胞,用荧光显微镜进行鉴别确认。

1.6 qRT-PCR 检测 *EML4-ALK* 基因重排

将捕获在纳米芯片上的癌细胞用胰酶处理后,可释放出高纯度的癌细胞。然后提取癌细胞的总核糖核酸(ribonucleic acid, RNA),每例样品提起 30 ~ 300 ng 的 RNA 在 42 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 和 95 $^{\circ}$ C 孵育 5 min 后逆转录为互补脱氧核糖核酸,然后置于冰中冷却。qRT-PCR 依据试剂公司操作说明书进行操作。在每个样本的 qRT-PCR 进行以下 4 个反应^[3]。所有的 4 个实验在 Mx3000P qRT-PCR 设备执行(美国安捷伦科技公司)。qRT-PCR 程序进行如下:初始在 95 $^{\circ}$ C 下变性 5 min,随后 95 $^{\circ}$ C 保持 25 s,在 64 $^{\circ}$ C 保持 20 s,72 $^{\circ}$ C 保持 20 s,循环 15 次;93 $^{\circ}$ C 保持 25 s,60 $^{\circ}$ C 保持 35 s,72 $^{\circ}$ C 保持 20 s,循环 31 次。定量判断根据融合荧光信号强度。测定得 Ct 值 \leq 30 周期被认定癌细胞中检测到 *EML4-ALK* 基因重排。用看家基因确保 RNA 的完整性。阳性对照和阴性对照确保试验

效率。

1.7 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 与 GraphPad Prism 5.0 统计软件,计数资料以率(%)表示,采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NSCLC 患者恶性胸水中癌细胞 *EML4-ALK* 融合基因重排与临床病理特征的相关性

不同病理分型、不同原发部位、不同临床分期以及淋巴结转移有无间的 *EML4-ALK* 融合基因重排

阳性率的比较,经 χ^2 检验,差异均无统计学意义; EGFR 突变有无间 *EML4-ALK* 融合基因重排阳性率的比较,经 χ^2 检验,差异有统计学意义($\chi^2=5.132$, $P=0.023$)。见附表。

2.2 NSCLC 患者恶性胸水中癌细胞的鉴定结果

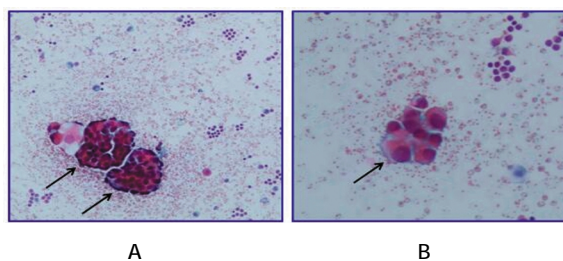
对恶性胸水中癌细胞经瑞氏染色后,通过荧光显微镜观察拍照,癌细胞为紫色且细胞直径范围为 $10 \sim 40 \mu\text{m}$,见图 1。

2.3 NSCLC 患者恶性胸水中癌细胞的鉴定结果

对捕获的癌细胞行免疫组化染色,通过荧光显微镜观察拍照,可以明确鉴别出癌细胞(DAPI⁺/FITC⁻/

附表 NSCLC 患者不同临床病理特征 *EML4-ALK* 融合基因重排阳性率的比较

临床病理特征	例数($n=138$)	EML4-ALK 重排			χ^2 值	P 值
		阳性例数	阳性率 /%	阴性例数		
病理分型						
腺癌	105	6	5.71	99	1.533	0.216
非腺癌	33	4	12.12	29		
原发部位						
左	59	4	6.78	55	0.033	0.855
右	79	6	7.59	73		
临床分期						
III	57	3	5.26	54	0.568	0.451
IV	81	7	8.64	74		
淋巴结转移						
有	86	6	6.97	80	0.025	0.875
无	52	4	7.69	48		
EGFR 突变						
有	21	4	19.05	17	5.132	0.023
无	117	6	5.12	111		



A: 黑色箭头处为癌细胞团; B: 黑色箭头处为癌细胞团

图 1 恶性胸水中癌细胞 (瑞氏染色 $\times 400$)

Cy5⁺)和恶性胸水中的白细胞(DAPI⁺/FITC⁻/Cy5⁺)。见图 2。

2.4 NSCLC 癌组织中 *EML4-ALK* 基因免疫组织化学染色结果

在 138 例 NSCLC 中,对癌组织行免疫组化染色,

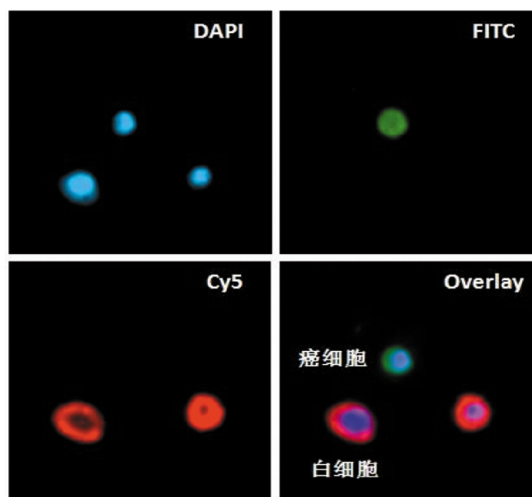
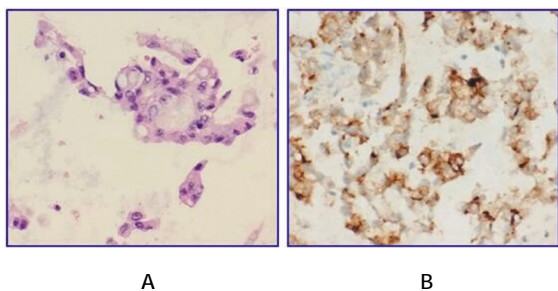


图 2 恶性胸水中的癌细胞和白细胞

阳性表达的判定标准:肿瘤细胞胞质内出现强染色颗粒,发现有 10 例 *EML4-ALK* 基因重排阳性 7.25%(10/138),阳性染色。见图 3。

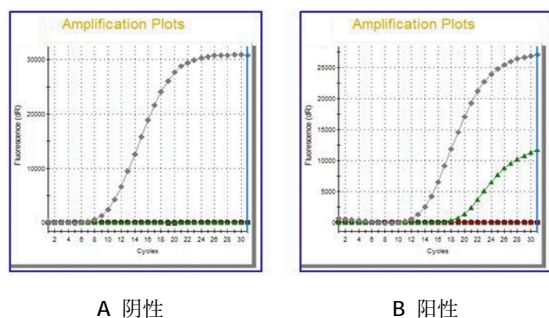
2.5 qRT-PCR 检测 *EML4-ALK* 基因重排结果

恶性胸水中癌细胞用 qRT-PCR 检测 *EML4-ALK* 基因重排,其中,有 10 例为阳性,剩余为阴性,阳性率为 7.25%(10/138),阴性和阳性结果见图 4。



A: NSCLC 组织常规病理染色(HE × 100); B: *EML4-ALK* 基因免疫组化染色(× 100)

图 3 NSCLC 癌组织中 *EML4-ALK* 基因免疫组化染色结果



A 阴性 B 阳性
图 4 恶性胸水中癌细胞 qRT-PCR 检测 *EML4-ALK* 基因重排

3 讨论

EML4-ALK 融合基因由第 2 号染色体短臂插入形成,其嵌合产物可导致 *ALK* 酪氨酸激酶持续高表达,从而激活下游 *PI3K/AKT*、*MAPK* 等信号通路,导致肿瘤的发生和转移^[6]。在临床上应用 *ALK* 抑制剂克唑替尼已对 *ALK* 融合基因阳性的 NSCLC 的患者产生获益^[5-7],克唑替尼治疗 *ALK* 阳性的 NSCLC 患者客观有效率达 60%^[7]。而 NSCLC 中 *EML4-ALK* 阳性率为 3%~8%^[8]。因此,筛选 NSCLC 中 *EML4-ALK* 重排阳性率高的目标人群进行靶向治疗具有重要的临床意义。

免疫组化检测 *EML4-ALK* 基因重排具有价廉和省时的特点,已被广泛应用于临床。WANG 等^[9]研究发现,通过 IHC 法和 FISH 法检测 MPE 中 *EML4-*

ALK 基因重排的结果是完全一致的。JIANG 等^[10]在肿瘤组织中两种方法检测结果也一致。在本研究中,用免疫组化检测肿瘤组织中 *EML4-ALK* 重排阳性率为 7.25%(10/138),用 qRT-PCR 检测 MPE 中癌细胞的 *EML4-ALK* 重排阳性率为 7.25%(10/138)。免疫组织化学和 qRT-PCR 两种检测方法一致率为 100%,敏感性为 100%(10/10),特异性也为 100%(128/128)。本研究结果表明,用 qRT-PCR 检测 MPE 中癌细胞 *EML4-ALK* 重排是一种非组织来源的 *EML4-ALK* 检测替代方法。

获取肿瘤组织常代表某个时间点^[11],有时甚至无有效组织可用,因此用 IHC 法对肿瘤组织的染色检测 *EML4-ALK* 重排存在一定的局限性。与组织样品的检测相比,MPE 的获得具有微创、反复多次及易于操作等特点^[12-15],用 qRT-PCR 检测 MPE 中癌细胞 *EML4-ALK* 重排可以实时动态反映患者的状况,可以用于靶向治疗药物疗效监测等。本研究中采用微流控芯片技术获得 MPE 中癌细胞纯度高,qRT-PCR 也是一个敏感高效的方法,因此用 qRT-PCR 检测 MPE 中癌细胞 *EML4-ALK* 重排在临床实践中具有极大的推广应用价值。

综上所述,笔者的研究表明,基于 MPE 中癌细胞的 *EML4-ALK* 检测与基于肿瘤组织的 *EML4-ALK* 检测具有高度的一致性,证实利用 MPE 中癌细胞检测 *EML4-ALK* 重排是一种可行和可靠的非组织来源的替代方法。在肿瘤临床中获得 MPE 具有微创、反复多次及易于操作等优点,检测 MPE 中癌细胞的 *EML4-ALK* 重排不但可以指导 NSCLC 的靶向治疗,而且可以用于动态监测药物的反应和疾病的进展情况,值得在临床工作中进一步推广。

参 考 文 献:

- [1] CHOI Y L, TAKEUCHI K, SODA M, et al. Identification of novel isoforms of the *EML4-ALK* transforming gene in non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(13): 4971-4976.
- [2] SHEN Q, PENG C, ZHAN Y, et al. Aptamer-polymer functionalized silicon nanosubstrates for enhanced recovered circulating tumor cell viability and in vitro chemosensitivity testing[J]. *Int J Nanomedicine*, 2016, 2016(11): 2133-2146.
- [3] ZHONG J, LI X, BAI H, et al. Malignant pleural effusion cell blocks are substitutes for tissue in *EML4-ALK* rearrangement detection in patients with advanced non-small-cell lung cancer[J]. *Cytopathology*, 2016, 27(6): 433-443.
- [4] FU S, WANG F, SHAO Q, et al. Detection of *EML4-ALK* fusion gene in Chinese non-small cell lung cancer by using a

- sensitive quantitative real-time reverse transcriptase PCR technique[J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2015, 23(4): 245-254.
- [5] CHIARI R, DURANTI S, LUDOVINI V, et al. Long-term response to gefitinib and crizotinib in lung adenocarcinoma harboring both epidermal growth factor receptor mutation and EML4-ALK fusion gene[J]. *J Clin Oncol*, 2014, 32(9): e30-32.
- [6] FONTANA D, CECCON M, GAMBACORTI-PASSERINI C, et al. Activity of second-generation ALK inhibitors against crizotinib-resistant mutants in an NPM-ALK model compared to EML4-ALK[J]. *Cancer Med*, 2015, 4(7): 953-965.
- [7] TAMIYA A, OKAMOTO I, MIYAZAKI M, et al. Severe acute interstitial lung disease after crizotinib therapy in a patient with EML4-ALK-positive non-small-cell lung cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(1): e15-17.
- [8] GOVINDAN R. Hope without hype: EML4-ALK inhibition for treatment of lung cancer[J]. *Lancet Oncol*, 2011, 12(11): 983-984.
- [9] WANG W, TANG Y, LI J, et al. Detection of ALK rearrangements in malignant pleural effusion cell blocks from patients with advanced non-small cell lung cancer: a comparison of Ventana immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization [J]. *Cancer Cytopathol*, 2014, 123(2): 117-122.
- [10] JIANG L, YANG H, HE P, et al. Improving selection criteria for ALK inhibitor therapy in non-small cell lung cancer: a pooled-data analysis on diagnostic operating characteristics of immunohistochemistry[J]. *Am J Surg Pathol*, 2016, 40(5): 697-703.
- [11] MARTELLI M P, SOZZI G, HERNANDEZ L, et al. EML4-ALK rearrangement in non-small cell lung cancer and non-tumor lung tissues[J]. *Am J Pathol*, 2009, 174(2): 661-670.
- [12] TAMIYA M, TAMIYA A, YASUE T, et al. Vascular endothelial growth factor in plasma and pleural effusion is a biomarker for outcome after bevacizumab plus carboplatin-paclitaxel treatment for non-small cell lung cancer with malignant pleural effusion[J]. *Anticancer Res*, 2016, 36(6): 2939-2944.
- [13] MATIKAS A, KENTEPOZIDIS N, GEORGOULIAS V, et al. Management of resistance to crizotinib in anaplastic lymphoma kinase-positive non-small-cell lung cancer[J]. *Clin Lung Cancer*, 2016, 17(6): 474-482.
- [14] CHEN Y L, LEE C T, LU C C, et al. Epidermal growth factor receptor mutation and anaplastic lymphoma kinase gene fusion: detection in malignant pleural effusion by RNA or PNA analysis[J]. *PLoS One*, 2016, 11(6): e0158125.
- [15] AKAMATSU H, KOH Y, KENMOTSU H, et al. Multiplexed molecular profiling of lung cancer using pleural effusion [J]. *J Thorac Oncol*, 2014, 9(7): 1048-1052.

(王荣兵 编辑)