

## 儿童神经母细胞瘤中 ALK 基因突变的研究

杨春兰<sup>1</sup> 岳丽杰<sup>1</sup> 江贤萍<sup>1</sup> 文飞球<sup>2</sup> 郑苗苗<sup>1</sup>

(重庆医科大学深圳儿童医院 1. 儿科研究所; 2. 血液肿瘤科, 广东 深圳 518026)

**[摘要]** **目的** 探讨中国儿童神经母细胞瘤(NB)中间变性淋巴瘤激酶(ALK)基因的突变情况。**方法** 从22例石蜡包埋的NB肿瘤组织中提取基因组DNA,通过PCR-DNA直接测序技术分析儿童NB肿瘤组织中ALK突变热点区域第20~26号外显子的突变情况。**结果** 22例儿童NB中,有10例(46%)在ALK第21号外显子上存在已知同义突变C3375A(Gly1125Gly),等位基因频率为27%;1例(5%)在ALK第23号外显子上发现一个新的同义突变C3586T(Leu1196Leu)。ALK突变C3375A的发生频率在NB患儿的年龄、性别、肿瘤分化程度和是否转移方面差异无统计学意义( $P>0.05$ )。在其他5个ALK外显子中未发现突变。**结论** 采用PCR-DNA测序技术发现了ALK一个新的同义突变C3586T,并证实了儿童ALK存在已知突变C3375A,其发生率不受NB患儿临床特征的影响。  
[中国当代儿科杂志,2012,14(10):763-766]

**[关键词]** 神经母细胞瘤;间变性淋巴瘤激酶;基因突变;儿童

**[中图分类号]** R730.264 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2012)10-0763-04

### ALK gene mutations in childhood neuroblastoma

YANG Chun-Lan, YUE Li-Jie, JIANG Xian-Ping, WEN Fei-Qiu, ZHENG Miao-Miao. Institute of Pediatric Research, Shenzhen Children's Hospital of Chongqing Medical University, Shenzhen, Guangdong 518026, China (Yue L-J, Email: lijieyue@yahoo.com)

**Abstract: Objective** To investigate mutations of anaplastic lymphoma kinase (ALK) in Chinese children with neuroblastoma (NB). **Methods** Genomic DNA was extracted from 22 cases of paraffin-embedding NB tumor tissues. Gene mutations in the exons 20-26 which were mutational hotspots of ALK were analyzed by PCR-DNA direct sequencing. **Results** A novel synonymous mutation C3586T (Leu1196Leu) and a known synonymous mutation C3375A (Gly1125Gly) were found and located at exon 23 and exon 21 of ALK respectively. There were 10 cases (46%) of known synonymous mutation C3375A in 22 cases of NB. The C3375A allelic frequency was 27%. No statistically significant correlation was found between mutation C3375A and clinical parameters of NB such as age, sex, metastasis and tumor differentiation. Mutation was not found in the other 5 exons. **Conclusions** A novel ALK gene synonymous mutation C3586T was identified using PCR-DNA sequencing. A known mutation C3375A in ALK was successfully identified in children, and its incidence is not influenced by the clinical features of childhood NB. [Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14(10):763-766]

**Key words:** Neuroblastoma; Anaplastic lymphoma kinase; Gene mutation; Child

间变性淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase, ALK)是一种受体型酪氨酸激酶,其基因异常存在于多种肿瘤中,并与肿瘤的发生发展密切相关<sup>[1]</sup>。神经母细胞瘤(neuroblastoma, NB)是儿童最常见的实体瘤之一,其恶性程度高,治疗难度大,复发率高,长期生存率低<sup>[2]</sup>,因此迫切需要新的治疗手段。近几年,国外研究发现大约8%的NB中存在活性ALK基因点突变<sup>[3]</sup>,部分突变可能与NB的发生或侵袭性相关,并与NB细胞株对ALK抑制剂作

用敏感性相关<sup>[4-6]</sup>。目前关于NB中ALK基因突变国外已有较多报道,而国内尚未见到相关文献报道。因此,本研究采用基因扩增和直接测序技术检测了22例儿童NB术后肿瘤组织ALK基因突变热点区域第20~26号外显子的突变情况,分析ALK基因突变规律,以求探讨其与NB临床特征的关系,为ALK抑制剂可能在NB靶向治疗中的应用提供可能的遗传学依据。

[收稿日期]2012-05-30; [修回日期]2012-06-14  
[基金项目]深圳市科技计划项目(编号:201002112)。  
[作者简介]杨春兰,女,硕士研究生。  
[通信作者]岳丽杰,教授。

# 1 资料与方法

## 1.1 研究对象

选取深圳市儿童医院2006~2011年间存档的经福尔马林固定、石蜡包埋的NB标本22例,标本均为诊断时取材,其中男15例,女7例;诊断时中位年龄22.5个月(6d~72个月),其中≤12个月者9例,>12个月者13例。采用NB病理分型(Shimada修正案)诊断标准<sup>[7]</sup>,NB未分化型3例,NB分化差型6例,NB分化型3例,未记载2例,节细胞NB(GNB)8例。石蜡标本经重新切片染色,由两位主治以上病理医师再次诊断确认。本研究已经获得深圳市儿童医院伦理委员会审核通过。

## 1.2 方法

1.2.1 基因组DNA提取 采用QIAamp® DNA FFPE Tissue 试剂盒(QIAGEN,德国),按操作说明

书提取NB肿瘤组织的基因组DNA,紫外分光光度计测定DNA纯度和浓度,要求A280/A260>1.80,分装后放置于-20℃冰箱内储存备用。

1.2.2 PCR扩增 采用PCR扩增ALK外显子20~26。参照ALK碱基序列(基因库登录号:NC\_000002.11)并参考文献<sup>[4]</sup>,应用Primer Premier 5.0软件设计PCR引物,引物序列由Invitrogen公司合成(表1)。PCR反应体系共25μL,包含1μL模板基因组DNA,2.5mmol/L dNTPs 2μL,10μmol/L上下游引物各1μL,5U/μL EX Taq DNA聚合酶(TaKaRa公司)0.125μL,10×PCR Buffer 2.5μL,ddH<sub>2</sub>O补足至25μL。PCR反应条件:94℃预变性3min;94℃变性30s,退火温度参照表1,时间30s,72℃延伸,时间参照表1,循环40次;72℃延伸5min。在Tprofessional Std Gradient 96热循环仪(Biometra,德国)上进行PCR扩增。

表1 ALK基因20~26号外显子PCR扩增引物序列和条件

外显子	引物序列(5'→3')		退火温度(℃)	产物长度(bp)	
	正向引物	反向引物			
ALK exon20	F1/R1	CAGGGGAGGATATGGAGAT	CCTTTTGTGGCTAGAGGAGT	58	386
	F2/R2	AGGAAGTGGCCTGTGTAGTG	ATAACATTCAGCCCTACAC	60	317
ALKex21-22	F1/R1	GTCCACTAAATGTGACGCC	ATGCTAGGACAACACAGAT	58	469
	F2/R2	TGACTCTGTCTCTCTTGTCT	TTAGAAACCTCTCCAGGTTTC	60	368
ALK exon23	F1/R1	CCAGTCCACGCACCAGTAT	CTCAGCCATCATCTACCTCTA	58	644
	F2/R2	AAGATTTGCCAGACTCAGC	TGTCCTTGGCACAACAACCTG	60	231
ALK exon24	F1/R1	ACGGTCTGCCTCCTTGTA	GCAAGTGAATCCCTGATAGAA	58	531
	F2/R2	AGATTTCCCTCTCTCACTG	ATGTGAGCCCTTGAGATCTG	60	237
ALK exon25	F1/R1	TCCTTATGGCCCTATGTTA	GAGCGAAACTCCGTCTCAA	58	773
	F2/R2	TAGTGATGGCCGTGTACAC	CCAGGAGATGATGTAAGGGA	60	257
ALK exon26	F1/R1	GCCACTTCTCAACTTCC	CACTGTTGTCTGGGTGTAIT	58	324
	F2/R2	GGCAGATGCTTAATGCCATC	CTCCCGCTTAGAGTATAGA	60	245

1.2.3 琼脂糖凝胶电泳及DNA测序 将各待测PCR产物5μL分别与1μL 6×Loading Buffer(TaKaRa公司)混合,在80V/cm电压下行2%琼脂糖凝胶电泳20min,经Gold View染色(2%琼脂糖溶液100mL中加6μL Gold View),在GDS800凝胶成像分析系统(UVP公司,美国)中拍照,分析PCR产物是否为所要检测的DNA扩增片段长度。PCR产物经纯化后直接测序,由Invitrogen公司完成。用chromas软件分析测序图谱,寻找突变,并参照GenBank中ALK基因序列判断每一个变异。

## 1.3 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件进行统计学分析。用基因计数法统计NB病例基因型和等位基因频率。ALK突变与NB患者年龄、性别、肿瘤分化程度及是

否转移之间的关系用Fisher精确概率法检验,P<0.05为差异有统计学意义。

# 2 结果

## 2.1 PCR扩增和测序结果

ALK基因扩增片段行2%琼脂糖凝胶电泳,在GDS800凝胶成像分析系统的紫外光下观察均显示清晰的单一性扩增条带。经测序分析,所有外显子均扩增成功。重新PCR扩增并经直接正反向测序验证后,22例患儿中,有1例(5%)在ALK的第23号外显子上发现新的同义突变C3586T(Leu1196Leu)(图1);有10例(46%)在ALK第21号外显子上发现已知同义突变C3375A(Gly1125Gly)(图2),等位基因频率

为27%,其中2例为纯合突变,8例为杂合突变。在ALK其他5个外显子中未发现突变,且未检测到ALK

第23、25号外显子上分别对应F1174和R1275这两个氨基酸位点的热点突变。

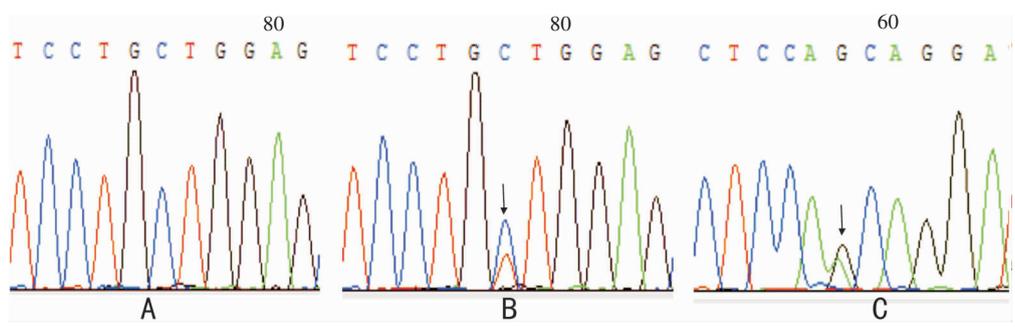


图1 ALK-C3586T(Leu1196Leu)位点测序图 A为野生型(CC)正向测序;B为变异型(CT)正向测序;C为变异型(GA)反向测序。箭头代表变异的碱基。

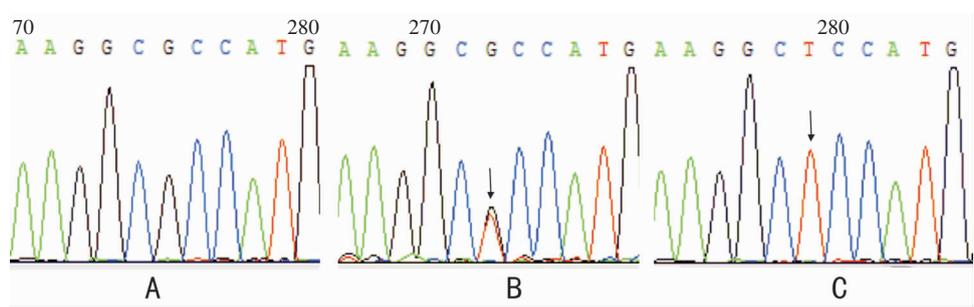


图2 ALK-C3375A(Gly1125Gly)位点测序图 A为野生型(GG)反向测序;B为杂合变异型(GT)反向测序;C为纯合变异型(TT)反向测序。箭头代表变异的碱基。

## 2.2 ALK-C3375A 突变与儿童 NB 临床特点的关系

ALK-C3375A 突变在≤12个月的NB患儿中的发生频率为33%(3/9),>12个月NB患儿的发生频率(7/13,54%),但差异无统计学意义(P>0.05)。另外,此突变发生率在患儿性别、NB肿瘤是否转移及肿瘤分化程度方面差异均无统计学意义(P>0.05)。见表2。

表2 ALK 基因 C3375A 突变与 NB 临床特征的关系 [例(%)]

临床特征	病例数	突变频率	P 值
性别			
男	15	7(47)	1.000
女	7	3(43)	
年龄			
≤12月	9	3(33)	0.415
>12月	13	7(54)	
转移			
有	16	9(56)	0.162
无	6	1(17)	
分化程度			
分化差及未分化型	9	4(44)	0.545
分化型	3	2(67)	
节细胞 NB	8	3(37)	

## 3 讨论

人类 ALK 位于 2 号染色体短臂上(2p23),有 29 个外显子,ALK mRNA 全长约 6226 bp,编码含 1620 个氨基酸序列的跨膜蛋白,此蛋白为胰岛素受体超家族成员。ALK 不同形式的融合基因与肿瘤,如炎症性纤维母细胞瘤、间变性大细胞淋巴瘤等之间的因果关系已得到充分证实<sup>[8]</sup>。ALK 融合蛋白 EML4-ALK 亦被证实存在于 2.4%~13% 的非小细胞肺癌(NSCLC)中,EML4-ALK 阳性与 NSCLC 的发生相关,ALK 抑制剂克唑替尼(Crizotinib)对其治疗有效<sup>[9]</sup>。Crizotinib 已于 2011 年 8 月作为第一个 ALK 抑制剂上市用于治疗 ALK 阳性的晚期 NSCLC。除了基因融合外,点突变也是蛋白酪氨酸激酶致癌的一种常见的基因异常形式<sup>[6]</sup>,而 NB 中只存在功能获得性 ALK 点突变。目前国外文献报道的所有 NB 中 ALK 错义突变均位于外显子 20~25<sup>[3-5]</sup>。最常见的两个突变热点为 F1174 和 R1275,它们分别位于 23 和 25 号外显子上,占有所有突变的 70% 以上,功能研究表明它们可使 ALK 酶活性增高,从而通过一系列途径引起 NB 细胞增殖增加、调

亡减少,与NB肿瘤发生或侵袭性相关<sup>[4-6]</sup>。

本研究检测了22例中国儿童NB肿瘤组织ALK突变热点区域第20~26号外显子的突变情况,结果未检测到国外文献报道的ALK错义突变,包括可能与NB发生或侵袭性相关的F1174和R1275对应的基因位点变异。国外的5个研究组于2008年分别报道了散发性和家族性NB患者中存在的ALK错义突变,其在散发性NB病例中的突变率约为6.0%~11.0%<sup>[4-6,10-11]</sup>,这些研究是在日本和欧美国家中进行的,其中频率最低的为日本(6.1%),最高的为瑞典(11.1%)。最近韩国的一个研究组亦在54例NB患者中发现了2例ALK错义突变(3.7%)<sup>[12]</sup>,此频率与土耳其的研究结果3.3%相近<sup>[13]</sup>。可见不同国家和民族NB中ALK的突变频率不同。本研究未能发现国外文献报道的ALK突变,考虑与样本例数偏少或种族差异性有关,故尚需进一步扩大样本量行多中心协同研究。

虽然本研究未发现国外文献报道的ALK错义突变,但本研究在22例儿童NB中检测到10例(46%)存在ALK已知同义突变C3375A(G1125G),其在此次研究病例中的等位基因频率(3375A)为27%,并分析得出其在NB患儿年龄、性别、肿瘤分化程度和是否转移方面差异无统计学意义。此外,在ALK第23号外显子上发现1例新的同义突变C3586T(L1196L)。近年来研究发现基因编码区内出现的同义突变可能因同一氨基酸对不同简并密码子的翻译效率不同或转录水平差异而导致蛋白表达量改变,量的改变达到一定程度时即可能发生疾病。另外有研究认为野生型ALK蛋白表达量增加到特定阈值时可能使NB细胞达到致癌性激活<sup>[14]</sup>。因此,同义突变对疾病的研究也存在重要的意义。

国内对NB中ALK突变的研究尚未见相关文献报道。本研究对22例NB的ALK突变进行了分析,可能由于样本例数偏少或种族差异性的关系未检测到国外文献报道的ALK错义突变,但本研究证实了国际基因文库中报到的ALK已知同义突变C3375A,其在本研究病例中的突变率为46%,3375A等位基因频率为27%,同时发现了一新的ALK同义突变C3586T。ALK突变位点、频率及其

功能改变对中国NB的影响还有待于大样本、多中心、多民族广泛的协同研究,为ALK可能成为NB治疗的新靶点提供可靠的遗传学依据。

### [参 考 文 献]

- [1] 杨春兰,岳丽杰. 间变性淋巴瘤激酶与神经母细胞瘤关系的研究进展[J]. 中国肿瘤临床, 2012, 39(11): 813-816.
- [2] 朱琪琦,刘英,冯晨,唐锁勤. 神经母细胞瘤远期复发临床研究[J]. 中国当代儿科杂志, 2010, 12(12): 995-997.
- [3] Azarova AM, Gautam G, George RE. Emerging importance of ALK in neuroblastoma[J]. Semin Cancer Biol, 2011, 21(4): 267-275.
- [4] Chen Y, Takita J, Choi YL, Kato M, Ohira M, Sanada M, et al. Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma[J]. Nature, 2008, 455(7215): 971-974.
- [5] George RE, Sanda T, Hanna M, Fröhling S, Luther W 2nd, Zhang J, et al. Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastom[J]. Nature, 2008, 455(7215): 975-978.
- [6] Carén H, Abel F, Kogner P, Martinsson T. High incidence of DNA mutations and gene amplifications of the ALK gene in advanced sporadic neuroblastoma tumors[J]. Biochem J, 2008, 416(2): 153-159.
- [7] 张锦华,王维林,陈鸿骏. 小儿神经母细胞瘤[M]. 北京:人民卫生出版社, 2009: 89-92.
- [8] Li R, Morris SW. Development of anaplastic lymphoma kinase (ALK) small-molecule inhibitors for cancer therapy[J]. Med Res Rev, 2008, 28(3): 372-412.
- [9] Pearson R, Kolesar JM. Targeted therapy for NSCLC: ALK inhibition[J]. J Oncol Pharm Pract, 2012, 18(2): 271-274.
- [10] Janoueix-Lerosey I, Lequin D, Brugières L, Ribeiro A, de Pontual L, Combaret V, et al. Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma[J]. Nature, 2008, 455(7215): 967-970.
- [11] Mossé YP, Laudenslager M, Longo L, Cole KA, Wood A, Attiyeh EF, et al. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene[J]. Nature, 2008, 455(7215): 930-935.
- [12] Kwon MJ, Choi YL, Sung KW, Kang SY, Park SM, Choi SY, et al. Oncogenic anaplastic lymphoma kinase (ALK) mutation in neuroblastomas and other pediatric tumors[J]. Pathol Res Pract, 2011, 207(10): 634-639.
- [13] Bağcı O, Tümer S, Olgun N, Altungöz O. Copy number status and mutation analyses of anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene in 90 sporadic neuroblastoma tumors[J]. Cancer Lett, 2012, 317(1): 72-77.
- [14] Passoni L, Longo L, Collini P, Coluccia AM, Bozzi F, Podda M, et al. Mutation-independent anaplastic lymphoma kinase overexpression in poor prognosis neuroblastoma patients[J]. Cancer Res, 2009, 69(18): 7338-7346.

(本文编辑:万静)