

分类号 UDC _____

密级 _____

博士学位论文

**EML4-ALK、EGFR、KRAS、c-Met 基因
在中国肺腺癌患者中基因状态的临床研究**

**The gene status of EML4-ALK、EGFR、KRAS and
c-Met gene amplification in Chinese lung
adenocarcinoma**

作者姓名: 夏宁

学科专业: 临床医学(内科学)

学院(系、所): 湘雅医院

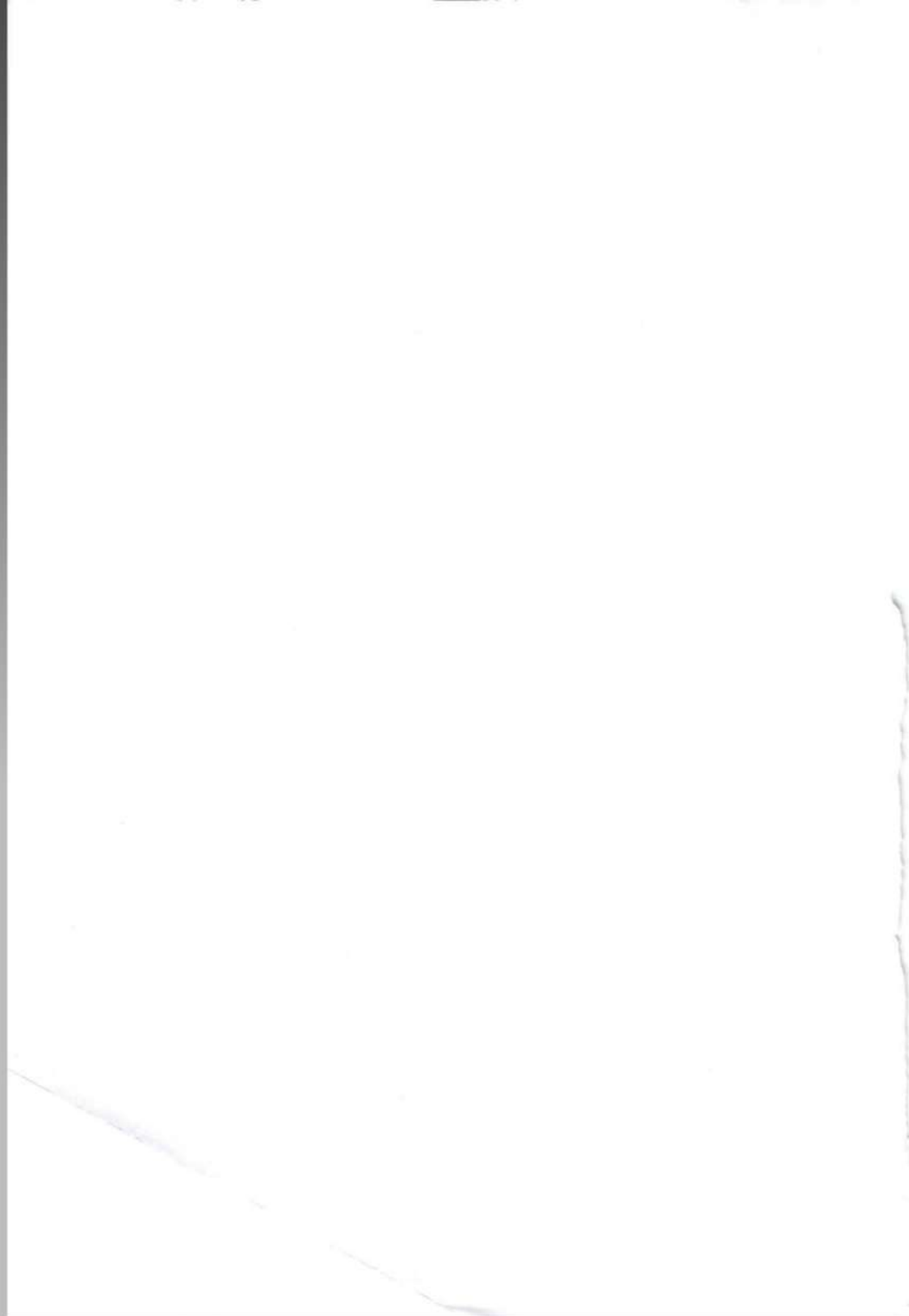
指导教师: 胡成平 教授

论文答辩日期 2012.5.15

答辩委员会主席 孙志华

中 南 大 学

二〇一二年五月



原创性声明


Y2200103

本人声明，所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了论文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中南大学或其他单位的学位或证书而使用过的材料。与我共同工作的同志对本研究所作的贡献均已在论文中作了明确的说明。

作者签名： 夏宁 日期： 2012 年 5 月 25 日

学位论文版权使用授权书

本人了解中南大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留学位论文并根据国家或湖南省有关部门规定送交学位论文，允许学位论文被查阅和借阅；学校可以公布学位论文的全部或部分内容，可以采用复印、缩印或其它手段保存学位论文。同时授权中国科学技术信息研究所将本学位论文收录到《中国学位论文全文数据库》，并通过网络向社会公众提供信息服务。

作者签名： 夏宁 导师签名： 刘成平 日期： 2012 年 5 月 25 日

20 2 400

1800

摘 要

目的 研究 EML4-ALK、EGFR、KRAS 及 c-Met 四种基因在中国肺腺癌患者中的基因状态。

方法 收集 110 例中南大学湘雅医院肺腺癌患者的手术标本。应用 FISH、直接测序法、绝对荧光定量 PCR、IHC 法检测 EML4-ALK、KRAS、EGFR、c-Met 四种基因在中国肺腺癌患者中的基因状态。

结果 四种基因 EML4-ALK、EGFR、KRAS、c-Met 的异常状态所占比例分别为 EML4-ALK 10%、EGFR 52.7%、KRAS 3.6%、c-Met 5.5%，且两两之间基本不共存。因此，约 71.8% 的中国肺腺癌患者存在上述四种基因的异常状态。

结论 本实验在部分中国肺腺癌患者中行上述四种基因检测，结果约 71.8% 的患者存在上述四种基因的异常状态。基于特定靶向药物对 EML4-ALK、EGFR 及 c-Met 基因扩增的显著疗效，从而得出约 70% 的中国肺腺癌患者可行特定基因的靶向治疗。

关键词 EML4-ALK；EGFR；KRAS；c-Met；肺腺癌

ABSTRACT

Object To investigate gene status of EML4-ALK, EGFR, KRAS and c-Met amplification in the Chinese patients of lung adenocarcinoma.

Methods This study collected 110 surgical tissue samples of lung adenocarcinoma in a single institution (the first Xiangya hospital, Hunan, China), and examined EML4-ALK, EGFR, KRAS and c-Met gene amplification respectively with different methods.

Results Eleven patients harbored EML4-ALK fusion gene, fifty-eight harbored EGFR mutation, four harbored KRAS mutation, and six harbored c-Met amplification. All genes were almost mutually exclusive. Therefore, approximately seventy-one point eight percents of Chinese patients with lung adenocarcinoma harbored the four genes.

Conclusions This study examined the four genes in lung adenocarcinoma from Chinese patients. Since targeted therapies of EML4-ALK, EGFR, c-Met have obtained great improvements, this investigation indicated about seventy percents of lung adenocarcinoma of Chinese patients could successfully receive personal targeted therapies.

Keywords EML4-ALK; EGFR; KRAS; c-Met; lung adenocarcinoma

目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
英文缩略词表.....	IV
第一章 前言.....	1
第二章 材料与方法.....	4
2.1 主要药品与试剂.....	4
2.2 主要仪器.....	5
2.3 实验方法.....	6
2.4 统计学分析.....	13
第三章 结果.....	14
3.1 检测 EML4-ALK 融合基因.....	14
3.2 直接测序检测 EGFR/KRAS 突变.....	16
3.3 c-Met 基因检测结果.....	19
3.4 EML4-ALK、EGFR、KRAS、c-Met 图谱及各基因之间关系.....	25
第四章 讨论.....	26
第五章 结论.....	30
参考文献.....	31
综述一.....	35
综述二.....	44
致 谢.....	53
已发表的论文.....	54

目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
英文缩略词表.....	IV
第一章 前言.....	1
第二章 材料与方法.....	4
2.1 主要药品与试剂.....	4
2.2 主要仪器.....	5
2.3 实验方法.....	6
2.4 统计学分析.....	13
第三章 结果.....	14
3.1 检测 EML4-ALK 融合基因.....	14
3.2 直接测序检测 EGFR/KRAS 突变.....	16
3.3 c-Met 基因检测结果.....	19
3.4 EML4-ALK、EGFR、KRAS、c-Met 图谱及各基因之间关系.....	25
第四章 讨论.....	26
第五章 结论.....	30
参考文献.....	31
综述一.....	35
综述二.....	44
致 谢.....	53
已发表的论文.....	54

英文缩略词表

缩略语	英文全称	中文全称
NSCLC	Non small cell lung cancer	非小细胞肺癌
EGFR	Epidermal growth factor receptor	表皮生长因子受体
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	v-Ki-ras2 大鼠 Kirsten 肉瘤病毒癌基因同源基因
c-Met	c-Met proto-oncogene	c-Met 原癌基因
EML4-ALK	Anaplastic lymphoma kinase with the echinoderm microtubule-associated protein-like 4	棘皮动物微管结合蛋白 4-间变淋巴瘤激酶
TKI	tyrosine kinase inhibitors	酪氨酸激酶抑制剂
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1	鼠类肉瘤滤过性毒菌致癌基因同源体 B1
PIK3CA	phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide	磷酸肌醇-3-激酶催化阿尔法多肽
AKT1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	v-akt 鼠胸腺瘤合并心脏同源病毒癌基因 1
MEK1	mitogen-activated protein kinase kinase 1	促蛋白激酶激酶 1
NRAS	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene	神经母细胞瘤助研病毒 (v-ras) 的致癌基因
OS	Overall survival	总生存期
PFS	progression free survival	无进展生存期

图 1-1-1 绪论部分的结构图

图 1-1-2 绪论部分的结构图

图 1-1-3 绪论部分的结构图

图 1-1-4 绪论部分的结构图

图 1-1-5 绪论部分的结构图

图 1-1-6 绪论部分的结构图

图 1-1-7 绪论部分的结构图

图 1-1-8 绪论部分的结构图

图 1-1-9 绪论部分的结构图

图 1-1-10 绪论部分的结构图

图 1-1-11 绪论部分的结构图

图 1-1-12 绪论部分的结构图

图 1-1-13 绪论部分的结构图

第一章 前言

近年来,针对特定基因的分子靶向治疗已经成为治疗进展期非小细胞肺癌(non small cell lung cancer, NSCLC)的重要策略,而目前已经发现多种靶点基因,如表皮生长因子(epidermal growth factor receptor, EGFR)、棘皮动物微管结合蛋白4-间变淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase with the echinoderm microtubule-associated protein-like 4,EML4-ALK)、c-Met 原癌基因(c-Met proto-oncogene,c-Met)、鼠类肉瘤滤过性毒菌致癌基因同源体B1(v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1,BRAF)等。其中针对EGFR突变、EML4-ALK融合基因、c-Met基因扩增等靶向治疗已经取得了突破性的进展,因而对每个NSCLC患者检测这些可能的分子靶点,并总结其各自的临床特点,进行个体化靶向治疗显得尤其重要。

目前,IPASS^[1]、First-SIGNAL^[2]、WJTOG3405^[3]、NEJ002^[4]和OPTIMAL^[5]等五项大型临床研究数据显示,对于EGFR突变阳性患者,表皮生长因子酪氨酸激酶抑制剂(epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors, EGFR-TKI)作为一线用药与传统的铂类化疗方案相比可明显延长疾病无进展时间(progression free survival, PFS)、改善患者生活质量,并且副作用明显减少。但由于v-Ki-ras2大鼠Kirsten肉瘤病毒癌基因同源基因(v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, KRAS)突变是EGFR-TKI原发耐药的机制,因而在行EGFR-TKI治疗前应排除KRAS突变。除此之外,2007年,Soda等^[6]在1例NSCLC患者手术切除标本中发现了一种新型基因,命名为EML4-ALK融合基因。随后一系列临床研究发现EML4-ALK融合基因阳性NSCLC患者有显著的临床特点,如主要发生于轻度或不吸烟且无EGFR和KRAS突变的NSCLC患者。最近一项开放、多中心参与的II期临床试验中^[7],82例EML4-ALK融合基因阳性NSCLC患者口服crizotinib(一种针对ALK及c-Met基因的共同抑制剂)后,客观缓解率为57%(47/82),8周疾病控制率为87%,从而将针对ALK的靶向治疗作为治疗EML4-ALK融合基因阳性患者的一种备选方法。

c-Met基因扩增最早被认定为EGFR-TKI继发耐药的一种机制,但对于未服用EGFR-TKI的NSCLC患者,仍有2%-10%的存在c-Met基因扩增,且Spigel^[8]

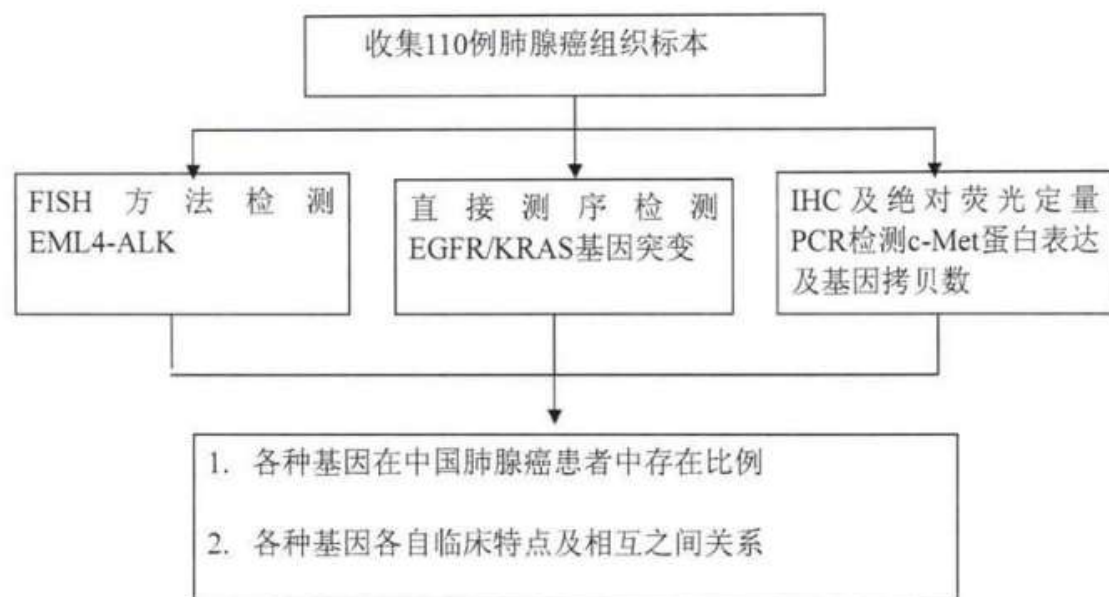
等报道 MetMAb (Met 受体的单效价单克隆抗体)+厄洛替尼 (ME) 方案比安慰剂+厄洛替尼 (PE) 方案显著改善了 Met IHC 阳性者 (其中包括 c-Met 基因扩增阳性者) 的 PFS 和总生存期 (overall survival, OS), 从而提出 MetMAb 对 c-Met 基因扩增阳性及 c-Met 蛋白表达阳性的 NSCLC 患者的个体化靶向治疗。

综上所述, NSCLC 的个体化靶向治疗已成为治疗的趋势, 因而分析不同人群中各靶点基因发生比例及其特定的临床特点至关重要。Kris^[9]等对 830 例欧洲人群的肺腺癌患者进行多种基因检测, 其中包括 KRAS, EGFR, Her2, BRAF, 磷酸肌醇-3-激酶催化阿尔法多肽 (phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide, PIK3CA), v-akt 鼠胸腺瘤合并心脏同源病毒癌基因 1 (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1, AKT1), 促蛋白激酶激酶 1 (mitogen-activated protein kinase kinase 1, MEK1), 神经母细胞瘤助研病毒 (v-ras) 的致癌基因 (neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene, NRAS), EML4-ALK 及 c-Met 基因扩增, 发现 KRAS 突变为 22%, EGFR 17%, EML4-ALK 7%, BRAF 2%, 其它基因所占比例较少。而来自中国人群的一项研究发现各种基因所占比例却明显不同^[10]。Sun^[10]等对 52 例亚裔非吸烟的肺腺癌患者进行一系列基因检测, 发现 EGFR 突变占 78.8%, EML4-ALK 5.8%, Her2 3.8%, KRAS 1.9%, 与西方人群各基因所占比例明显不同, 从而提出新的理念, 即 90% 的亚裔不吸烟的肺腺癌患者可以进行有效地个体化靶向治疗。但由于该研究样本量少并且只包含不吸烟患者, 且未检测 c-Met 基因扩增情况, 因而仍需进一步临床研究确定各基因状态及阳性患者的临床特点, 以指导个体化靶向治疗。

基于上述原因, 本实验通过收集 110 例中国肺腺癌患者手术标本, 检测 EML4-ALK、EGFR、KRAS 及 c-Met 基因扩增, 总结分析中国肺腺癌患者中四种基因的发生比例、相互关系及临床特点, 以指导临床上准确筛选出阳性患者, 从而实现 NSCLC 的“个体化”靶向治疗。

课题设计

本实验需收集110例中国肺腺癌患者的组织标本，并记录患者年龄、性别、肺癌分期等一般资料。用FISH方法检测EML4-ALK融合基因，用直接测序法检测EGFR及KRAS基因突变，用IHC检测c-Met蛋白表达及绝对荧光定量PCR检测c-Met基因拷贝数，分析各基因在中国肺腺癌患者中的发生比例、临床特点及相互之间关系。



第二章 材料与方法

2.1 主要药品与试剂

试剂	厂商
DNA 提取试剂盒	天根生物有限公司
二甲苯	上海生物工程有限公司
无水乙醇	上海生物工程有限公司
TaqDNA 聚合酶	上海生物工程有限公司
10×PCR Buffer	上海生物工程有限公司
6×DNA Loading Dye	上海生物工程有限公司
10×TAE	上海生物工程有限公司
DNA Marker	上海生物工程有限公司
PCR 产物纯化回收试剂盒	上海生物工程有限公司
pMD® 18-T Vector	上海宝生物工程有限公司
Solution	上海生物工程有限公司
感受态细胞制备试剂盒	上海生物工程有限公司
UNIQ-10 柱式质粒小量抽提试剂	上海生物工程有限公司
盒提取质粒 DNA	
PCR 引物	上海生物工程公司
PCR Master Mix:	天根生物有限公司
SYBR green PCR Master Mix	Applied Biosystems 公司
鼠 c-Met 多克隆抗体	Santa cruz 公司
0.01MPBS	北京中杉金桥公司
羊血清	北京中杉金桥公司
免疫组化二步法试剂盒	北京中杉金桥公司
DAB 显色试剂盒	北京中杉金桥公司
EDTA 抗原修复液	北京中杉金桥公司

一抗稀释液	北京中杉金桥公司
防脱载玻片	北京中杉金桥公司
盖玻片	北京中杉金桥公司
ALK 基因断裂重组试剂盒	北京金菩嘉有限公司
蛋白酶 K	Merck 公司
酸性亚硫酸钠	北京金菩嘉有限公司
20*SCC 干粉	北京金菩嘉有限公司
NP-40	北京金菩嘉有限公司

2.2 主要仪器

低温离心机	Beckman Coulter 公司
低温冰箱	CFCFREE 公司
紫外分光光度计	Beckraan Du-640
超速离心机	Nikon 公司
7300 Real-time PCR 仪	Applied Biosystems 公司
制冰机	HOSHIZAKI CORPORATION
-80℃冰箱	Thermo 公司
普通 PCR 仪	GENE AMP 2400
移液器	加拿大 BBI 公司
SW-CJ-1D 洁净工作台	江苏苏洁净化设备厂
DK-8D 型电热恒温水槽	上海森信实验仪器有限公司
DYY-8 型稳压稳流电泳仪	上海琪特分析仪器有限公司
H6-1 微型电泳槽	上海精益有机玻璃制品仪器厂
凝胶成像系统	Gene Genius 公司
Hybrite 杂交仪	Vysis 公司
荧光显微镜	Olympus 公司

2.3 实验方法

2.3.1 标本采集

2009.10~2011.10 期间共收集 110 例中南大学湘雅医院肺腺癌患者手术标本,其中包括 60 例石蜡包埋标本及 50 例新鲜肺癌组织标本及相配对的正常肺组织。所有标本均经肿瘤组织切片后经 HE 染色由两名病理医师确诊为肺腺癌,并且根据国际肺癌 TNM 分期进行临床分期。所有标本均由家属同意,并签署知情同意书。所有患者见表 2-1

表 2-1 Summary of patients with demographic and clinic pathological profiles

Characteristics		Patients (N=110)	
Age(years)	No.	%	
<60y	79	71.8	
≥60y	31	28.2	
Gender			
Male	51	46.4	
Female	59	53.6	
Smoking			
Smokers	29	26.4	
Non-smokers	81	73.6	
Stage			
I	41	37.3	
II	20	18.2	
III	46	41.8	
IV	3	2.7	

60 例石蜡包埋组织分为两部分: ①4um 切片用于 FISH 法检测 EML4-ALK 融合基因及 IHC 检测 c-Met 蛋白表达②10-15um 切片用于提取基因组 DNA 以检测 EGFR、KRAS 及 c-Met 基因拷贝数

50 例新鲜组织分为两部分: ①立即放于 4%的多聚甲醛中固定, 置于 4℃中

浸泡 24h 后, 将组织修成厚度为 2-3mm 的薄块, 并用石蜡包埋, 4℃ 保存。切 4μm 玻片 FISH 法检测 EML4-ALK 融合基因及 IHC 检测 c-Met 蛋白表达②立即置于液氮中速冻后, 转移至-80℃冰箱中保存, 用于提取基因组 DNA 以检测 EGFR、KRAS 及 c-Met 基因扩增。

2.3.2 FISH 法检测 EML4-ALK 融合基因

- (1) 56℃, 烤片 3-5 分钟
- (2) 室温, 松节油 10 分钟 2 次
- (3) 室温, 100%乙醇 5 分钟
- (4) 室温, 100%乙醇、85%乙醇、70%乙醇各 2 分钟
- (5) 室温, 去离子水 3 分钟, 用无绒纸巾吸取多余的水分
- (6) 50℃, 酸性亚硫酸钠 30 分钟
- (7) 37℃, 蛋白酶 K 10~30 分钟 (取 0.4ml 蛋白酶 K 储存液 (20mg/ml) 溶于 40ml 2×SSC(pH 7.0) 得到蛋白酶 K 工作液 (200μg/ml))
- (8) 室温, 2×SSC 5 分钟 2 次
- (9) 室温, 70%乙醇、85%乙醇和 100%乙醇各 3 分钟
- (10) 自然干燥玻片
- (11) 56℃, 烤片 2-5 分钟
- (12) 探针准备: 杂交液 8μl
探针 2μl

加入到 0.5ml 离心管中混匀, 离心 1~3 秒, 备用。

- (13) 将 10μl 探针混合物滴加于玻片杂交区域, 立即加盖盖玻片, 用橡皮胶封边。
- (14) 准备杂交仪器, 共变性条件, 83℃ 7 分钟, 杂交条件, 42℃ 16 小时
- (15) 46 度, 2×SSC 5 分钟
- (16) 46 度, 0.1%NP-40/2×SSC 5 分钟
- (17) 室温, 70%乙醇 3 分钟后于暗处自然风干玻片
- (18) 室温, 将 15μl DAPI 复染剂滴加于玻片杂交区域, 立即盖上盖玻片, 15 分钟后观察, 计数 100 个细胞, 其中异常细胞占 20%为阳性, 低于则为阴性。

2.3.3 直接测序法检测 EGFR/KRAS 突变

2.3.3.1 石蜡标本 DNA 提取

- (1) 切片刮取包埋组织若干, 置 1.5ml EP 管, 加二甲苯 1200 μ l, 震荡混匀 55~60 $^{\circ}$ C 温育 2~3 小时进行脱蜡处理
- (2) 8000rpm, 10 min, 去除二甲苯
- (3) 加无水乙醇 1200 μ l, 震荡混匀, 10000rpm, 5min 后吸弃乙醇
- (4) 37 $^{\circ}$ C 烤箱干燥 30min, 55 $^{\circ}$ C 过夜消化后按下述新鲜组织提取方法操作

2.3.3.2 新鲜组织 DNA 提取

根据天根组织基因组 DNA 抽提试剂盒说明书进行操作:

- (1) 首先将组织标本置于液氮预冷的研钵中研磨, 20mg 组织加入 200ul 缓冲液震荡至彻底悬浮
- (2) 加入 20ul 蛋白酶 K 混匀后, 56 $^{\circ}$ C 条件下摇浴 1 小时, 并颠倒混匀样品 2~3 次
- (3) 加入 200ul 缓冲液 GB, 充分颠倒混匀后, 70 $^{\circ}$ C 放置 10 分钟, 使液体变清亮
- (4) 加入 200ul 无水乙醇, 充分震荡混匀 15s
- (5) 将上述所得到的溶液加入吸附柱 CB3 中, 12000r 离心 30s, 倒掉废液, 将吸附柱 CB3 放回收集管中。之后在向吸附柱 CB3 中加入 500ul GD, 12000r 离心 30s, 倒掉废液, 将吸附柱 CB3 放回收集管中。
- (6) 向吸附柱 CB3 中加入 600ul 漂洗液 PW, 12000r 离心 30s, 倒掉废液, 将吸附柱 CB3 放回收集管中, 并重复此步骤一次。
- (7) 将吸附柱 CB3 放回收集管中, 12000r 离心 2min, 倒掉废液。将吸附柱 CB3 室温放置数分钟, 以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。
- (8) 将吸附柱 CB3 放入一个干净的离心管中, 向吸附膜中间部位悬空滴加 100ul 洗脱液 TE, 室温放置 4 分钟, 12000r 离心 2min, 将溶液收集到离心管中, 并放置 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

2.3.3.3 引物设计及合成

EGFR18-21 号外显子及 KRAS 基因 2 号外显子引物序列根据 Pao^[11]等及 Lynch^[12]等两篇文献参考设计, 所有引物序列均有上海生工生物工程技术服务有限公司合成。见表 2-2

表 2-2 EGFR 及 KRAS 基因外显子引物序列

Gene	Exon /primer	Primer sequence
EGFR	Exon 18(1F)	CAAATGAGCTGGCAAGTGCCGTGTC
	Exon 18(1R)	GAGTTTCCCAAACACTCAGTGAAAC
	Exon 18(2 F)	CAAGTGCCGTGTCCTGGCACCCAAGC
	Exon 18(2 R)	CCAAACACTCAGTGAAACAAAGAG
	Exon 19(1F)	GCAATATCAGCCTTAGGTGCGGCTC
	Exon 19(1R)	CATAGAAAGTGAACATTTAGGATGTG
	Exon 19(2 F)	CCTTAGGTGCGGCTCCACAGC
	Exon 19(2 R)	CATTTAGGATGTGGAGATGAGC
	Exon 20(1F)	CCATGAGTACGTATTTTGAAACTC
	Exon 20(1R)	CATATCCCCATGGCAAACCTCTTGC
	Exon 20(2 F)	GAAACTCAAGATCGCATTTCATGC
	Exon 20(2 R)	GCAAACCTCTTGCTATCCCAGGAG
	Exon 21(1F)	CTAACGTTTCGCCAGCCATAAGTCC
	Exon 21(1R)	GCTGCGAGCTCACCCAGAATGTCTGG
	Exon 21(2 F)	CAGCCATAAGTCCTCGACGTGG
	Exon 21(2 R)	CATCCTCCCCTGCATGTGTAAAC
KRAS	KRAS2 (1F)	GAATGGTCCTGCACCAGTAA
	KRAS2 (1R)	GTGTGACATGTTCTAATATAGTCA
	KRAS2 (2F)	GTCTGACACCAGTAATATGC
	KRAS2 (2R)	ATGTTCTAATATAGTCACATTTTC

注: Exon18-21: EGFR18-21 外显子; KRAS2: KRAS 基因 2 号外显子; Exon 18(1F) 及 Exon18(1R):巢氏 PCR 扩增第一轮引物; Exon 18(2F)及 Exon18(2R):巢氏 PCR 扩增第二轮引物。

2.3.3.4 PCR 扩增

(1) 石蜡标本提取全基因组 DNA 应用巢氏 PCR 进行两轮扩增:

巢氏 PCR 第一轮扩增体系:

PCR 反应体系总体积为 25 uL, 包括:

基因组 DNA	2ul
Mix	12.5ul
Primer 1F	1ul
Primer 1R	1ul
ddH ₂ O	8.5ul

巢氏 PCR 第二轮扩增体系:

第一轮扩增产物 2ul

Mix 12.5ul

Primer 2F 1ul

Primer 2R 1ul

ddH₂O 8.5ul

(2) 新鲜标本提取全基因组 DNA 应用普通 PCR 进行扩增:

PCR 扩增体系:

PCR 反应体系总体积为 25 uL, 包括:

基因组 DNA 2ul

Mix 12.5ul

Primer 1F 1ul

Primer 1R 1ul

ddH₂O 8.5ul

(3) PCR 扩增反应条件:

EGFR 基因第一轮扩增反应条件: 初始变性(95° C, 5min); 30 个循环: 变性(94° C, 30s), 退火(60° C, 30s), 延伸(72° C, 1min); 最终延伸(72° C, 10min)。

EGFR 基因第二轮扩增反应条件: 初始变性(95° C, 5min); 35 个循环: 变性(94° C, 30s), 退火(60° C, 30s), 延伸(72° C, 1min); 最终延伸(72° C, 10min)。

KRAS 基因第一轮扩增反应条件: 初始变性(95° C, 5min); 30 个循环: 变性(94° C, 30s), 退火(58° C, 30s), 延伸(72° C, 1min); 最终延伸(72° C, 10min)。

KRAS 基因第二轮扩增反应条件: 初始变性(95° C, 5min); 35 个循环: 变性(94° C, 30s), 退火(58° C, 30s), 延伸(72° C, 1min); 最终延伸(72° C, 10min)。

2.3.3.5 PCR 扩增产物 DNA 测序及突变解读

PCR 扩增产物经凝胶电泳证实后, 由上海生工生物工程技术有限公司完成 DNA 测序。运用 CHROMAS 软件解读基因测序图形。运用 The Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)将 DNA 序列与标准野生型 DNA 序列进行比较, 找出变异位点, 若在所检测的核苷酸的相对应位点发现有变异, 则可能为基因突变。突变的最终确定需要肉眼对 DNA 图形进行确认。

2.3.4 实时定量 PCR 检测 c-Met 基因拷贝数

2.3.4.1 基因组 DNA 提取

按照前面所述的 DNA 提取步骤,对所有样本包括 50 例正常肺组织进行 DNA 提取。

2.3.4.2 引物设计

采用绝对荧光定量 PCR 检测 c-Met 基因拷贝数。根据 GeneBank 的序列对 c-Met 基因和内参基因 Line-1 进行引物设计。引物由上海生工生物工程技术有限公司完成。见表 2-3

表 2-3 c-Met 基因及内参 Line-1 引物序列

Gene	Primer name	Primer sequence
c-Met	c-Met F	CCATCCAGTGTCTCCAGAAGTG
	c-Met R	TTCCCAGTGATAACCAAGTGTGTAG
Line-1	Line-1 F	TGCTTTGAATGCGTCC
	Line-1 R	AAAGCCGCTCAACTACAT

2.3.4.3 标准品制备

2.3.4.3.1 PCR 反应

取正常人外周血 2ml,按照上述提取基因组 DNA 方法提取全血 DNA 作为 PCR 模板,配制 PCR 25ul 反应体系:

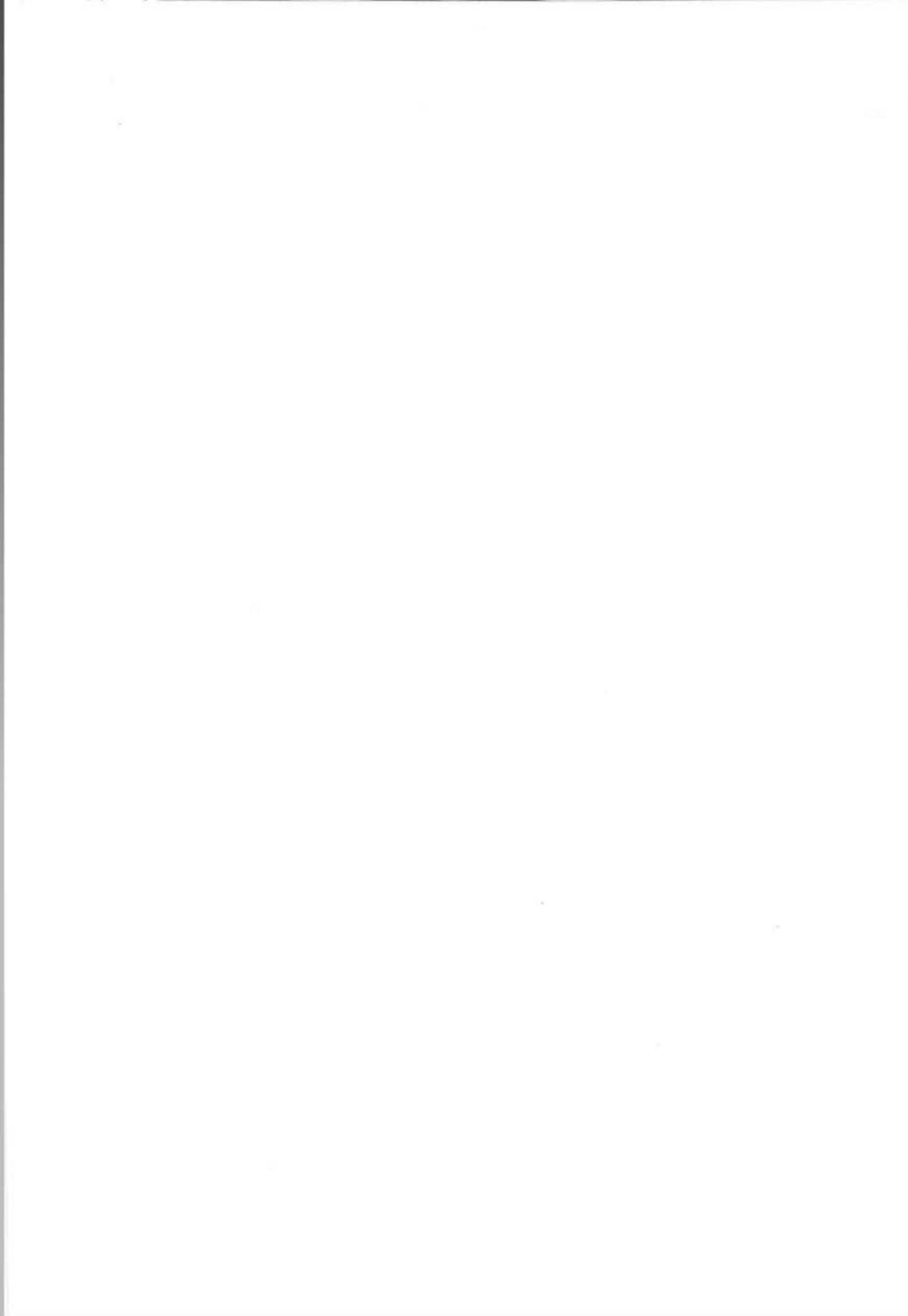
模板 DNA(各取 1ul 混合)	0.5μl
引物 F (10μM)	0.5μl
引物 R (10μM)	0.5μl
dNTP (10 mM)	0.5μl
Taq Buffer(10×)	2.5μl
MgCl ₂ (25mM)	2μl
Taq 酶 (5U/μl)	0.2μl
H ₂ O	18.3μl

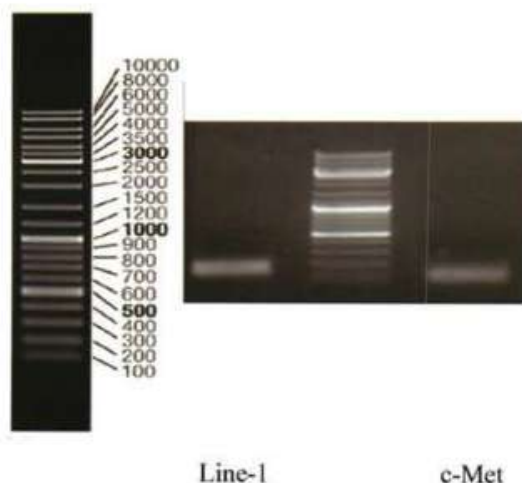
2.3.4.3.2 PCR 反应条件

c-Met 基因扩增反应条件:初始变性(95° C, 5min); 35 个循环:变性(94° C, 30s), 退火(56° C, 30s), 延伸(72° C, 30s); 最终延伸(72° C, 8min)。

Line-1 基因扩增反应条件:初始变性(95° C, 5min); 35 个循环:变性(94° C, 30s), 退火(56° C, 30s), 延伸(72° C, 30s); 最终延伸(72° C, 8min)。

PCR 产物电泳图:





2.3.4.3.3 连接制作质粒

取 5 μ l Solution、10ng pMD® 18-T Vector 及 5 μ l PCR 产物 4℃ 过夜连接。将连接体系中的反应物与感受态细胞进行转染，细胞 37° C 孵育过夜。使用柱式质粒小量抽提试剂盒提取质粒 DNA。提取质粒后测 D260nnl / D280nnl 值，计算标准品的拷贝数。

2.3.4.4 制作标准曲线及未知样本检测

- (1) 确定未知样品的位置和重复数，每个样品重复三次。
- (2) 将质粒标准品 c-Met 和内参基因标准品 Line-1 倍比稀释成 6 个浓度： 10^{10} 、 10^8 、 10^6 、 10^4 、 10^2 、 10^0 ，并确定每个标准品的位置和重复数。
- (3) 在反应板的每个反应孔中加入以下体积的液体：ROX Reference Dye (50 \times) 0.4 μ l; SYBR® Premix Ex TaqTM II (2 \times) 10 μ l; PCR Mix Primer (10 μ M) 1.6 μ l; Nuclease free water 6 μ l; 基因组 DNA 1 μ l
- (4) 盖上热反应膜，将反应板装入定量分析仪。
- (5) 按仪器操作创建绝对定量反应板。
- (6) 指定热循环的条件并开始运行反应板：聚合酶的活化 20s 95℃ PCR 扩增 (40 个循环); 5s 95℃, 31s 60℃。
- (7) 保存文件，单击 start 开始。
- (8) 待反应完毕，分析数据。

2.3.4.5 结果判读

取三次独立实验(c-Met/Line-1)比值的均值作为分析数据，以 50 例术后正常肺组织的均值+2 倍标准差(M+2*SD)作为临界值^[13]。在临界值以上的肿瘤标

本判定为 c-Met 基因扩增阳性,等于或小于临界值则判定为阴性。

2.3.5 IHC 检测 c-Met 蛋白表达

(1) 脱蜡和水化:石蜡包埋后以 4 μ m 厚度连续切片,贴片,标本用松节油脱蜡,两缸,每缸 10 分钟;梯度乙醇脱水,三缸 75%、95%、100%,从高到低,每缸 3 分钟。

(2) 新鲜配制的 0.01MPBS (磷酸盐缓冲液)洗 10min \times 3 次。

(3) 3% H_2O_2 室温孵育 15min,消除内源性过氧化物酶的活性。

(4) 新鲜配制的 0.01MPBS 洗 10min \times 3 次。

(5) 抗原修复:将 1:50 EDTA 抗原修复液用微波高火煮沸后停止加热,放入切片并在微波内焖 5min,再次煮沸后焖 5min,室温下冷却至手温。

(6) 新鲜配制的 0.01MPBS 洗 10min \times 3 次。

(7) 滴加 10%的正常羊血清封闭抗原减少非特异性背景,室温孵育 40min。

(8) 一抗孵育:滴加一抗稀释液稀释的一抗,50ul/张(c-Met 多克隆抗体 1:100),37 $^{\circ}C$ 放置 30min 后,置于 4 $^{\circ}C$ 冰箱中过夜。

(9) 室温下复温 30min。

(10) 0.01MPBS 洗 10min \times 3 次。

(11) 二抗孵育:滴加二抗,1 滴/张,37 $^{\circ}C$ 放置 30min。

(12) 0.01MPBS 洗 10min \times 3 次。

(13) DAB 显色:使用 DAB 显色试剂盒,自来水充分冲洗。

(14) 滴加苏木素适度复染 2min。

(15) 盐酸酒精分化,自来水冲洗 10~15 分钟。

(16) 常规乙醇梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

(17) 结果观察:在 400 倍光镜视野下,对切片随机选取 5 个不重叠视野,计算每个视野中阳性及强阳性细胞数,若阳性细胞或强阳性细胞总数大于 50% 总细胞数则认为 c-Met 蛋白表达阳性,否则为阴性^[8]。

2.4 统计学分析

计数资料采用 χ^2 或确切概率法(Fisher's exact test)分析各基因与临床病理特征之间关系。双侧检验 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义,统计分析和图表绘制用 SPSS17.0 统计软件完成。



第三章 结果

3.1 检测 EML4-ALK 融合基因

FISH 结果显示：在收集 110 例肺腺癌手术标本中，有 11 例 EML4-ALK 融合基因阳性患者（11/110,10%）。FISH 阴性及阳性结果见图 3-1、3-2。其中 60 例石蜡标本中检出 7 例 EML4-ALK 融合基因阳性者，50 例新鲜标本中检测出 4 例。分析 EML4-ALK 融合基因阳性患者临床特点，发现其与野生型相比，主要发生于不吸烟的肺腺癌患者（ $P=0.035$ ），但与年龄、性别、肿瘤分期无明显相关性（ $P=0.672$, $P=0.949$, $P=0.740$ ）。除此之外，EML4-ALK 与 EGFR、KRAS、c-Met 基因扩增几乎不共存。具体分布情况见表（表 3-1）。

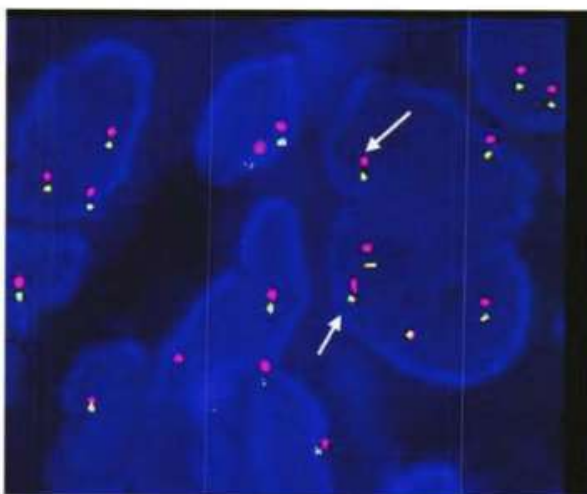


图 3-1 ALK 阳性

注：图 3-1 示 FISH 法检测 ALK 阳性结果。绿色探针示 ALK 基因 5'端，红色探针示 ALK 基因 3'端。两者分离表示 ALK 基因发生重排。

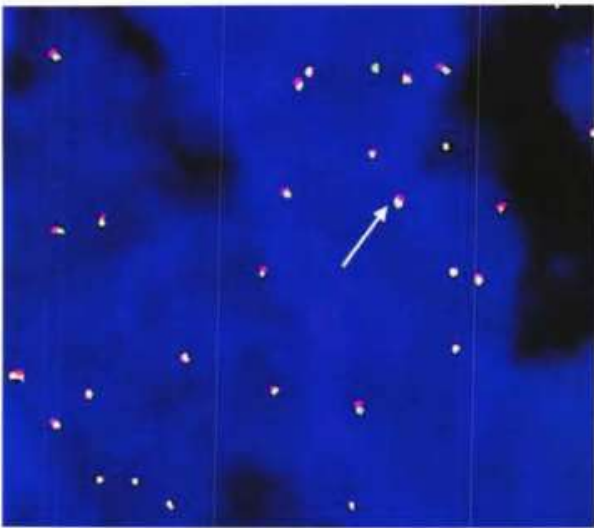


图 3-2 ALK 阴性

注：图 3-2 示 FISH 法检测 ALK 阴性结果。绿色探针示 ALK 基因 5'端，红色探针示 ALK 基因 3'端。两者融合为黄色表示 ALK 基因未发生重排

表 3-1 EML4-ALK 融合基因阳性患者临床特点

Characteristics	No. of patients	ALK fusion		
		Positive	Negative	P-value
No. of patients	110	11	99	
Age				0.672
<60y	79	9	70	
≥60y	31	2	29	
Gender				0.949
Male	51	5	46	
Female	59	6	53	
Smoking				0.035
Smokers	29	0	29	
Non-smokers	81	11	70	
Stage				0.740
I	41	3	38	
II	20	3	17	
III	46	5	41	

IV	3	0	3	
EGFR				0.036
mutation	58	2	56	
Non-mutation	52	9	43	
KRAS				1.000
mutation	4	0	4	
Non-mutation	106	11	95	
c-Met amplification				1.000
positive	6	0	6	
negative	104	11	93	
c-Met protein				0.212
positive	33	2	31	
negative	77	9	68	

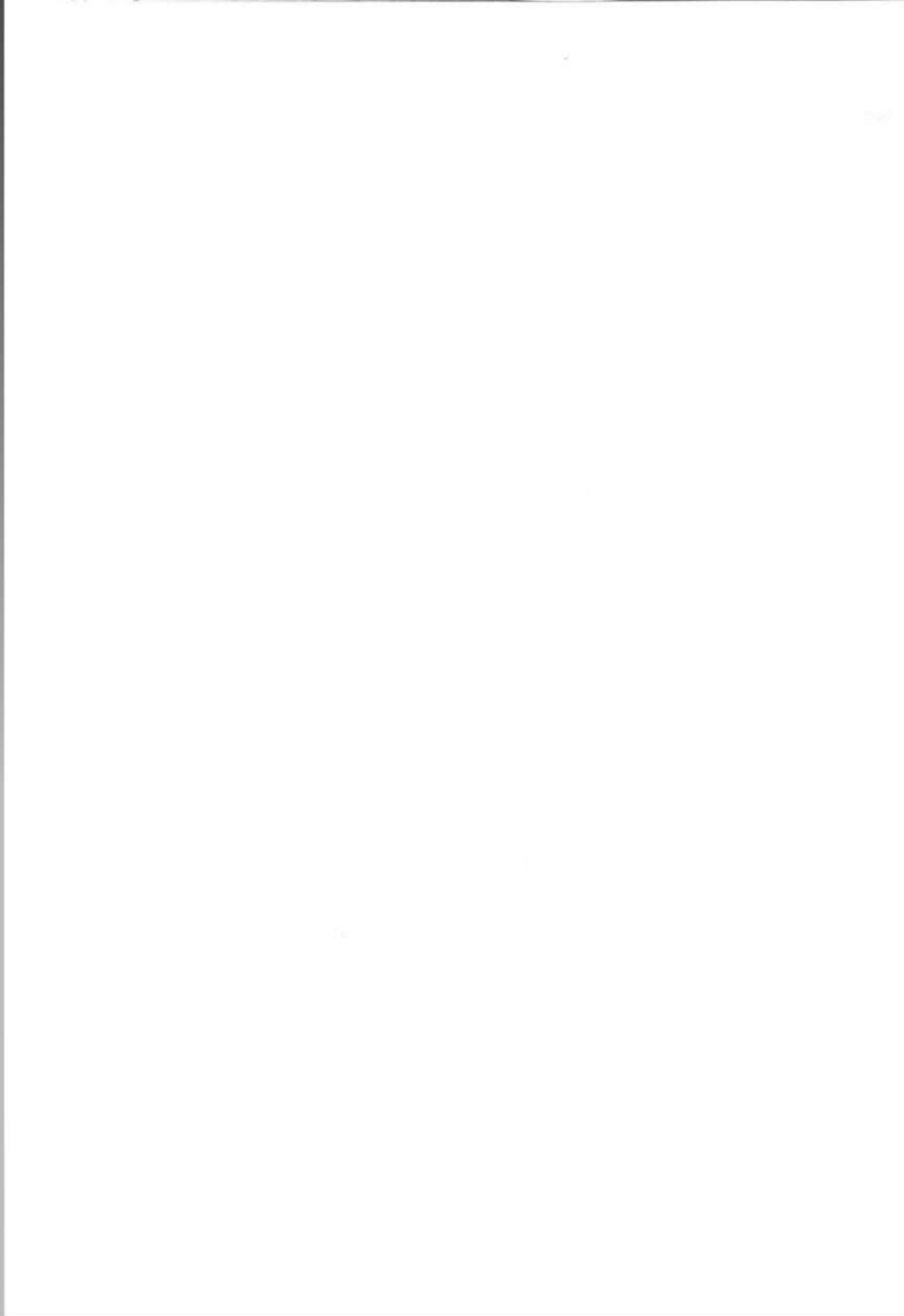
3.2 直接测序检测 EGFR/KRAS 突变

DNA 测序结果显示: 110 例肺腺癌患者中检测出 58 例 EGFR 突变阳性患者 (58/110, 52.7%), 4 例 KRAS 突变 (4/110, 3.6%)。在 58 例 EGFR 突变患者中有 4 种突变类型, 突变发生于 19 (20/58, 34.5%)、20 (2/58, 3.4%)、21 (36/58, 62.1%) 外显子。19 号外显子中包括 4 例 delL747-P753inser 缺失插入突变 (图 3-3)、16 例 delE746-A750 缺失突变 (图 3-4)。20 外显子突变为 T790M 突变 (图 3-5)。21 外显子突变均为 L858R 突变 (2573 T-G) (图 3-6)。KRAS 突变均为 2 号外显子 G12C 突变类型 (图 3-7)。

分析 EGFR 突变与临床特点关系, 发现与以往大型临床实验相符, 其主要发生于不吸烟、年轻的女性腺癌患者, 与临床分期无明显相关性, 与 KRAS 突变不共存 ($P < 0.001$, $P = 0.002$, $P = 0.001$ 表 3-2)。

表 3-2 EGFR 基因突变患者临床特点

Characteristics	No. of patients	EGFR mutation		
		positive	negative	P-value
No. of patients	110	58	52	
Age				0.002
<60y	79	49	30	



≥60y	31	9	22	
Gender				0.001
Male	51	18	33	
Female	59	40	19	
Smoking				<0.001
Smokers	29	4	25	
Non-smokers	81	54	27	
Stage				0.794
I	41	22	19	
II	20	12	8	
III	46	23	23	
IV	3	1	2	
KRAS mutation				0.047
positive	4	0	4	
negative	106	58	48	
c-Met amplification				0.01
positive	6	0	6	
negative	104	58	46	
c-Met protein				0.803
positive	33	18	15	
negative	77	40	37	

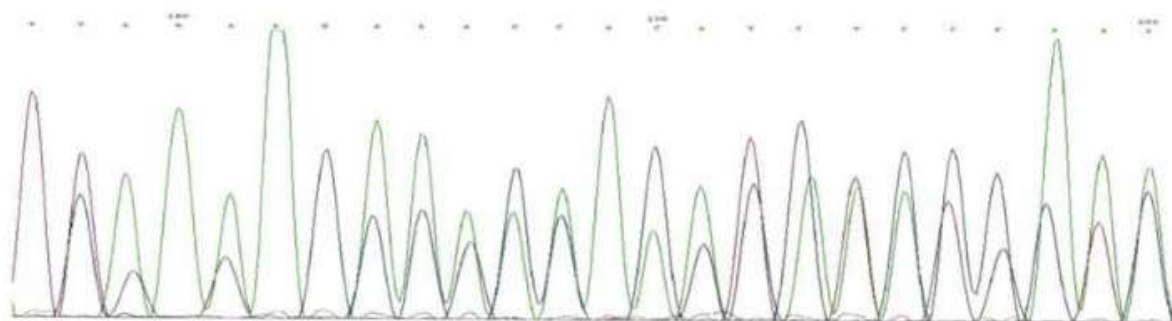


图 3-3 EGFR19 外显子 delL747 — P753inser 缺失突变

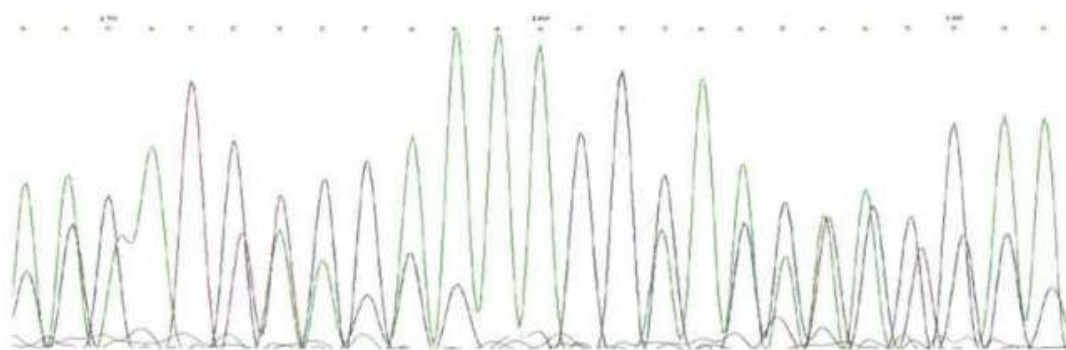


图 3-4 EGFR19 外显子 delE746-A750 缺失突变

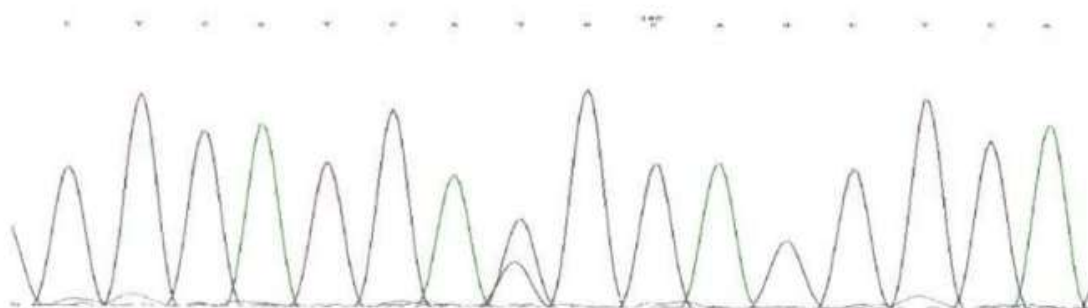


图 3-5 EGFR 20 外显子 T790M 突变



图 3-6 EGFR21 外显子 L858R 突变

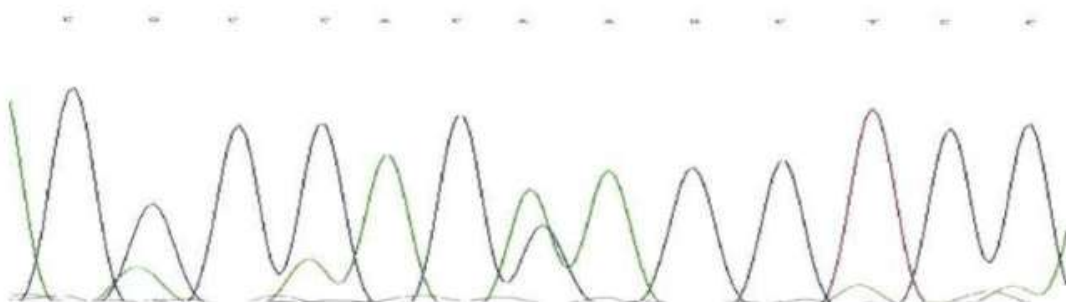


图 3-7 KRAS 2 号外显子 G12C 突变

3.3 c-Met 基因检测结果

3.3.1 绝对荧光定量 PCR 检测 c-Met 基因拷贝数

通过构建 c-Met 基因与 Line-1 内参基因的标准曲线及扩增曲线(图 3-8、3-9、3-10、3-11), 对 110 例肺腺癌标本进行检测, 以 50 例正常肺组织 c-Met/Line-1 均值+2 倍标准差 ($M+2*SD$) 作为判断标准。结果显示 c-Met 基因扩增率为 (6/110, 5.5%) (图 3-12), 且所有 c-Met 基因扩增阳性者其蛋白表达均为阳性。c-Met 基因扩增与性别、年龄、吸烟状况等无相关性(表 3-3)。

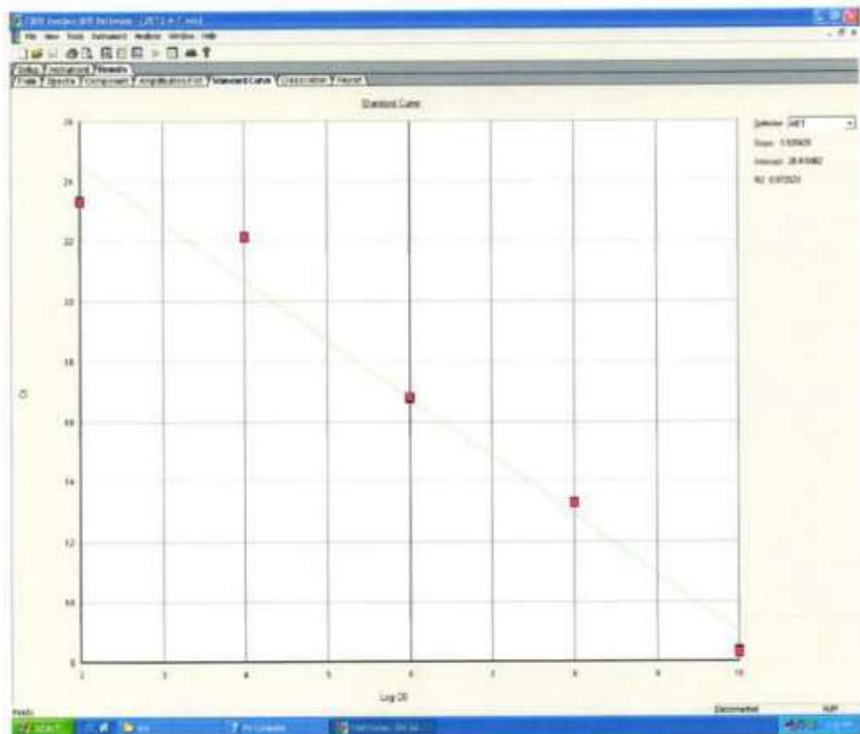
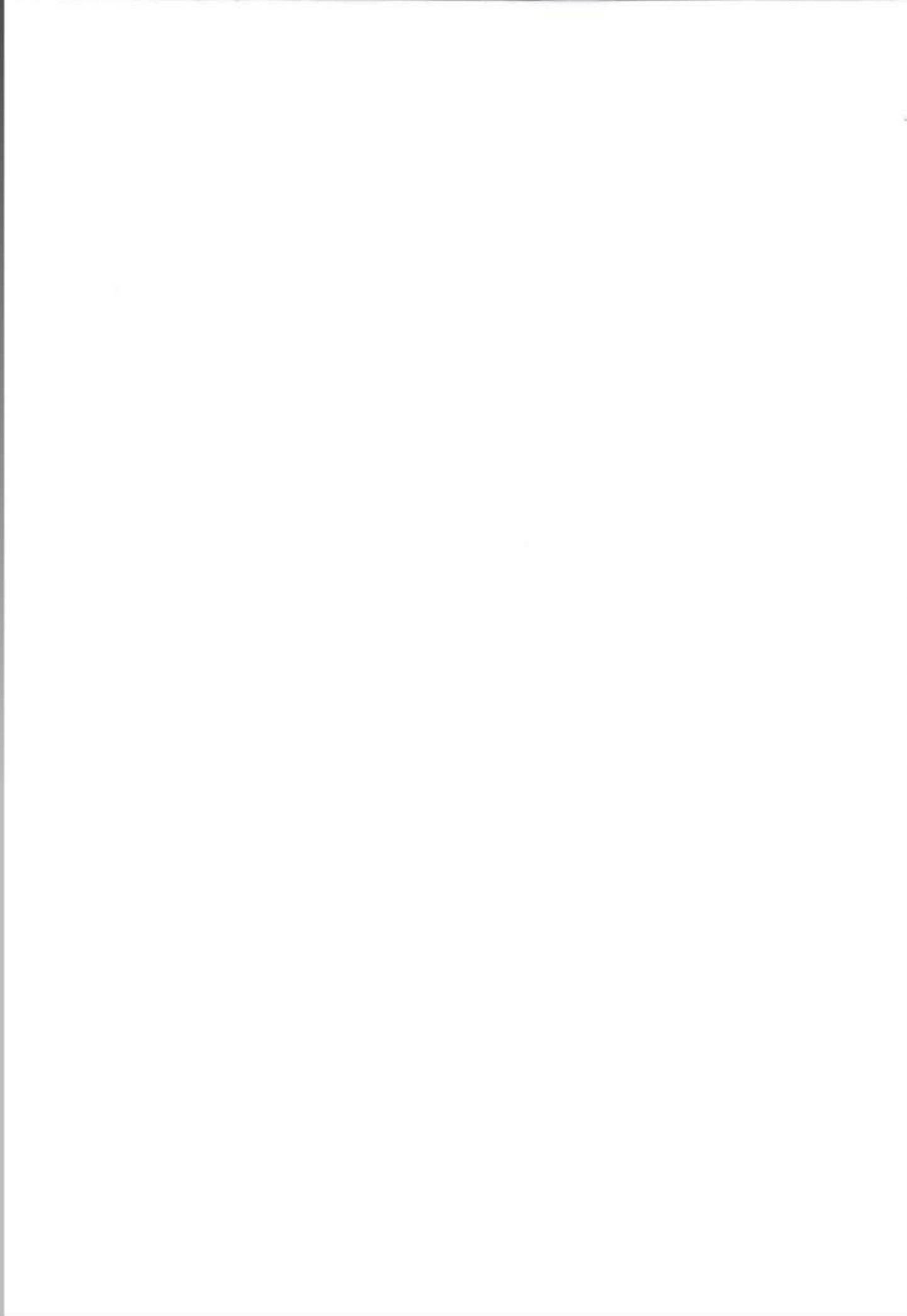


图 3-8 c-Met 基因标准曲线



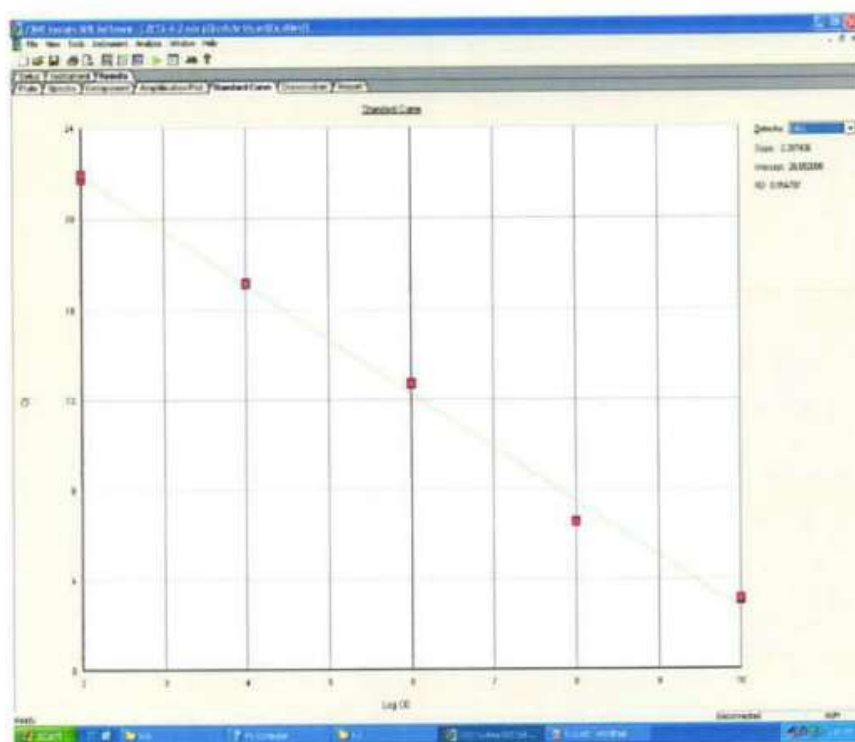


图 3-9 Line-1 基因标准曲线

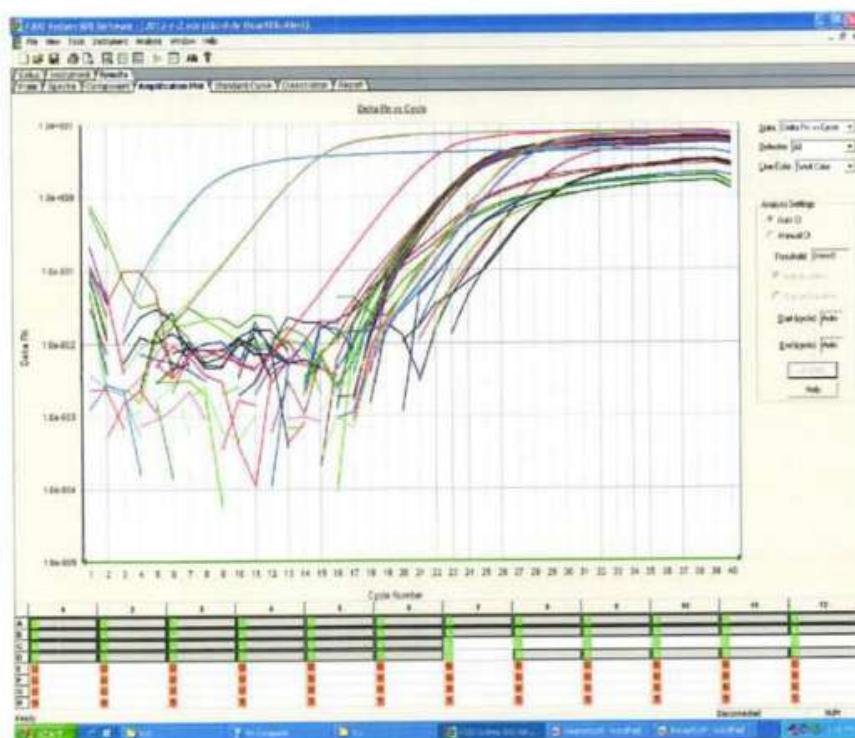


图 3-10 c-Met 基因扩增曲线

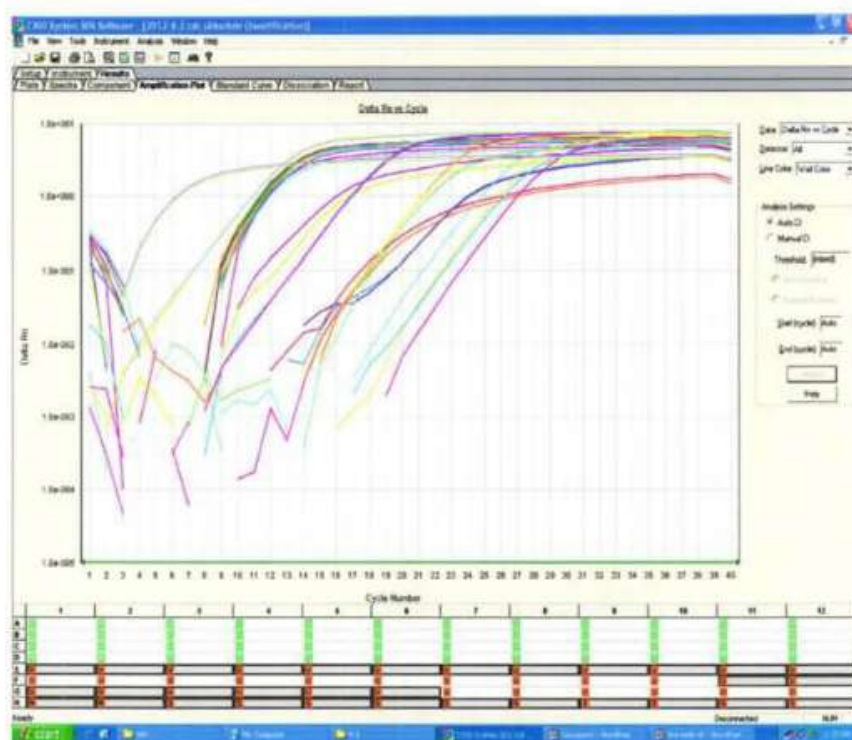


图 3-11 Line-1 基因扩增曲线

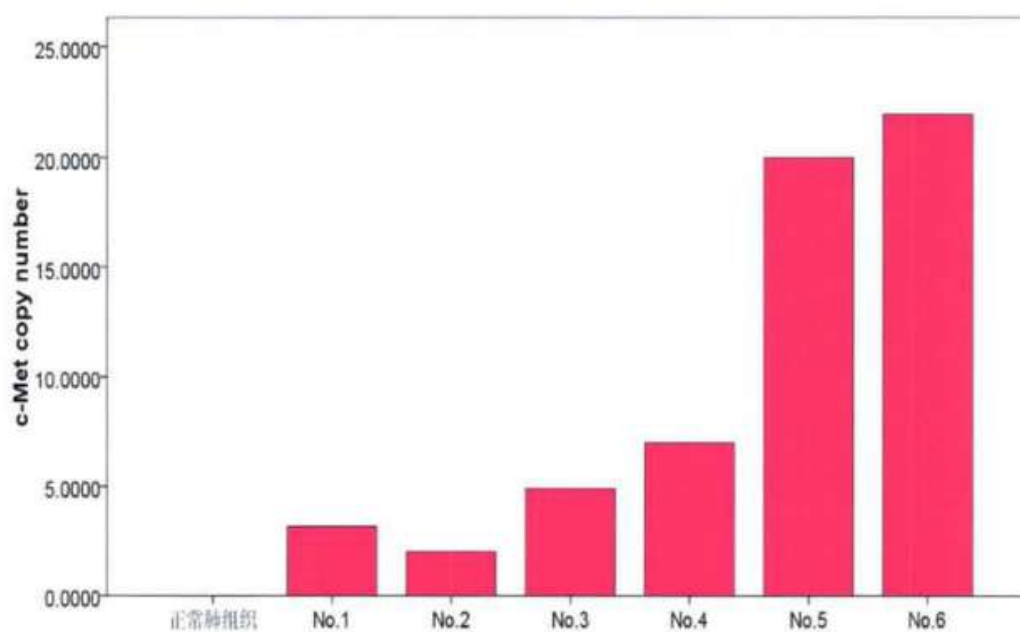


图 3-12 c-Met relative copy number by QPCR

表 3-3 c-Met 基因扩增及蛋白表达阳性患者临床特点

Characteristics	No. of patients	c-Met amplification			c-Met protein		
		positive	negative	p-value	positive	negative	p-value
No. of patients	110	6	104		33	77	
Age				0.450			0.432
<60y	79	3	76		22	57	
≥60y	31	3	28		11	20	
Gender				1.000			0.900
Male	51	3	48		15	36	
Female	59	3	56		18	41	
Smoking				1.000			0.422
smokers	29	2	27		7	22	
Non-smokers	81	4	77		26	55	
Stage				0.606			0.101
I	41	1	40		8	33	
II	20	1	19		6	14	
III	46	4	42		19	27	
IV	3	0	3		0	3	

3.3.2 IHC 检测 c-Met 蛋白表达

根据 Spigel^[8]等应用 MetMAb 判断 c-Met 蛋白表达是否阳性的方法,结果显示 33 例患者表达阳性 (33/110,30%), 即阳性或强阳性细胞总数大于 50%。c-Met 蛋白在肺癌细胞胞浆及胞膜中均有表达。根据统计学分析, c-Met 蛋白表达与患者年龄、性别、吸烟等临床特点无明显相关性 (表 3-3)。图 3-13、3-14、3-15、3-16 示各种阳性强度。



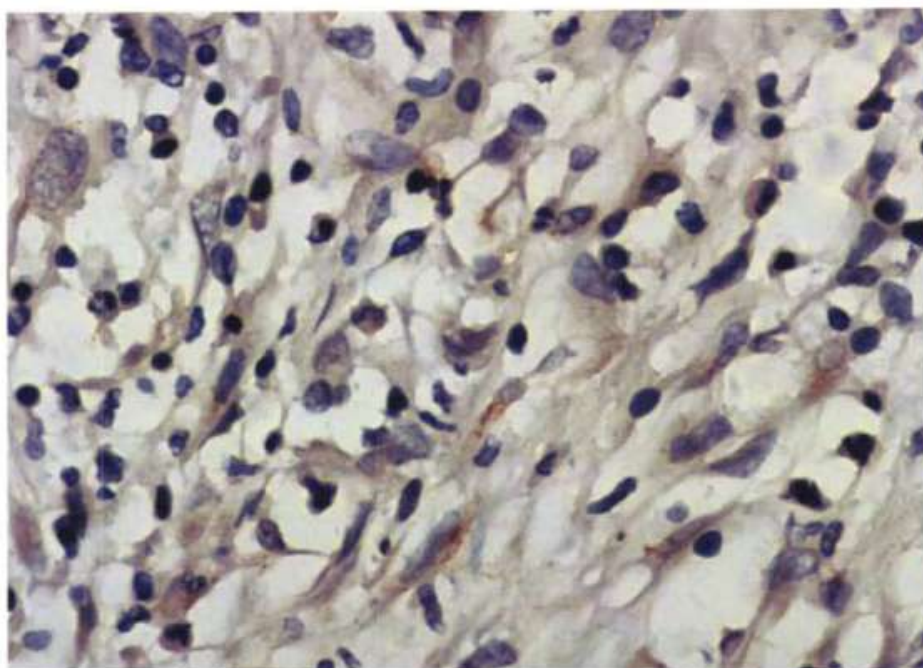


图 3-13 阴性 ($\times 400$ 倍)

注: c-Met 蛋白表达阴性: 阳性细胞数小于细胞总数 50%

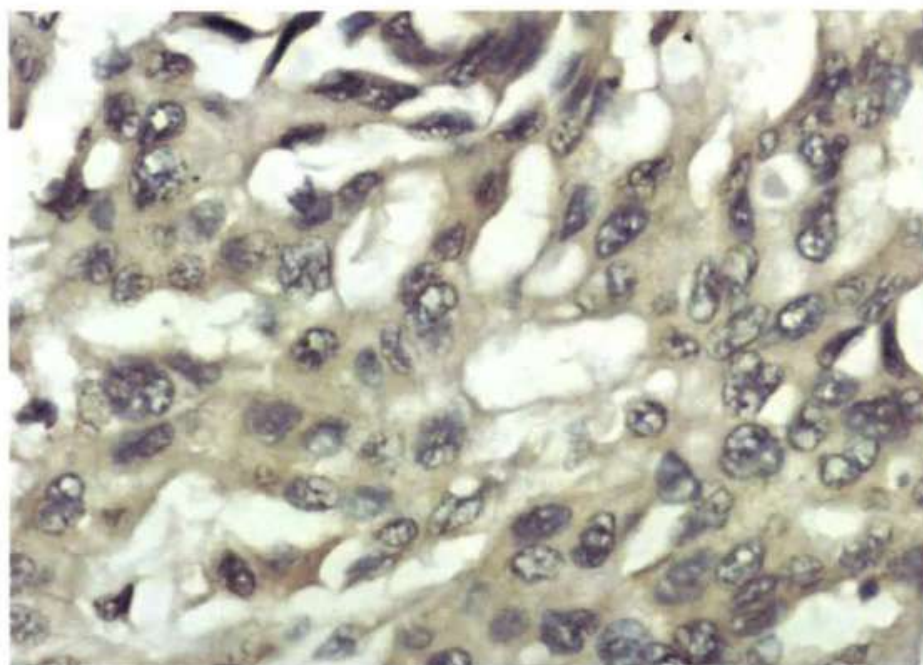
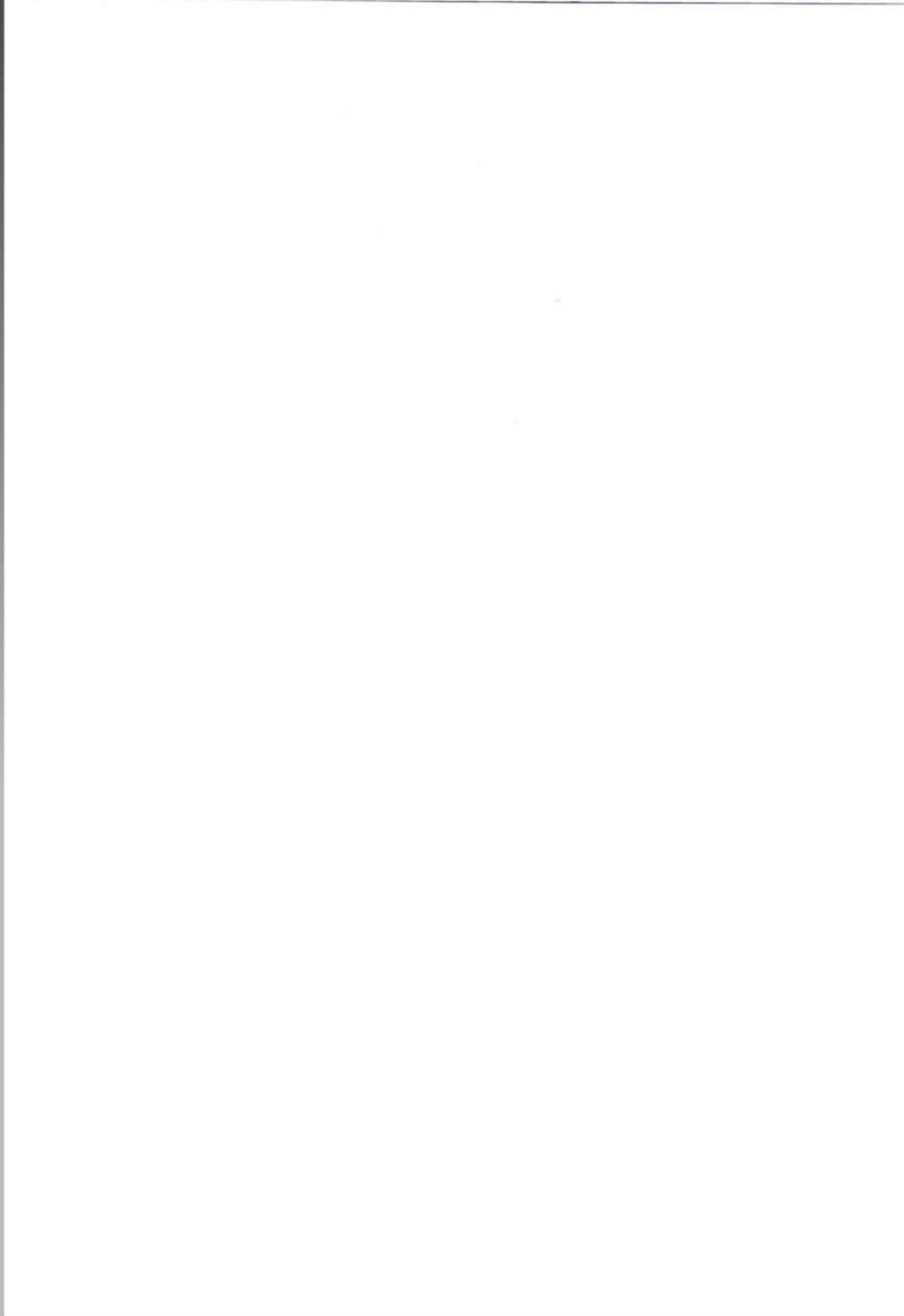


图 3-14 弱阳性 ($\times 400$ 倍)

注: c-Met 蛋白表达弱阳性: 大于 50% 细胞表达为弱阳性, 而阳性细胞数小于 50%



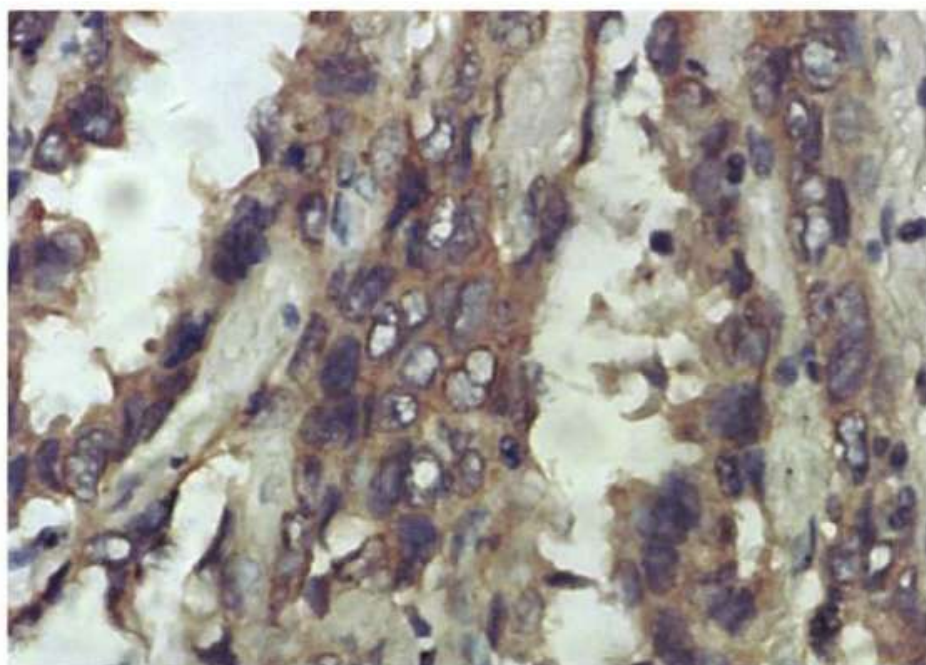


图 3-15 阳性 ($\times 400$ 倍)

注: c-Met 蛋白表达阳性: 阳性细胞数大于总数 50%

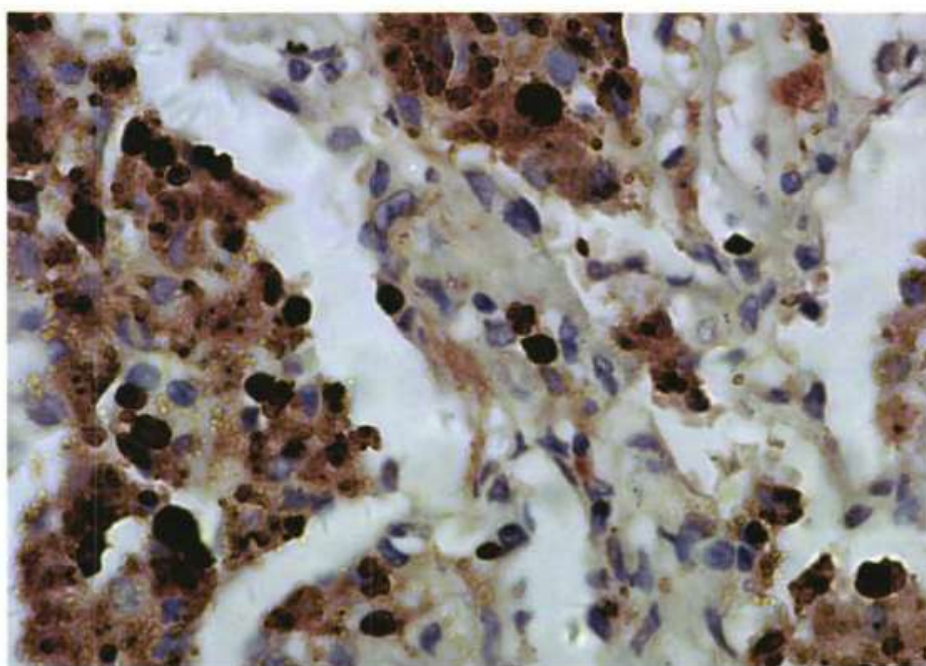


图 3-16 强阳性 ($\times 400$ 倍)

注: c-Met 蛋白表达强阳性: 大于 50% 细胞 c-Met 蛋白表达呈阳性或强阳性。

3.4 EML4-ALK、EGFR、KRAS、c-Met 图谱及各基因之间关系

对 110 例肺腺癌患者进行了 EML4-ALK、EGFR、KRAS 及 c-Met 基因的检测,发现在中国肺腺癌患者中各种基因所占比例: EML4-ALK (11/110,10%), EGFR (58/110, 52.7%), KRAS (4/110,3.6%), c-Met 基因扩增 (6/110,5.5%) (图 3-17)。总的来说,约 71.8%的中国肺腺癌患者存在以上四种基因的突变,并且各种基因之间几乎是不共存的。尽管研究结果发现有 2 例患者同时存在 EGFR 突变及 EML4-ALK 融合基因,但两者不共存具有统计学意义 ($P=0.036$)。两名患者均为年轻女性肺腺癌患者,临床分期分别为 I 期和 III 期。

除此之外,本研究也检测了 c-Met 蛋白在肺腺癌患者中的表达,结果显示 33 例 (33/110,30%) 患者呈阳性,其中有 18 例同时存在 EGFR 突变 ($P=0.803$),这对针对 EGFR 突变的靶向治疗提出新的治疗策略:对于 EGFR 突变并同时存在 c-Met 蛋白表达阳性的患者应根据 Spigel^[8]等提出方案行 MetMAb+EGFR-TKI 联合靶向治疗。然而,相对于 EGFR 突变,只有 2 例 c-Met 蛋白表达阳性患者并存 EML4-ALK 融合基因,可见 EML4-ALK 融合基因阳性患者 c-Met 蛋白一般表达为阴性。

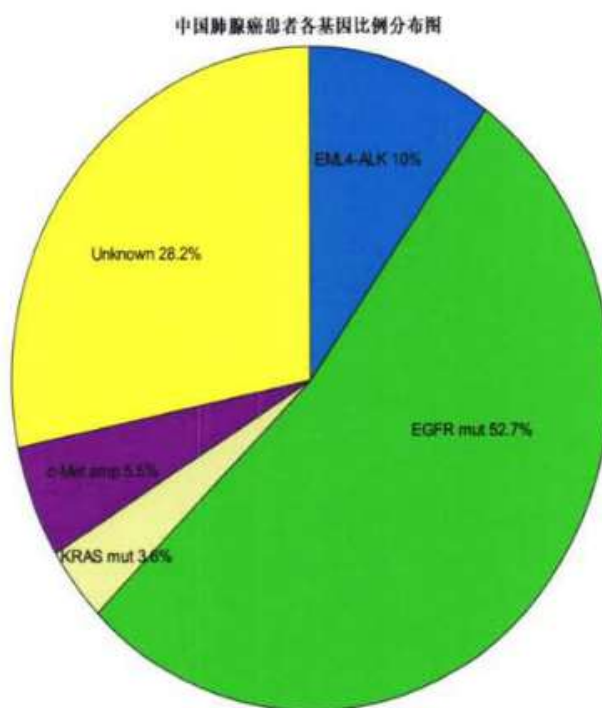


图 3-17 中国肺腺癌患者各基因比例分布图



第四章 讨论

随着肺癌靶向治疗的突破性进展,针对特定基因的个体化靶向治疗成为目前肺癌治疗的趋势。目前多项临床研究显示靶向治疗相对于传统铂类为基础的化疗方案有明显的优势,延长PFS,减少药物副作用并改善患者生活质量。例如,针对EGFR突变及EML4-ALK融合基因的特定靶向药物都取得了显著临床疗效^[1-5,7]。基于以上原因,对肺癌患者应进行一系列已知基因检测,如KRAS、EGFR、EML4-ALK、c-Met、HER-2、BRAF等,并分析其与临床病理等之间关系,对每一个肺癌患者根据其基因突变类型制定相应靶向治疗方案。

目前已有几项临床研究对这些基因进行了检测并进行了分析。规模最大的一项为Kris^[9]等对830例美国肺腺癌患者检测目前已发现的十种基因突变,其中包括KRAS, EGFR, EML4-ALK, BRAF, PIK3CA, c-Met, HER2, MEK1, NRAS, AKT1,发现各种基因所在比例:KRAS突变为22%,EGFR 17%,EML4-ALK 7%,BRAF 2%,其它基因所占比例甚少。而两项来自亚洲的研究显示了不同的基因结构。Sun^[10]等对52例中国无吸烟史的肺腺癌患者检测九种基因,包括EGFR, KRAS, NRAS, HRAS, HER2, BRAF, EML4-ALK, PIK3CA, LKB1,发现基因分布为:EGFR 78.8%,EML4-ALK 5.8%,HER-2 3.8%,KRAS 1.9%,未知基因为9.6%。另外一项来自韩国的对于229例无吸烟史的肺腺癌患者检测EGFR、KRAS、EML4-ALK三种基因,结果显示:EGFR 48%,EML4-ALK 8.3%,KRAS 3.5%,未知基因为40.2%^[14]。由此可见,亚裔肺腺癌患者中各项基因分布与欧洲人群有着普遍的不同。根据目前临床研究显示,EGFR-TKI药物已经作为治疗EGFR突变阳性患者的一线化疗药物,而亚裔肺腺癌患者中EGFR突变比例明显高于欧洲人群,因此在亚裔肺腺癌患者中研究多种基因分布及临床特征更有意义。除针对EGFR突变及EML4-ALK融合基因的靶向治疗取得了显著疗效,今年针对c-Met基因扩增的靶向治疗也取得了相应进展。Spigel^[8]等报道MetMAb(Met受体的单效价单克隆抗体)+厄洛替尼(ME)方案对比安慰剂+厄洛替尼(PE)方案显著改善了Met IHC阳性者(其中包括c-Met基因扩增阳性者)的PFS和OS,从而提出MetMAb对c-Met基因扩增和c-Met蛋白表达阳性NSCLC患者的个体化治疗。然而,目前为止,尚没有研究报道中国肺腺癌患者中EGFR、

KRAS、EML4-ALK、c-Met 四种基因所占比例、各自临床特点及相互关系。

本研究对 110 例中国肺腺癌患者进行了 EGFR、KRAS、EML4-ALK、c-Met 基因扩增检测,结果显示 EGFR 52.7%、EML4-ALK 10%、KRAS 3.6%、c-Met 5.5%,未知基因为 28.2%。根据目前大型临床研究实验结果,EGFR-TKI 可以用于 EGFR 突变患者^[1-5],crizotinib 可用于 EML4-ALK 融合基因阳性患者^[7],MetMAb^[8]可以针对 c-Met 基因扩增阳性的 NSCLC 患者,即约 70%的中国肺腺癌患者可以根据基因检测行肺癌个体化靶向治疗。因此,行化疗之前,在中国肺腺癌人群中常规检测这几种基因显得尤为重要。

除此之外,本研究同时验证了之前一系列临床实验的结果。EML4-ALK 融合基因阳性率为 10%,主要发生于不吸烟的肺腺癌患者 ($P=0.035$),与 KRAS 基因不共存,主要存在于 EGFR 突变野生型患者 ($P=0.036$)^[15-20],但其与性别、肿瘤分期无明显相关性 ($P=0.949,0.740$),且在无吸烟史的 EGFR 突变野生型的肺腺癌患者中发生比例为 33% (9/11),与 Shaw^[19]等发现在无吸烟史的 EGFR 突变野生型患者中,每 3 个中有 1 例为 EML4-ALK 融合基因阳性的结果基本符合^[19]。然而,与以往研究不同的是,本研究显示 EML4-ALK 融合基因与年龄无明显相关性 ($P=0.672$),可能由于本研究中小于 60 岁患者年龄所占比例 (79/110,71.8%) 相对其它研究较高所致。EGFR 突变主要发生于年轻、无吸烟史的女性患者 ($P=0.002,0.001,<0.001$)^[21,22]。c-Met 基因扩增与 EGFR、KRAS 突变相斥,其与年龄、性别、吸烟状态及肿瘤分期无明显相关性 ($P=0.45,1.000,1.000,0.606$)^[13,23-24]。由于本研究中 110 例肺腺癌患者中只有 29 例患者有吸烟史 (29/110, 26.4%),因而只检测出 4 例 KRAS 突变,与 Wu 等的检测结果也基本一致^[25]。

本研究结果显示:EGFR、KRAS、EML4-ALK 和 c-Met 基因扩增四者之间是相互排斥的,也首次在中国肺腺癌患者中证实 EML4-ALK 融合基因与 c-Met 基因扩增不共存的现象。一项开放、多中心参与的 II 期临床试验中证实 crizotinib,一种 ALK 及 c-Met 基因共同抑制剂^[7],对于 EML4-ALK 融合基因阳性患者有显著抗肿瘤作用。然而其是针对 EML4-ALK 融合基因还有针对 c-Met 基因扩增仍存在疑问,因为 c-Met 基因扩增可能与 EML4-ALK 融合基因共同存在于同一患者。本实验研究结果显示这两者并不共存,因而证实 crizotinib 对于 EML4-ALK

融合基因特定的靶向治疗作用,这对临床靶向用药有重要意义。

尽管大多数临床研究证实 EML4-ALK 融合基因与 EGFR 突变不共存,但仍有研究报道两者存在共存现象^[15],而本研究也发现两名肺腺癌患者同时存在 EML4-ALK 融合基因及 EGFR 突变(2/11),均为年轻的女性肺腺癌患者。2009 年,Shaw^[19]等对 10 例 EML4-ALK 融合基因阳性患者行 EGFR-TKI 治疗,发现其全部耐药,从而提出 EML4-ALK 融合基因可能是 EGFR-TKI 原发耐药的一种机制的观点。而另外的研究证实 EGFR 下游信号的激活可能参与 EML4-ALK 融合基因对 crizotinib 继发耐药机制。一项发表在新英格兰杂志上研究表明 EML4-ALK 融合基因阳性的 NSCLC 患者在使用 crizotinib 临床缓解后不久出现 C1156Y 及 L1196M 突变,从而导致继发耐药^[26],并且最近一项研究^[27]应用 crizotinib 诱导表达 EML4-ALK 融合基因的 NSCLC 细胞耐药后,发现其在发生继发突变的同时激活了 EGFR 下游信号,并且该研究也发现在 50 例 EML4-ALK 融合基因中有 3 例同时存在 EGFR 突变(3/50,6%),从而提出 EGFR 突变也可能是导致 crizotinib 继发耐药原因之一^[27]。综合以上观点,EML4-ALK 融合基因与 EGFR 突变是相辅相成的关系,两者在靶向药物耐药方面更是不可分割。因而,对于两者共存的肺腺癌患者应考虑联合靶向治疗以提高治疗效果,防止耐药发生。

c-Met 基因扩增已证实是导致 EGFR-TKI 继发耐药机制,然而未服用 EGFR-TKI 的 NSCLC 患者也发现存在 c-Met 基因扩增。因为目前检测方法及判断阳性标准不一致,c-Met 基因扩增在未服用 EGFR-TKI 的 NSCLC 患者中所占比例约为 2%-10%左右不等^[13,28-32],且有研究提示 c-Met 基因扩增阳性是 NSCLC 患者预后差的指标^[30],因此对于这部分患者行特定靶向治疗方案尤为重要。然而因为判断标准不统一,且用 FISH 及绝对荧光定量 PCR 检测 c-Met 基因扩增并不能普及且价格昂贵,因而在靶向治疗时需要更灵敏指标。一项研究发现 c-Met 基因扩增与 c-Met IHC 阳性之间有紧密相关性(Pearson's $s=0.42$, $P<0.0001$)^[24],且所有基因拷贝数大于 5 的患者 c-Met 蛋白均表达阳性。Okuda^[28]等也发现 10 例 c-Met 基因扩增阳性患者中有 7 例 c-Met 蛋白表达阳性,两者呈紧密相关性($P=0.023$)。本研究根据 Spigel^[8]报道的判断 c-Met IHC 阳性方法,发现 110 例肺腺癌患者有 33 例阳性患者(33/110,30%),其中 6 例 c-Met 基因扩增阳性者都包括在内。除

此外,2011年,Spigel^[8]等首次报道 MetMab (Met 受体的单效价单克隆抗体)+厄洛替尼 (ME) 联合方案显著改善了 Met IHC 阳性者的 PFS 和 OS,同时包括 c-Met 扩增阴性者,从而提出作为联合靶向治疗指标,c-Met 蛋白表达可能比 c-Met 基因扩增更灵敏。本研究发现 c-Met 蛋白表达阳性者有 18 例同时存在 EGFR 突变,因此对于 EGFR 突变并共存 c-Met 蛋白表达阳性患者应考虑同时行 MetMab 和 EGFR-TKI 联合治疗。然而,要准确制定化疗方案仍需进一步的临床对照研究加以证实。

肺癌个体化靶向治疗的进展使对每位肺癌患者进行基因分型有重要的意义。本实验采用四种方法检测四项基因: FISH 法检测 EML4-ALK 融合基因,直接测序法检测 EGFR 和 KRAS 突变,绝对荧光定量 PCR 及免疫组化法检测 c-Met 基因扩增及蛋白表达。根据以往研究,RT-PCR 及 FISH 法普遍用于检测 EML4-ALK 融合基因,该融合基因阳性率为 2-13%^[15-20]。RT-PCR 相对于 FISH 方法较灵敏,但由于 EML4-ALK 融合基因变异体多,不能检测出潜在的 EML4-ALK 变异体及非 EML4 配体的 ALK 融合基因^[18]。除此之外,RT-PCR 不能用于石蜡标本,只能用于新鲜标本,限制了其应用范围。本实验采用 FISH 法检测出 11 例 (11/110,10%) EML4-ALK 融合基因阳性者,与其它研究基本相符。直接测序法是检测 EGFR 及 KRAS 突变目前最公认方法,但由于其灵敏度低,可能导致检测 EGFR 突变阳性率低。Zhou^[33]等用直接测序法及 ARMS 法检测 100 例中国 NSCLC 患者,直接测序法 EGFR 突变阳性率为 51%,ARMS 法阳性率为 69%。本实验应用直接测序法检测 EGFR 突变,阳性率为 52.7%,与其检测结果基本相符^[33]。目前绝对荧光定量 PCR 及 FISH 方法均可用于 c-Met 基因扩增检测,但由于 FISH 费用高而限制其应用。绝对荧光定量 PCR 用于 c-Met 基因扩增检测目前尚无统一标准,且如前所述, MetMab 对于 c-Met 蛋白表达阳性患者有显著疗效^[8],因此可考虑检测蛋白表达代替基因扩增作为靶向治疗指标。基于目前针对 NSCLC 靶向治疗的飞速发展,应考虑常规对肺腺癌患者行这四项基因检查,从而确定最佳治疗方案。

第五章 结论

部分中国肺腺癌患者中 EML4-ALK、EGFR、KRAS 及 c-Met 基因扩增所占比例分别为 10%，52.7%，3.6%，5.5%，且基因大多不共存。约 70% 的部分中国肺腺癌患者可以行特定靶向治疗。

参考文献

- [1] Fukuoka M, Wu YL, Thongprasert S, et al. Biomarker analyses and final overall survival results from a phase III, randomized, open-label, first-line study of gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients with advanced non-small-cell lung cancer in Asia (IPASS). *J Clin Oncol* 2011;29(21): 2866-74.
- [2] Lee JS, Park K, Kim SW et al. A randomized phase III study of gefitinib versus standard chemotherapy (gemcitabine plus cisplatin) as a first-line treatment for never-smokers with advanced or metastatic adenocarcinoma of the lung. *J Thorac Oncol* 2009;4(9):S283.
- [3] Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2010;11(2):121-8.
- [4] Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med.* 2010;362(25):2380-8.
- [5] Zhou C, Wu YL, Chen G, et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol.* 2011;12(8):735-42.
- [6] 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(7153):561-566. PMID:17625570
- [7] Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, et al. Anaplastic Lymphoma Kinase Inhibition in Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*, 2010, 363(18):1693-1703. PMID:20979469
- [8] D. R. Spigel, T. J. Ervin, R. Ramlau, et al. Final efficacy results from OAM4558g, a randomized phase II study evaluating MetMAb or placebo in combination with erlotinib in advanced NSCLC. *J Clin Oncol* 29: 2011 (suppl; abstr 7505)

- [9] M.G.Kris, B.E.Johnson, D.J.Kwiatkowski, et al. Identification of driver mutations in tumor specimens from 1,000 patients with lung adenocarcinoma: The NCI's Lung Cancer Mutation Consortium (LCMC). *J Clin Oncol* 29: 2011 (suppl; abstr CRA7506)
- [10] Yihua Sun, Yan Ren, Zhaoyuan Fang, et al. Lung Adenocarcinoma From East Asian Never-Smokers Is a Disease Largely Defined by Targetable Oncogenic Mutant Kinases. *J Clin Oncol*. 2010 Oct 20;28(30):4616-20. PMID:20855837
- [11] Pao W, Wang TY, Riely GJ, et al. KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Med*. 2005 Jan;2(1):e17. PMID:15696205
- [12] Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 2004 May 20;350(21):2129-39. PMID:15118073
- [13] Beau-Faller M, Ruppert AM, Voegeli AC, et al. MET gene copy number in non-small cell lung cancer: molecular analysis in a targeted tyrosine kinase inhibitor naive cohort. *J Thorac Oncol* 2008;3(4):331-339.
- [14] Kim HR, Shim HS, Chung JH, et al. Distinct clinical features and outcomes in never-smokers with nonsmall cell lung cancer who harbor EGFR or KRAS mutations or ALK rearrangement. *Cancer*. 2012 Feb 1;118(3):729-39. PMID:21720997
- [15] 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, 13(9):188. PMID:20624322
- [16] 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(1):13-17. PMID:18166835
- [17] Shinmura K, Kageyama S, Tao H, et al. EML4-ALK fusion transcripts, but no NPM-, TPM3-, CLTC-, ATIC-, or TFG-ALK fusion transcripts, in non-small cell lung carcinomas. *Lung Cancer*, 2008, 61(2):163-169. PMID:18242762
- [18] Rodig SJ, Mino-Kenudson M, Dacic S, et al. Unique clinicopathologic features

- characterize ALK-rearranged lung adenocarcinoma in the western population. Clin Cancer Res, 2009, 15(16):5216-5223.PMID:19671850
- [19] 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(26):4247-4253. PMID:19667264
- [20] Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, et al. EML4-ALK lung cancers are characterized by rare other mutations, a TTF-1 cell lineage, an acinar histology, and young onset. Mod Pathol, 2009, 22(4):508-515. PMID:19234440
- [21] Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, et al. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. J Natl Cancer Inst. 2005 Mar 2;97(5):339-46. PMID: 15741570
- [22] Pao W, Miller V, Zakowski M, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Sep 7;101(36):13306-11. PMID: 15329413
- [23] Cappuzzo F, Marchetti A, Skokan M, et al. Increased MET gene copy number negatively affects survival of surgically resected non-small-cell lung cancer patients. J Clin Oncol. 2009 Apr 1;27(10):1667-74. PMID: 19255323
- [24] Dziadziuszko R, Wynes MW, Singh S, et al. Correlation between MET gene copy number by silver in situ hybridization and protein expression by immunohistochemistry in non-small cell lung cancer. J Thorac Oncol. 2012 Feb;7(2):340-7. PMID: 22237262
- [25] Wu CC, Hsu HY, Liu HP, et al. Reversed mutation rates of KRAS and EGFR genes in adenocarcinoma of the lung in Taiwan and their implications. Cancer 113:3199-3208, 2008.
- [26] 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(18):1734-1739. PMID:20979473
- [27] Sasaki T, Koivunen J, Ogino A, et al. A novel ALK secondary mutation and EGFR signaling cause resistance to ALK kinase inhibitors. Cancer Res. 2011 Sep 15;71(18):6051-60. PMID:

21791641

- [28] Okuda K, Sasaki H, Yukiue H, et al. Met gene copy number predicts the prognosis for completely resected non-small cell lung cancer. *Cancer Sci.* 2008 Nov;99(11):2280-5. PMID: 19037978
- [29] Bean J, Brennan C, Shin J-Y, et al. MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:20932-20937.
- [30] Cappuzzo F, Marchetti A, Skokan M, et al. Increased MET gene copy number negatively affects survival of surgically resected non-small cell lung cancer patients. *J Clin Oncol* 2009;27:1667-1674.
- [31] Kubo T, Yamato H, Lockwood WW, et al. MET gene amplification or EGFR mutation activate MET in lung cancers untreated with EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Int J Cancer* 2009;124:1778-1784.
- [32] Onozato R, Kosaka T, Kuwano H, et al. Activation of MET by gene amplification or by splice mutations deleting the juxtamembrance domain in primary resected lung cancers. *J Thorac Oncol* 2009;4:5-11.
- [33] Zhou Q, Zhang XC, Chen ZH, et al. Relative abundance of EGFR mutations predicts benefit from gefitinib treatment for advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2011;29(24):3316-21.

综述一

棘皮动物微管结合蛋白 4-间变淋巴瘤 激酶融合基因与非小细胞肺癌

近年来,针对表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitors, TKIs)已成为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)治疗方面的里程碑性进展。但对EGFR突变阴性者疗效欠佳,且部分病例存在获得性耐药,因此寻找新的分子靶点成为NSCLC治疗中的关键问题。棘皮动物微管结合蛋白4-间变淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase with the echinoderm microtubule-associated protein-like 4, EML4-ALK)是在肺癌患者中发现的新型融合基因,其与EGFR及v-Ki-ras2大鼠Kirsten肉瘤病毒癌基因同源基因(v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, KRAS)突变不共存,且含有该融合基因的肺癌患者具有特定的临床特征,提示该基因是肺癌特异性较高的分子标记物。除此之外,II期临床试验结果表明ALK-TKI对EML4-ALK阳性NSCLC患者有显著的抗肿瘤作用。基于以上两点,EML4-ALK可能成为继EGFR之后的又一分子靶点,其分子特点、临床特征、检测方法及临床试验等多方面均引起了人们的广泛关注。现将EML4-ALK融合基因的有关内容综述如下。

一、EML4-ALK融合基因

1、EML4-ALK融合基因的结构

2007年,Soda等^[1]扩增1例NSCLC患者手术切除标本中的cDNA时,发现了一段由3926bp组成的片段,其编码产物是由1059氨基酸组成的蛋白质。编码该蛋白氨基端(残基1-496)的是部分EML4基因,而编码羧基端(残基497-1059)的则是由部分ALK基因,因而命名此段cDNA为EML4-ALK融合基因。

EML4属于棘皮动物微管相关蛋白样蛋白家族,由N末端碱基区、疏水的棘皮动物微管相关蛋白区(hydrophobic echinoderm microtubule-associated protein-like protein, HELP)以及WD重复区(WD repeats)构成。其中部分N末端碱

基区, HELP及部分WD重复区与ALK发生融合。ALK属于受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTK)家族, 于1994年在间变性大细胞淋巴瘤(anaplastic large cell lymphomas, ALCLs)中发现其与核磷酸蛋白(nucleophosmin, NPM)形成NPM-ALK融合基因^[2]。ALK由胞外配体结合域、跨膜区和胞内酪氨酸激酶区构成, 其与EML4发生融合的是胞内酪氨酸激酶区。

EML4-ALK融合基因重排发生在2号染色体短臂上的2区1带和2区3带(2P21和2P23)^[1]。EML4基因13号外显子下游3.6kb处断裂反转并连接到ALK基因21号外显子上游297bp处, 形成EML4-ALK融合基因。随后又陆续发现了其他EML4-ALK融合基因类型, 融合位点发生在EML4基因外显子2, 6, 13, 14, 15, 18, 20, 21等处, 但ALK基因均发生在编码胞内酪氨酸激酶区^[3-10]。除此之外, 还发现ALK与原肌凝蛋白受体激酶融合基因(tropomyosin receptor kinase-fused gene, TFG)和驱动蛋白家族成员5B基因(kinesin family member 5B, KIF5B)^[6, 11]发生融合(见图1^[12])。

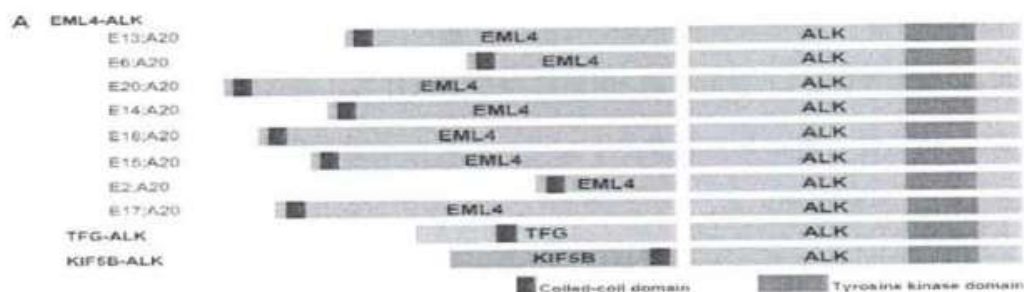


图1^[12] EML4-ALK融合基因各种变异体及非EML4配体结构图

2、EML4-ALK融合基因致癌活性

Soda等^[11]将转染EML4-ALK融合基因的小鼠3T3成纤维细胞接种到裸鼠体内, 发现其在出生后几周便在双肺形成腺癌结节, 从而在动物体内证实了该融合基因的致癌活性。已有研究证实, EML4-ALK融合基因阳性的人体肺癌组织中ALK基因mRNA水平显著提高^[13-14], 提示其在人体内的致癌作用。然而, Martelli等^[15]在EML4-ALK阳性NSCLC组织样本中用免疫组化法未能检测出该基因编码的蛋白表达, 可能是由于EML4基因启动子增强子区域的转录活性较低, 使其表达的蛋白量太低所致。

二、EML4-ALK阳性NSCLC患者的临床特征

现阶段研究表明, EML4-ALK融合基因发生于有鲜明临床特征的NSCLC患

者,但却与EGFR、KRAS等突变不共存^[16-19]。EML4-ALK融合基因与NSCLC临床特征的关系如下。

1、与年龄、性别、种族及吸烟的关系

尽管EML4-ALK融合基因是在一个吸烟肺癌患者的标本中首次扩增出来的^[1],且Shinmura等^[17]在77例NSCLC患者中检测出的2例EML4-ALK阳性NSCLC都是吸烟患者,但随后大样本实验提示其主要发生于不吸烟或轻度吸烟的患^[4, 10, 14, 18-20]。

研究人员还发现EML4-ALK融合基因多存在于年轻患者^[14, 18-20]。一项来自日本的数据显示^[20]从363例NSCLC中检出的11例EML4-ALK阳性患者中年龄小于50岁的占36%,而在剩余的352例EML4-ALK阴性患者中却仅占5%;Zhang等^[14]发现12例EML4-ALK阳性者中有8例年龄小于60岁。因此,EML4-ALK融合基因主要发生于年轻患者中。

EML4-ALK融合基因首次分离来自一名男性NSCLC患者^[1]。Shaw等^[19]以女性、亚裔、轻度或者不吸烟的腺癌中至少符合2项为标准,有选择性地挑选了141例NSCLC患者,发现EML4-ALK阳性患者多数为男性($P<0.039$)。但最新研究发现111例女性NSCLC患者中有4例该融合基因阳性者,而在202例男性NSCLC患者仅1例阳性,提示其主要发生于女性^[10]。目前需更大样本的临床研究来确定EML4-ALK与性别的关系。

尽管EGFR突变主要发生于亚裔,但研究发现日本NSCLC患者中EML4-ALK阳性率约为4%~8%^[10, 16-17, 20],西方国家和中国NSCLC患者中约在5%~12%,因此认为EML4-ALK融合基因在NSCLC中的表达没有种族差异^[4, 14-15, 18-19]。

2、临床分期与预后

EML4-ALK阳性NSCLC临床分期主要处于进展期^[10, 18-19]。Shaw等^[19]发现19例阳性患者中有17例处于IV期。Rodig等^[18]也发现80% (16/20) EML4-ALK阳性患者处于IV期。

关于EML4-ALK融合基因阳性NSCLC的预后也有一些研究结果。Inamura等^[20]发现处于IA期与IIIA期的EML4-ALK阳性患者总生存期分别可达到(59.0±8.8)和(39±6.9)个月。除此之外,Takahashi等^[10]也发现5例该融合基因阳性者中有2例IA期患者手术后总生存期超过60个月,且无明显转移和复发;另2例IIIA期患者总生存期分别达到99和53个月。因此,EML4-ALK融合基因阳性

NSCLC预后相对于野生型较好。

3、EML4-ALK阳性NSCLC形态学特征

尽管EML4-ALK融合基因在肺鳞癌中也可呈阳性^[14]，但其主要存在于肺腺癌^[9-10, 13-15, 16-19]。不同种族的EML4-ALK阳性肺癌患者其组织学亚型有显著差异^[10, 18-20]。研究发现^[20]日本人群中EML4-ALK阳性NSCLC的主要组织学类型为低分化腺泡型，并含有大量粘蛋白。而Rodig等^[18]检测了358例来自欧洲的肺癌患者，16例阳性者中有11例肿瘤细胞呈实体或片状生长，分化程度低，与腺泡型、乳头型及支气管肺泡型生长方式明显不同，且56%的肿瘤含有大量印戒细胞。由此可见，亚裔中EML4-ALK融合基因阳性NSCLC以腺泡型腺癌为主，而在西方人群中，绝大部分为实性腺癌伴粘液分泌型，含有大于10%的印戒细胞（主要见于胃肠道肿瘤），腺泡型及支气管肺泡型则相对较少。

三、EML4-ALK融合基因与靶向治疗

EGFR-TKI用于肺癌靶向治疗已出现了严重的耐药问题。研究发现EGFR 20外显子790位上密码子发生了错义突变（T790M）、MET原癌基因（*met proto-oncogene*, MET）扩增及KRAS基因突变与其耐药相关。而最近发现的EML4-ALK融合基因可能是又一潜在的耐药机制。Koivunen等^[3]发现厄洛替尼不能抑制EML4-ALK阳性的NSCLC细胞株H3122增殖；Shaw等^[19]以女性、亚裔、轻度或者不吸烟的腺癌中至少符合2项为标准，有选择性地挑选了141例NSCLC患者，发现在轻度或不吸烟且无EGFR突变的NSCLC患者中，33%的患者可检测出EML4-ALK融合基因。同时，他们还对53例NSCLC行EGFR-TKI治疗，19例患者有显著疗效，但其中无一例呈EML4-ALK基因阳性，而34例对EGFR-TKI耐药者中，29%检测出该融合基因，提示其存在可能是EGFR-TKI原发性耐药的重要原因。因此，对于EGFR-TKI不敏感的EGFR突变阴性者应检测是否存在EML4-ALK融合基因，如为阳性则可行针对性ALK抑制剂治疗。

基于目前的报道，15%~30% NSCLC存在KRAS突变，EGFR突变约为10%（东西方相差明显），EML4-ALK融合基因占5%，因此可对NSCLC患者进行KRAS、EGFR及EML4-ALK等基因变异分布检测，实现肺癌治疗的“个体化”，达到最佳化疗效果。具体步骤参考图2^[21]。

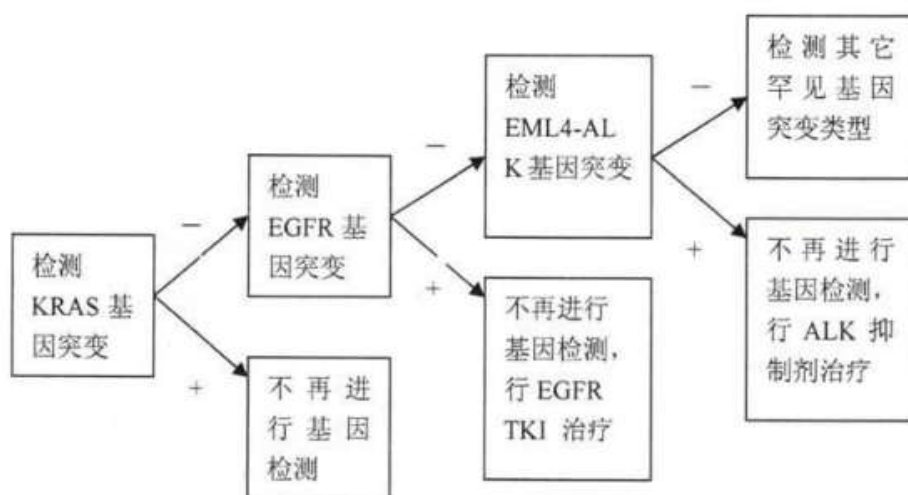


图2^[21] NSCLC中腺癌组织类型的分子检测步骤图

其中, 针对EML4-ALK融合基因的靶向治疗已取得了初步进展。Koivunen等^[3]发现ALK抑制剂(TAE684)在动物体外、体内都有显著的抗肿瘤作用。更令人兴奋的是, 目前一种口服的ALK及MET联合抑制剂PF-02341066已进入临床试验。在2009 ASCO年会上, Kwak等^[22]报道19例EML4-ALK融合基因阳性NSCLC患者在口服PF-02341066后, 疾病控制率达到79%。随后一项开放、多中心参与的II期临床试验中^[23], 82例EML4-ALK阳性NSCLC患者口服PF-02341066 250mg, 2次/d后, 客观缓解率为57% (47/82), 8周疾病控制率为87%。72%的患者6个月内疾病无进展, 而其它传统二线化疗药物仅为27.2%。除此之外, 病例报道1例EML4-ALK基因阳性NSCLC患者在服用PF-02341066六周后肿瘤明显缩小, 且10个月内未发生转移^[24]。另外1例女性EML4-ALK阳性NSCLC患者在服用PF-02341066四周后肿瘤缩小45.1%^[25]。目前关于PF-02341066 III期临床试验正在招募中。

尽管目前ALK抑制剂PF-02341066在I和II期临床试验中有良好的抗肿瘤作用, 但正如T790M突变导致EGFR TKI继发耐药一样, 最近研究发现1例EML4-ALK阳性NSCLC患者在服用PF-02341066 5个月后疾病突然进展, 基因分析该患者治疗前后的痰液及胸水标本, 发现在ALK结合区域出现C1156Y及L1196M突变, 从而导致ALK-TKI不能与ALK酪氨酸激酶区结合, 产生继发耐药^[26]。因而为了进一步阐明ALK抑制剂的耐药机制, 需进一步研究EML4-ALK的下游通路, 并针对下游通路分子设定特定抑制剂以开发新的靶向药物。此外,

对于ALCLs可应用shRNA沉默ALK基因以阻断酪氨酸激酶活化^[27], 目前人们正在探索是否可用相同的方法来治疗EML4-ALK阳性NSCLC。

四、结论

综上所述, EML4-ALK融合基因主要发生在年轻、轻度吸烟或不吸烟的NSCLC患者中, 预后比无EML4-ALK融合基因者好, 其病理分型主要为腺泡型和实性腺癌伴粘液分泌型, 并且不同种族其病理分型不同。EML4-ALK融合基因可能是EGFR-TKI发生原发性耐药的重要机制, 且针对ALK的靶向抑制剂的I期和II期临床试验结果表明其对EML4-ALK阳性NSCLC患者有显著疗效, 提示其可能是继EGFR-TKI后又一NSCLC分子治疗靶点。

参考文献

- [1] 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(7153):561–566.PMID:17625570
- [2] Shiota M, Fujimoto J, Semba T, et al. Hyperphosphorylation of a novel 80 kD protein-tyrosine kinase similar to Ltk in a human Ki-1 lymphoma cell line, AMS3. *Oncogene*, 1994, 9(6): 1567-1574.PMID:8183550
- [3] Koivunen JP, Mermel C, Zejnullahu K, et al. EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(13):4275–4283.PMID:18594010
- [4] 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(8):1723–1733.PMID:19170230
- [5] Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, et al. KIF5B-ALK, a novel fusion oncokinase identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2009, 15 (9):3143–3149.PMID:19383809
- [6] Lin E, Li L, Guan Y, et al. Exon array profiling detects EML4-ALK fusion in breast, colorectal, and non-small cell lung cancers. *Mol Cancer Res*, 2009, 7(9): 1466–1476.PMID:19737969
- [7] Takeuchi K, Choi YL, Soda M, et al. Multiplex reverse transcription-PCR screening for EML4-ALK fusion transcripts. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(20): 6618–6624.PMID:18927303
- [8] Choi YL, Takeuchi K, Soda M, et al. Identification of novel isoforms of the EML4-ALK transforming gene in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, 2008, 68(13):4971–4976. PMID:18593892
- [9] Perner S, Wagner PL, Demichelis F, et al. EML4-ALK fusion lung cancer: a rare acquired event. *Neoplasia*, 2008, 10(3):298–302.PMID:18320074
- [10] Takahashi T, Sonobe M, Kobayashi M, et al. Clinicopathologic features of non-small-cell lung cancer with EML4-ALK fusion gene. *Ann Surg Oncol*, 2010,

- 17(3):889–897.PMID:20183914
- [11] Soda M, Takada S, Takeuchi K, et al. A mouse model for EML4-ALK-positive lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*,2008,105(50):19893–19897. PMID:19064915
- [12] 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(10):1773-1780.PMID: 20418096
- [13] Boland JM, Erdogan S,Vasmatzis G,et al. Anaplastic lymphoma kinase immunoreactivity correlation with ALK gene rearrangement and transcriptional up-regulation in non-small cell lung carcinomas. *Hum Pathol*,2009,40(8): 1152-1158.PMID:19386350
- [14] 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*,2010,13(9):188.PMID:20624322
- [15] 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(2):661–670.PMID:19147828
- [16]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(1): 13–17.PMID:18166835
- [17]Shinmura K, Kageyama S, Tao H, et al. EML4-ALK fusion transcripts, but no NPM-, TPM3-, CLTC-, ATIC-, or TFG-ALK fusion transcripts, in non-small cell lung carcinomas. *Lung Cancer*, 2008,61(2):163–169.PMID:18242762
- [18]Rodig SJ, Mino-Kenudson M, Dacic S, et al. Unique clinicopathologic features characterize ALK-rearranged lung adenocarcinoma in the western population. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(16):5216–5223.PMID:19671850
- [19]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(26):4247–4253.PMID:19667264
- [20]Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, et al. EML4-ALK lung cancers are

- characterized by rare other mutations, a TTF-1 cell lineage, an acinar histology, and young onset. *Mod Pathol*, 2009, 22(4):508-515.PMID:19234440
- [21]Horn L,Pao W. EML4-ALK: Honing in on a new target in Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*,2009,27(26):4232-4235.PMID:19667260
- [22] Kwak EL, Camidge DR, Clark J, et al. Clinical activity observed in a phase I dose escalation trial of an oral c-met and ALK inhibitor, PF-02341066. *J Clin Oncol*,2009,27:15s [suppl;abstract 3509].
- [23]Kwak EL,Bang YJ,Camidge DR, et al. Anaplastic Lymphoma Kinase Inhibition in Non-Small-Cell Lung Cancer.*N Engl J Med*,2010,363(18):1693-1703. PMID:20979469
- [24] Nakajima T, Kimura H, Takeuchi K, et al. Treatment of lung cancer with an ALK inhibitor after EML4-ALK fusion gene detection using endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration. *J Thorac Oncol*, 2010, 5(12):2041-2043.PMID:21102268
- [25]Qu SH, Bazhenova L, Camidge DR, et al. Rapid of dramatic radiographic and clinical response to an ALK inhibitor (crizotinib, PF02341066) in an ALK translocation-positive patient with Non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*,2010,5(12):2044-2046.PMID:21102269
- [26]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(18):1734-1739. PMID:20979473
- [27]Palmer RH,Vernersson E,Grabbe C, et al. Anaplastic lymphoma kinase:signaling in development and disease. *Biochem J*,2009, 420(3):345-361.PMID:19459784

综述二

表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂分子耐药机制研究

肺癌,尤其是非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)是全球最常见的恶性肿瘤之一。由于手术和放疗的局限性,化疗成为治疗非小细胞肺癌的主要方案。但应用传统化疗方案的患者5年生存率仅仅达到15%,因此寻找新的化疗策略已迫在眉睫。近年来,以表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, EGFR-TKI)为靶点的靶向治疗逐渐被大家所关注,并取得了突破性的进展。但是,一部分患者在服用EGFR-TKI初期即出现原发耐药,还有一部分患者尽管治疗初期疾病得到缓解,但不久即出现病情进展并产生获得性耐药。因此探讨EGFR-TKI的分子耐药机制有重要的临床意义。本文就目前EGFR-TKI分子耐药机制的研究现状作一综述。

1. EGFR的分子结构

EGFR属于表皮生长因子受体家族,由胞外受体结合区、跨膜区及含酪氨酸激酶结构域的胞内区三部分组成。EGFR与相应配体结合后形成同源或异源二聚体,激活胞内酪氨酸激酶,进一步激活PI3k-Akt和RAS-RAF-MEK-MAPK通路,从而调节肿瘤细胞的生长、增殖、凋亡、浸润等。

2. EGFR基因突变

EGFR基因位于7号染色体短臂7p21~14区,由28个外显子组成。目前发现的EGFR基因突变大多位于18~21外显子,不同的突变类型对EGFR-TKI的临床疗效产生不同的影响。现已发现的突变类型有:(1)19外显子中746-752位密码子的缺失突变,导致EGFR蛋白中氨基酸序列的丢失。这一突变改变了受体ATP结合囊(ATP-binding pocket, ABP)的角度,从而显著增强肿瘤细胞的敏感^[1];(2)21外显子的突变均为错义突变,发生在858位的L即精氨酸突变为R即亮氨酸(L858R),使激酶活化环(activation loop)的稳定性增加,进而增强了肿瘤细胞对EGFR-TKI的敏感性;(3)18外显子点突变发生较少,其临床意义还不明确;(4)20外显子的第790位上密码子发生了错义突变(T790M),主要与EGFR-TKI获得性耐药有关,将在耐药机制中详细介绍。

3. EGFR原发耐药分子机制

3.1 KRAS 基因突变

v-Ki-ras2 大鼠 Kirsten 肉瘤病毒癌基因同源基因(v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, KRAS)是 EGFR 下游信号传导通路中的关键环节,突变后的 KRAS 基因不依赖于上游 EGFR 的活化而直接激活 MAPK 信号通路,导致肿瘤增殖、转移等^[2]。目前临床研究显示大约 15%-20%的 NSCLC 中存在 KRAS 突变,且主要存在于吸烟的肺腺癌患者。同时研究证实 KRAS 突变与 EGFR 突变不共存,提示其可能与 EGFR-TKI 原发耐药有关。Pao^[3]等发现 38 例对 EGFR-TKI 不敏感的肺腺癌患者中有 9 例(24%)存在 KRAS 突变,却无一例为 EGFR 突变。与此相反,21 例客观缓解的病人中 17 例存在 EGFR 突变,但无一例 KRAS 突变。BR21^[4]研究中 KRAS 突变患者接受厄洛替尼治疗后与安慰剂相比,生存期显著缩短(3.7 个月比 7.0 个月,HR=1.67, P=0.31),提示 KRAS 基因突变导致 EGFR-TKI 原发耐药,是其治疗的反指征。除此之外,一项包括 22 个临床研究、1470 例接受 EGFR-TKI 治疗的 NSCLC 患者的荟萃分析中, KRAS 突变与无突变患者的总有效率(overall response rate, ORR)分别为 3%vs26%。由上可见, KRAS 突变独立于 EGFR 突变,其可以作为预测 EGFR-TKI 原发耐药的分子指标。

3.2 EML4-ALK 融合基因

2007 年, Soda 等^[5]在扩增 1 例 NSCLC 患者手术切除标本中的 cDNA 时,发现了一段 3926 bp 长的片段。此片段由棘皮动物微管结合蛋白 4(echinoderm microtubule-associated protein-like 4, EML4)及间变淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase, ALK)基因各一部分组成,并命名为 EML4-ALK 融合基因。进一步的研究发现 EML4-ALK 融合基因在动物体内外均有显著的致瘤活性^[6],并在 NSCLC 发生发展中起着至关重要的作用。现阶段大量临床研究显示 EML4-ALK 阳性 NSCLC 患者存在共同的临床特点,如主要发生于年轻、不吸烟的肺腺癌患者,与 EGFR、KRAS 突变不共存,病理分型为腺泡型或实体腺癌伴黏液分泌型^[7, 8]。由于 EML4-ALK 融合基因与 KRAS 基因突变相似,与 EGFR 突变不共存,因此推测其可能是又一潜在的原发耐药机制。Koivunen 等^[9]发现厄洛替尼不能抑制 EML4-ALK 阳性的 NSCLC 细胞株 H3122 增殖; Shaw 等^[10]发现在轻度或不吸烟且无 EGFR 突变的 NSCLC 患者中, 33%的患者可检测出

EML4-ALK 融合基因。同时, 他们还对 53 例 NSCLC 进行 EGFR-TKI 治疗, 19 例患者疗效显著, 但其中无呈 EML4-ALK 基因阳性的患者, 而 34 例对 EGFR-TKI 耐药者中 29% 检测出该融合基因。由此可见, EML4-ALK 融合基因可能是 EGFR-TKI 原发性耐药的重要原因。

3.3 HER-2 突变

与 EGFR 相同, 原癌基因人类表皮生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor-2, HER2)蛋白也是表皮生长因子受体 HER 家族中的一员。HER-2 与其它 HER 家族成员形成同源或异源二聚体, 并在 NSCLC 发生发展中起着重要作用。基于目前研究报道, 大约 2% 的 NSCLC 中存在 HER-2 突变^[11-13]。HER-2 突变主要为 20 外显子的插入突变, 即在 776 位密码子处插入 Tyr-Val-Met-Ala 氨基酸序列。与 EGFR 突变相似, HER-2 突变也主要发生于年轻、女性不吸烟的亚裔肺腺癌患者, 并且与 EGFR、KRAS 突变不共存。

HER-2 突变使受体持续激活, 导致肿瘤细胞不断增殖、转移。尽管有研究提出 EGFR-TKI 可以抑制存在 HER-2 基因拷贝数增加的 NSCLC 细胞株增殖, 然而 HER-2 突变阳性 NSCLC 细胞株却对 EGFR-TKI 产生耐药^[14]。Han 等^[15]也发现 4 例 HER2 突变阳性的 NSCLC 患者无一例对 gefitinib 有反应, 从而提示 HER-2 突变可能是 EGFR-TKI 原发耐药的一种机制。目前有研究发现一种 EGFR 及 HER-2 双向不可逆抑制剂 BIBW2992 对 HER-2 突变阳性 NSCLC 患者有明显的抗肿瘤作用^[16], 而进一步的临床实验正在进行。

3.4 BRAF 基因突变

性毒菌致癌基因同源体 B1(v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1, BRAF), 与 ARAF、RAF1 同属于 RAF 基因家族。BRAF 蛋白介导 RAS 与 MAPK 相结合, 调节肿瘤细胞增殖、分化和凋亡。在 NSCLC 中, BRAF 突变发生率为 1%~3%^[17]。最近一项临床研究回顾性分析了 1046 例 NSCLC 患者 BRAF 突变的情况, 发现其主要发生于肺腺癌患者, 与 EGFR 及 KRAS 不共存^[18]。目前已有研究证实 BRAF 突变在结直肠癌中是 EGFR 单克隆抗体原发耐药的机制, 但由于其在 NSCLC 中突变率低, 因此需大样本临床研究决定其是否与 EGFR-TKI 原发耐药有关。目前主要应用 BRAF 基因抑制剂 PLX4032、sorafenib 等进行靶向治疗。

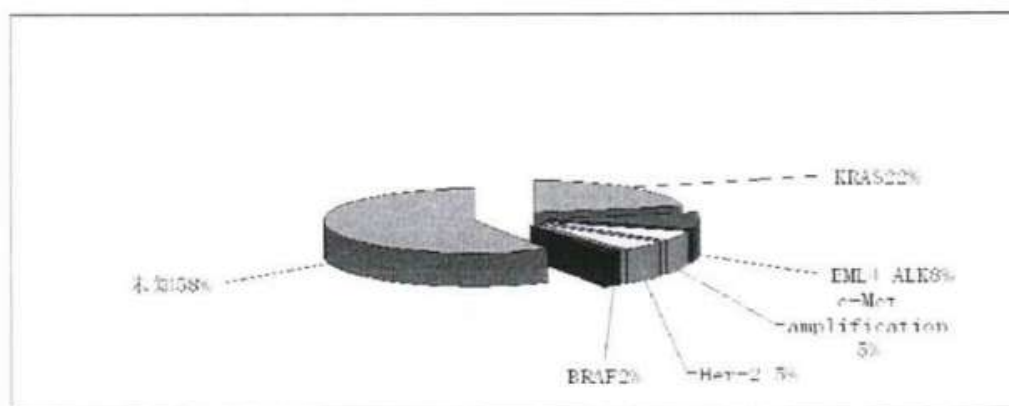


图 1 EGFR-TKI 原发耐药机制图

4. EGFR-TKI 获得性耐药分子机制

4.1 T790M 突变

EGFR 基因 19 及 21 号外显子突变对 EGFR-TKI 有高敏感性，但用药几个月后便出现耐药，因而 EGFR-TKI 的获得性耐药机制也成为研究焦点。2005 年，Kobayashi^[19]等发现 1 例治疗前组织中存在 EGFR19 外显子缺失突变的 NSCLC 患者在开始服用吉非替尼后疾病缓解，但 28 月后疾病再次出现进展。进一步研究发现该患者在原有的基因突变基础上又产生了新的突变，即 20 外显子 790 位上密码子发生错义突变（T790M），从而使 EGFR 重新处于激活状态。因此，研究者推测 T790M 突变可能是导致 EGFR-TKI 获得性耐药的一种机制。与此同时，Pao^[20]等通过检测 6 例服用 EGFR-TKI 疾病进展后患者的组织标本，发现有 3 例存在 T790M 突变，更证实了这一观点。基于目前的临床研究报告，约 50%服用 EGFR-TKI 后产生获得性耐药的 NSCLC 患者存在 T790M 突变。

目前 T790M 突变导致 EGFR-TKI 耐药机制尚不清楚。尽管有研究发现 T790M 突变使庞大的蛋氨酸残基产生位阻效应，减弱了 TKI 与 EGFR 的结合能力，然而这与有 T790M 突变的 NSCLC 患者对不可逆的 EGFR-TKI 抑制剂敏感相矛盾。最近的一项研究提出了新的解释：T790M 突变可以增加 L858R 敏感突变和与 ATP 的结合能力，使其与 EGFR-TKI 结合能力下降，导致获得性耐药^[21]。目前主要应用不可逆 EGFR-TKI 抑制剂，如 BIBW2992、PF00299804、HKI-272 等克服由 T790M 突变引起的耐药问题。

4.2 c-MET 基因扩增

T790M 突变只能解释约一半 EGFR-TKI 获得性耐药机制，而其它机制仍不清

楚。2007年,Engelman^[22]等首次提出 c-Met 基因扩增可能是导致 EGFR-TKI 获得性耐药的另一机制。他们通过用递增浓度的吉非替尼(gefitinib)作用于 EGFR19 外显子敏感突变的 HCC827 细胞株,构造了对 gefitinib 耐药细胞株 HCC827GR, 并发现这一耐药归因于 c-Met 基因扩增。c-Met 基因扩增持续激活由 ErbB3 介导的 PI3K 通路,从而绕过 EGFR 这一分子靶点导致 gefitinib 耐药。之后他们进一步分析了 18 例对 gefitinib/厄洛替尼(erlotinib)耐药的临床肿瘤组织,发现 22% (4/18) 存在 c-Met 基因扩增。根据目前的统计,对 EGFR-TKI 获得性耐药的 NSCLC 患者约 20% 存在 c-Met 基因扩增。c-Met 基因扩增可以发生于肺腺癌及鳞癌,并没有显著的临床特点。在肺腺癌中,其与 KRAS 突变及 EGFR 基因扩增不共存。

目前为解决 EGFR-TKI 耐药问题,针对 c-Met 靶向治疗已取得初步进展。在 2011 ASCO 年会上公布了 c-Met 受体拮抗剂(MetMab)联合厄洛替尼治疗晚期 NSCLC 患者的多中心随机双盲 II 期临床研究(OAM4588 研究)的临床疗效^[23]。在 c-Met 免疫组化(IHC)高表达的患者中,厄洛替尼联合 MetMab 能显著改善疾病无进展生存期(PFS)和总生存期(OS),且耐受性好,而在 c-Met 低表达患者中,厄洛替尼联合 MetMab 组的 PFS 和 OS 较差,其中 c-Met IHC 阳性患者中包括 c-Met 基因扩增者。这项研究结果表明存在 c-Met 基因扩增的 EGFR-TKI 耐药患者可以运用 MetMab 联合厄洛替尼的方法对抗耐药问题,为解决 EGFR-TKI 耐药提供新的治疗策略。

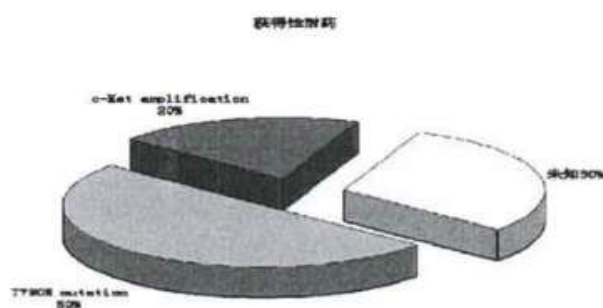


图 2 EGFR-TKI 获得性耐药机制图

5. 其它耐药机制

除了上述提及的关于 EGFR-TKI 原发耐药和获得性耐药机制之外,还有其它的耐药机制。主要包括:(1)蛋白酪氨酸磷酸酶基因(PTEN)缺失,导致 PI3K-Akt

信号通路持续激活,从而降低肺癌患者对 EGFR-TKI 疗效。(2) 胰岛素样生长因子受体 1 (IGFR-1) 过表达,可以旁路激活 EGFR 下游信号通路 Ras/MAPK 和 PI3K/AKT,导致肿瘤细胞对 EGFR-TKI 的低反应。(3) 体外研究上皮细胞-间质转化 (EMT) 与 EGFR-TKI 耐药有关。

6. 结论

EGFR-TKI 靶向治疗已经成为晚期 NSCLC 一种有效治疗手段,然而出现的原发耐药和获得性耐药问题仍未解决。现有的耐药机制大多与其它分子事件相关,如 KRAS、EML4-ALK、Her-2、BRAF 及 c-Met 等。根据这些特定的分子,目前已有相应的靶向药物进行治疗。因此,对于 NSCLC 患者应常规检测这些基因,并制定最优策略,针对性行“个体化”靶向治疗,减少耐药发生,延缓疾病进展,改善生活质量。

参考文献

- [1] Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, et al. Mutations of the epidermal growth factor receptor or gene in lung cancer: biological and clinical implications. *Cancer Res*, 2004;64(24):8919-23
- [2] Schleger C, Heck R, Steinberg P. The role of wild-type and mutated N-ras in the malignant transformation of liver cells. *Mol Carcinog*. May 2000;28(1):31-41.
- [3] Pao W, Wang TY, Riely GJ, et al. KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Med*. Jan 2005;2(1):e17.
- [4] Zhu CQ, da Cunha Santos G, Ding K, et al. Role of KRAS and EGFR as biomarkers of response to erlotinib in National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study BR.21. *J Clin Oncol*. Sep 10 2008;26(26):4268-4275.
- [5] Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. Aug 2 2007;448(7153):561-566.
- [6] Soda M, Takada S, Takeuchi K, et al. A mouse model for EML4-ALK-positive lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 16 2008;105(50):19893-19897.
- [7] Rodig SJ, Mino-Kenudson M, Dacic S, et al. Unique clinicopathologic features characterize ALK-rearranged lung adenocarcinoma in the western population. *Clin Cancer Res*. Aug 15 2009;15(16):5216-5223.
- [8] Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, et al. EML4-ALK lung cancers are characterized by rare other mutations, a TTF-1 cell lineage, an acinar histology, and young onset. *Mod Pathol*. Apr 2009;22(4):508-515.
- [9] Koivunen JP, Mermel C, Zejnullahu K, et al. EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer. *Clin Cancer Res*. Jul 1 2008;14(13):4275-4283.
- [10] 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*. Sep 10 2009;27(26):4247-4253.
- [11] Stephens P, Hunter C, Bignell G, et al. Lung cancer: intragenic ERBB2 kinase

- mutations in tumours. *Nature*. Sep 30 2004;431(7008):525-526.
- [12] Shigematsu H, Takahashi T, Nomura M, et al. Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas. *Cancer Res*. Mar 1 2005;65(5):1642-1646.
- [13] Buttitta F, Barassi F, Fresu G, et al. Mutational analysis of the HER2 gene in lung tumors from Caucasian patients: mutations are mainly present in adenocarcinomas with bronchioloalveolar features. *Int J Cancer*. Dec 1 2006;119(11):2586-2591.
- [14] Wang SE, Narasanna A, Perez-Torres M, et al. HER2 kinase domain mutation results in constitutive phosphorylation and activation of HER2 and EGFR and resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Cell*. Jul 2006;10(1):25-38.
- [15] Han SW, Kim TY, Jeon YK, et al. Optimization of patient selection for gefitinib in non-small cell lung cancer by combined analysis of epidermal growth factor receptor mutation, K-ras mutation, and Akt phosphorylation. *Clin Cancer Res*. Apr 15 2006;12(8):2538-2544.
- [16] De Greve J, Teugels E, De Mey J, et al. Clinical activity of BIBW2992, an irreversible inhibitor of EGFR and HER2 in adenocarcinoma of the lung with mutations in the kinase domain of HER2neu. *J Thorac Oncol* 2009; 4: S307 (abstr)
- [17] Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. Jun 27 2002;417(6892):949-954.
- [18] Marchetti A, Felicioni L, Malatesta S, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer harboring BRAF mutations. *J Clin Oncol*. Sep 10 2011;29(26):3574-3579.
- [19] Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. Feb 24 2005;352(8):786-792.
- [20] Pao W, Miller VA, Politi KA, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med*. Mar 2005;2(3):e73.

- [21] Yun CH, Mengwasser KE, Toms AV, et al. The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 12 2008;105(6):2070-2075.
- [22] Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science*. May 18 2007;316(5827):1039-1043.
- [23] D. R. Spigel, T. J. Ervin, R. Ramlau, et al. Final efficacy results from OAM4558g, a randomized phase II study evaluating MetMAb or placebo in combination with erlotinib in advanced NSCLC. *J Clin Oncol* 29: 2011 (suppl; abstr 7505)



致 谢

写到论文的致谢部分就意味着将结束我在湘雅的八年学习生涯。在这有些伤感和兴奋的时刻，我要感激的人很多，一言难以完全表达我衷心的感谢！

在即将完成学业之际，特别感谢我的导师胡成平教授。感谢导师两年来在工作和学习中对我的悉心指导、严格要求和在生活上的细心关怀。正是如此，使我摆脱了生活中的困境，并让我在科研和临床等方面得到了全面锻炼和提高。导师严谨的工作作风、对事业的追求、广博的医学知识和高尚的人格将我带入了肺癌靶向治疗研究的广阔领域，并将使我受益终身。是导师指引我进入了真正的科学研究，使我领略到科学研究的崇高和永无止境；同时，导师孜孜不倦的进取精神、积极乐观的生活态度将使我受益终生。

衷心感谢中南大学湘雅医学院各位领导、感谢呼吸内科肖奇明、罗百灵教授，顾其华、杨华平、曹立明、唐永军、潘频华、苏晓丽副教授，李敏、冯俊涛、牛瑞超、李园园主治医师在工作、学习和生活上的关心和支持。

感谢心胸外科张卫星、张春芳教授，高阳、庄伟、王霖主治医师对我实验的大力支持和对我工作的关心。

十分感谢我的同窗好友蒋庆庆同学，在实验过程中给予了我巨大帮助。感谢谭俊、魏天虹、陈远大、董硕和其他所有 04 级八年制同学的鼎力相助和大力支持。

感谢呼吸内科贺若曦、陈建辉、李晶晶、秦岭、袁婷、邓彭博、陆蓉丽、胡赞、莫桂艳等师兄师姐的鼎力帮助和支持。

感谢我的家人，他们无私的付出是我顺利完成学业、乐观生活的坚强后盾。感谢所有曾经辛勤培养我的老师，感激所有关心和支持我的朋友。

感谢我的爱人王昊同学七年来对我在生活上的关心和工作上的支持及帮助。

再次感谢我的导师胡成平教授对我生活和学习上的热心帮助和孜孜教导。道不尽心中的万千感谢，祝福好人一生平安！

已发表的论文

第一作者

1. 夏宁,胡成平.棘皮动物微管结合蛋白 4-间变淋巴瘤激酶融合基因与非小细胞肺癌关系.中华结核与呼吸杂志,2012,35(2):125-127
2. 夏宁,胡成平.表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂分子耐药机制研究.世界临床药物, 2012,33 (4): 184-187