

# 非小细胞肺癌组织中 EML4-ALK 融合基因与 ERCC1 和 RRM1 mRNA 表达的关系

田宁 张侠 高文斌 许春伟 张玉萍

**【摘要】** 目的 探讨 NSCLC 组织中棘皮动物微管样蛋白 4-间变淋巴瘤激酶 (EML4-ALK) 融合基因与切除修复交叉互补蛋白 1 (ERCC1) 和核苷酸还原酶亚单位 M1 (RRM1) mRNA 表达的关系。方法 应用实时荧光定量 PCR 方法检测 257 例 NSCLC 组织中 EML4-ALK 基因以及 ERCC1 和 RRM1 mRNA 的表达。结果 NSCLC 组织中 EML4-ALK 融合基因阳性率占 4.28% (11/257), 在不吸烟患者中较高 ( $P < 0.05$ ); ERCC1 mRNA 高表达占 47.47% (122/257), RRM1 mRNA 高表达占 61.87% (159/257)。与未检测到 EML4-ALK 融合基因阳性的 NSCLC 患者比较, EML4-ALK 融合基因阳性与 ERCC1 mRNA 表达水平无关 ( $P > 0.05$ ); NSCLC 组织中, EML4-ALK 融合基因阳性与 RRM1 mRNA 表达水平无关 ( $P > 0.05$ ); 但 ERCC1 mRNA 表达水平与 RRM1 mRNA 表达水平相关 ( $P < 0.05$ )。结论 NSCLC 组织中 EML4-ALK 融合基因阳性患者不能从以铂类和他滨类一线化疗药中获益, 因此仍需进一步探索更有效的个体化治疗方案, 特别是对 EML4-ALK 融合基因选择性抑制剂克唑替尼原发或继发耐药部分患者的个体化治疗方案。

**【关键词】** 癌, 非小细胞肺; 棘皮动物微管样蛋白 4-间变淋巴瘤激酶; 切除修复交叉互补蛋白 1; 核苷酸还原酶亚单位 M1; 分子检测; 个体化治疗

**The relations of EML4-ALK fusion gene and the mRNA expression of ERCC1 and RRM1 in NSCLC tissue**  
TIAN Ning, ZHANG Xia, GAO Wen-bin, XU Chun-wei, ZHANG Yu-ping. Department of Oncology, Anhui Medical University, the Military General Hospital of Beijing, Beijing 100700, China

Corresponding author: ZHANG Xia, Email: 754273527@qq.com

**【Abstract】 Objective** To study the relationship of echinoderm microtubule-like protein 4-anaplastic Lymphoma kinase (echinoderm microtubule associated protein like 4-anaplastic Lymphoma kinase, EML4-ALK) integration and excision repair cross complement protein 1 gene (excision repair cross-complementation Group 1, ERCC1) and nucleotide reductase subunits M1 (ribonucleotide reductase subunit, M1) mRNA expression in NSCLC tissue. **Methods** Application of real-time fluorescent quantitative PCR method to detected the EML4-ALK gene in 257 patients and the expression of ERCC1 and RRM1mRNA. **Results** EML4-ALK fusion gene-positive rate was 4.28% (11/257), not in smokers was higher ( $P < 0.05$ ); ERCC1 mRNA high expression was 47.47% (122/257), RRM1mRNA high expression was 61.87%(159/257). Compared with not detected EML4-ALK fusion gene-positive, EML4-ALK fusion gene-positive had nothing to do with ERCC1mRNA expression ( $P > 0.05$ ); in NSCLC tissue, EML4-ALK fusion gene-positive had nothing to do with the level of RRM1mRNA expression ( $P > 0.05$ ), and also the level of expression of RRM1mRNA and ERCC1mRNA ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** EML4-ALK fusion gene-positive in NSCLC tissue could not benefit from first-line chemotherapy drugs Platinum and gem class, therefore required to explore more effective individualized treatment programmes, particularly the EML4-ALK fusion gene selective inhibitor erlotinib with primary or secondary drug resistance section of the individualized treatment plan.

**【Key words】** Carcinoma, non-small-cell lung; Echinoderm microtubule associated protein like 4-anaplastic lymphoma kinase; Excision repair cross-complementation group 1; Ribonucleotide reductase subunit M1; Molecular detection; Individualized treatment

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.22.040

基金项目: 吴阶平医学基金会临床科研专项资助基金项目 (320.6750.1360)

作者单位: 100700 北京, 安徽医科大学北京军区总医院临床学院 (田宁、许春伟); 解放军北京军区总医院肿瘤内科诊治中心 (田宁、张侠), 病理科 (许春伟); 大连大学附属中山医院肿瘤科 (高文斌); 山东省潍坊市人民医院病理科 (张玉萍)

通讯作者: 张侠, Email: 754273527@qq.com

在全球范围内,肺癌已跃居成为发病率和死亡率最高的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。肺癌中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占80%~85%<sup>[2]</sup>。棘皮动物微管样蛋白4-间变淋巴瘤激酶(echinoderm microtubule associated protein like 4-anaplastic lymphoma kinase, EML4-ALK)是2007年发现的由棘皮动物微管相关蛋白4(echinoderm microtubule associated protein-like 4, EML4)与渐变性淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase, ALK)基因融合而成的肺癌特异性融合基因,其在肺癌患者中的阳性率约为3%~8%<sup>[3]</sup>。EML4-ALK融合基因阳性具有与EGFR基因突变互斥性。NSCLC患者中最常见的EML4-ALK融合基因变异体是变异体1、2和3。变异体1的阳性率约为33%,变异体3的阳性率约为29%,变异体2的阳性率约为9%,这3种变异体占有所有变异体的大多数,其他的多种变异体所占比例均较低<sup>[4-10]</sup>。

近年来多项研究证实显示,核苷酸切除修复(nucleotide excision repair, NER)是主要的修复途径,NER在化疗药物的抵抗中发挥重要作用,是导致肿瘤细胞对铂类耐药的一个重要机制。切除修复交叉互补基因1(excision repair cross-complementation group 1, ERCC1)是NER和链内交联修复这2种DNA修复途径中的关键基因<sup>[11]</sup>,它的过表达可使停滞在G<sub>2</sub>/M期的损伤DNA迅速修复导致其对铂类耐药<sup>[12]</sup>。核苷酸还原酶亚单位M1(ribonucleotide reductase subunit M1, RRM1)为DNA合成与修复提供脱氧核糖核酸<sup>[13]</sup>。

肺癌患者ERCC1和RRM1低表达时,分别对以铂类和他滨类为基础的化疗的有效率提高<sup>[14-15]</sup>。NSCLC患者目前常用的化疗药物包括铂类和他滨类等。本文通过多中心研究回顾257例I~IV期NSCLC患者中EML4-ALK融合基因与ERCC1和RRM1 mRNA表达情况并对其相互关系进行分析,了解NSCLC患者EML4-ALK基因与组织中这2种耐药相关基因表达情况的关系,为进一步探索EML4-ALK基因阳性患者更有效的个体化治疗方案,特别是对EML4-ALK融合基因抑制剂克唑替尼原发或继发耐药部分患者的个体化治疗方案。

## 材料与方法

### 一、材料

1. 标本:收集解放军北京军区总医院、大连大学附属中山医院、山东省潍坊市人民医院2004~2013年间进行手术,术后病理诊断为肺腺癌且术前未经化疗、放疗及生物免疫治疗的组织蜡块标本257例(其中解放军北京军区总医院103例,大连大学附属中山医院

58例,山东省潍坊市人民医院96例),进行EML4-ALK融合基因、ERCC1和RRM1 mRNA检测。

2. 主要试剂和仪器:DNA提取试剂盒(德国QIAGEN公司),RNA提取试剂盒(德国QIAGEN公司),EML4-ALK基因表达检测试剂盒(福建厦门艾德有限公司),肿瘤相关基因表达量相对定量检测试剂盒(ERCC1和RRM1,福建厦门艾德有限公司),核酸蛋白质浓度测量仪B-500(上海创萌生物科技有限公司),Mx3000P实时荧光定量PCR仪(美国Stratagene公司)。

### 二、方法

1. 实时荧光定量PCR检测EML4-ALK融合基因:取4 μm厚度的石蜡组织切片4~8片,脱蜡;按照提取基因组RNA试剂盒(QIAamp DNA 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EML4-ALK基因表达检测试剂盒(福建厦门艾德有限公司)说明书提供的方法,在Mx3000P实时荧光定量PCR仪(美国Stratagene公司)中进行扩增。PCR反应条件:第1步,42℃ 30 min、94℃ 5 min;第2步,94℃ 45 s、60℃ 80 s,共40个循环,反应体系为25 μl。

2. 实时荧光定量PCR检测NSCLC组织中ERCC1和RRM1 mRNA的表达:取4 μm厚度的石蜡组织切片4~8片,脱蜡;按照提取基因组RNA试剂盒(QIAamp DNA 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。按照肿瘤相关基因表达检测试剂盒(ERCC1和RRM1,福建厦门艾德有限公司)说明书提供的方法,在Mx3000P实时荧光定量PCR仪(美国Stratagene公司)中进行扩增。PCR反应条件:第1步,42℃ 30 min、94℃ 5 min;第2步,94℃ 45 s、60℃ 80 s,共40个循环,反应体系为25 μl。以β-actin为内参基因对ERCC1基因和RRM1基因mRNA表达进行检测。ERCC1标准均值为 $4.29 \times 10^{-3}$ ,RRM1标准均值为 $11.37 \times 10^{-3}$ (福建厦门艾德有限公司)。

### 三、统计学分析

所有数据采用SPSS 19.0统计软件,结果运用 $\chi^2$ 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。

## 结果

1. EML4-ALK融合基因以及ERCC1和RRM1 mRNA表达与患者临床特征的关系(表1,图1,2):257

例 NSCLC 组织中 EML4-ALK 融合基因阳性 11 例 (4.28%); EML4-ALK 融合基因阳性在不吸烟 (10/11, 90.91%) 患者中较高 ( $P=0.040$ ), 但与患者的性别、年龄、肿瘤大小、淋巴结是否转移及临床分期等临床特征无关。257 例 NSCLC 组织中 ERCC1 mRNA 高表达者 122 例 (47.47%), 低表达者 135 例 (52.53%); ERCC1 mRNA 表达水平与患者的性别、年龄、吸烟情况、肿瘤大小、淋巴结是否转移及临床分期等临床特征无关。257 例 NSCLC 组织中 RRM1 mRNA 高表达者 159 例 (61.87%), 低表达者 98 例 (38.13%); RRM1 mRNA 表达水平与患者的性别、年龄、吸烟情况、肿瘤大小、淋巴结是否转移及临床分期等临床特征无关。

表 1 EML4-ALK 融合基因以及 ERCC1 和 RRM1 mRNA 表达与患者临床特征间的关系 (例)

临床特征	EML4-ALK			ERCC1			RRM1		
	阳性	阴性	P 值	高	低	P 值	高	低	P 值
性别			0.137			0.898			0.088
男	3	135		65	73		92	46	
女	8	111		57	62		67	52	
年龄			0.520			0.943			0.714
≥59 岁	4	126		62	68		79	51	
<59 岁	7	120		60	67		80	47	
吸烟史			0.018			0.199			0.129
是	0	99		52	47		67	32	
否	11	147		70	88		92	66	
肿瘤大小			0.637			0.687			0.292
≥5 cm	4	119		60	63		72	51	
<5 cm	7	127		62	72		87	47	
淋巴结转移			0.751			0.470			0.188
是	5	100		47	58		70	35	
否	6	146		75	77		89	63	
临床分期			0.495			0.339			0.577
I	5	87		40	52		59	33	
II+III+IV	6	159		82	83		100	65	

2. EML4-ALK 融合基因与 ERCC1 mRNA 表达水平间的关系 (表 2): 11 例 EML4-ALK 融合基因阳性的 NSCLC 患者中, ERCC1 mRNA 低表达者 5 例 (45.45%); 246 例 EML4-ALK 融合基因阴性的 NSCLC 患者中, ERCC1 mRNA 低表达者 130 例 (52.85%); NSCLC 组织中 EML4-ALK 融合基因阳性与 ERCC1 mRNA 表达水平无关 (45.45% vs. 52.85%,  $P>0.05$ )。

3. EML4-ALK 融合基因与 RRM1 mRNA 表达水平间的关系 (表 3): 11 例 EML4-ALK 融合基因阳性的 NSCLC 患者中, RRM1 mRNA 低表达者 3 例 (27.27%); 246 例 EML4-ALK 融合基因阴性的 NSCLC 患者中, RRM1 mRNA 低表达者 95 例 (38.62%); NSCLC 组织中 EML4-ALK 融合基因阳性与 RRM1 mRNA 表达

水平无关 (27.27% vs. 38.62%,  $P>0.05$ )。

表 2 EML4-ALK 融合基因与 ERCC1 mRNA 表达水平间的关系 (例)

EML4-ALK 融合基因	ERCC1 mRNA 表达		合计
	高	低	
阳性	6	5	11
阴性	116	130	246
合计	122	135	257

表 3 EML4-ALK 融合基因与 RRM1 mRNA 表达水平间的关系 (例)

EML4-ALK 融合基因	RRM1 mRNA 表达		合计
	高	低	
阳性	8	3	11
阴性	151	95	246
合计	159	98	257

4. ERCC1 与 RRM1 mRNA 表达水平间的关系 (表 4): 122 例 ERCC1 mRNA 高表达的 NSCLC 患者中, RRM1 mRNA 高表达者 72 例 (59.02%); 135 例 ERCC1 mRNA 低表达的 NSCLC 中, RRM1 mRNA 低表达者 48 例 (35.56%); NSCLC 组织中 ERCC1 mRNA 表达水平与 RRM1 mRNA 表达水平相关 (59.02% vs 35.56%,  $P<0.05$ )。

表 4 ERCC1 与 RRM1 mRNA 表达水平间的关系 (例)

ERCC1 mRNA 表达	RRM1 mRNA 表达		合计
	高	低	
高	72	50	122
低	87	48	135
合计	159	98	257

## 讨论

EML4-ALK 的选择性抑制剂克唑替尼 (crizotinib, 商品名: 赛可瑞) 在 NSCLC 患者的临床试验中, 由于 I 期、II 期的临床试验收到了较好的效果, 且不良反应小, 患者耐受性好, 目前已进入 III 期临床试验。但 2010 年, Choi 等<sup>[6]</sup>报道了 1 例 EML4-ALK 阳性的 NSCLC 患者, 在经过 5 个月克唑替尼治疗后产生继发耐药, 发现 2 种点突变, 突变位点为 C1156Y 和 L1196M。因此进一步探索克唑替尼原发或继发耐药部分患者的个体化治疗方案显得非常具有实用价值和现实意义。

本研究结果显示, I ~ IV 期 NSCLC 患者中 EML4-ALK 融合基因阳性率为 4.28% (11/257), 在不吸烟患者中较高 ( $P<0.05$ ), 与国人至今已报道的四个研究比较, EML4-ALK 融合基因阳性率为 6.40% (31/484) 略微偏低<sup>[6, 17-19]</sup>。NSCLC 患者中, ERCC1 的高表达率

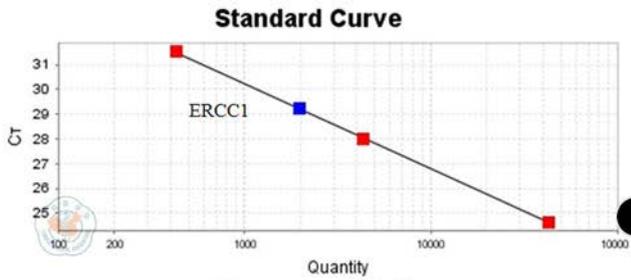


图1 ERCC1低表达

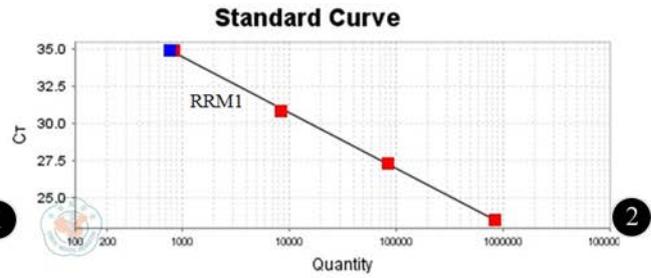


图2 RRM1高表达

为 47.47% (122/257), 略高于其他研究中 NSCLC 患者 ERCC1 的高表达率<sup>[20]</sup>。NSCLC 组织中, RRM1 高表达率为 61.87% (159/257), 与其他研究结果基本一致<sup>[21]</sup>, 且 ERCC1 及 RRM1 表达水平均与患者的性别、年龄、吸烟情况、肿瘤大小、淋巴结转移情况和病理分期等临床特征无关。

本研究发现, NSCLC 组织中, EML4-ALK 融合基因与 ERCC1 和 RRM1 表达水平均无关 ( $P > 0.05$ )。但 ERCC1 与 RRM1 表达水平相关 ( $P < 0.05$ ), 这与 Reynolds 等<sup>[22]</sup>的研究结果 ( $P < 0.05$ ) 一致, 但目前对于 ERCC1 和 RRM1 表达间的关系仍存在争议, 需要更多的研究进一步证实。且目前很多研究已证实, 根据 ERCC1 和 RRM1 的表达水平进行选择用药存在合理性, 且可以延伸到 NSCLC 患者<sup>[23]</sup>。

综上所述, 本研究未发现 EML4-ALK 融合基因阳性的 NSCLC 患者中 ERCC1 和 RRM1 表达水平有差异。本研究仅对一线化疗药中的铂类和他滨类药物耐药基因与 EML4-ALK 融合基因进行研究, 并未对一线化疗药中的微管类药物耐药基因 TUBB3 和胸苷酸合成酶耐药基因 TYMS 进行研究。因此期待关于 EML4-ALK 融合基因与微管类药物耐药基因 TUBB3 和胸苷酸合成酶耐药基因 TYMS 研究的进一步探索更有效的个体化治疗方案, 特别是 EML4-ALK 融合基因选择性抑制剂克唑替尼原发或继发耐药部分患者的个体化治疗方案的研究报道。

#### 参考文献

[1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin, 2011, 61: 69-90.  
 [2] Sher T, Dy GK, Adjei AA. Small cell lung cancer. Mayo Clin Proc, 2008, 83: 355-367.  
 [3] Horn L, Pao W. EML4-ALK: honing in on a new target in non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol, 2009, 27: 4232-4235.  
 [4] Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. Nature, 2007, 448: 561-566.  
 [5] Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, et al. EML4-ALK fusion is linked to histological characteristics in a subset of lung cancers. J Thorac Oncol, 2008, 3: 13-17.  
 [6] Wong DW, Leung EL, So KK, et al. The EML4-ALK fusion gene is

involved in various histologic types of lung cancers from nonsmokers with wild-type EGFR and KRAS. Cancer, 2009, 115: 1723-1733.

[7] Sasaki T, Rodig SJ, Chirieac LR, et al. The biology and treatment of EML4-ALK non-small cell lung cancer. Eur J Cancer, 2010, 46: 1773-1780.  
 [8] 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 Clin Oncol, 2009, 27: 4247-4253.  
 [9] Martelli MP, Sozzi G, Hernandez L, et al. EML4-ALK rearrangement in non-small cell lung cancer and non-tumor lung tissues. Am J Pathol, 2009, 174: 661-670.  
 [10] Perner S, Wagner PL, Demichelis F, et al. EML4-ALK fusion lung cancer: a rare acquired event. Neoplasia, 2008, 10: 298-302.  
 [11] Simon GR, Ismail-Khan R, Bepler G. Nuclear excision repair-based personalized therapy for non-small cell lung cancer: from hypothesis to reality. Int J Biochem Cell Biol, 2007, 39: 1318-1328.  
 [12] Rosell R, Lord RV, Taron M, et al. DNA repair and cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. Lung Cancer, 2002, 38: 217-227.  
 [13] Su C, Zhou S, Zhang L, et al. ERCC1, RRM1 and BRCA1 mRNA expression levels and clinical outcome of advanced non-small cell lung cancer. Med Oncol, 2011, 28: 1411-1417.  
 [14] Olaussen KA, Dunant A, Fouret P, et al. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. N Engl J Med, 2006, 355: 983-991.  
 [15] Bepler G, Kusmartseva I, Sharma S, et al. RRM1 modulated in vitro and in vivo efficacy of gemcitabine and platinum in non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol, 2006, 24: 4731-4737.  
 [16] Choi YL, Soda M, Yamashita Y, et al. EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. N Engl J Med, 2010, 363: 1734-1739.  
 [17] Rikova K, Guo A, Zeng Q, et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. Cell, 2007, 131: 1190-1203.  
 [18] 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. Mol Cancer, 2010, 9: 188.  
 [19] Sun Y, Ren Y, Fang Z, et al. Lung adenocarcinoma from East Asian never-smokers is a disease largely defined by targetable oncogenic mutant kinases. J Clin Oncol, 2010, 28: 4616-4620.  
 [20] 邓秋华, 邱源, 莫明聪, 等. 非小细胞肺癌表皮生长因子受体基因拷贝数与核苷酸切除修复交叉互补基因 1 和乳腺癌易感基因 1 的表达及其相关性分析. 中华肿瘤杂志, 2011, 33: 508-512.  
 [21] 林肖鹰, 陈小岩, 陈志忠. 非小细胞肺癌组织 ERCC1 和 RRM1 表达及其临床预后的相关性研究. 福建医科大学学报, 2011(1): 10-14.  
 [22] Reynolds C, Obasaju C, Schell MJ, et al. Randomized phase III trial of gemcitabine-based chemotherapy with in situ RRM1 and ERCC1 protein

levels for response prediction in non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol, 2009, 27: 5808-5815.

- [23] Simon GR, Schell MJ, Begum M, et al. Preliminary indication of survival benefit from ERCC1 and RRM1-tailored chemotherapy in patients with

advanced nonsmall cell lung cancer: evidence from an individual patient analysis. Cancer, 2012, 118:2525-2531.

(收稿日期: 2013-09-25)

(本文编辑: 马超)

田宁, 张侠, 高文斌, 等. 非小细胞肺癌组织中 EML4-ALK 融合基因与 ERCC1 和 RRM1 mRNA 表达的关系 [J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7 (22): 9988-9992.



中华医学会