

· 论 著 ·

非小细胞肺癌表皮生长因子受体基因突变的结果分析

王 璇, 时姗姗, 马恒辉, 周晓军, 王建东

[摘要] **目的** 回顾性分析 301 例非小细胞肺癌(NSCLC)组织表皮生长因子受体(EGFR)基因突变检测结果,比较三种实验方法检查 EGFR 突变的差异。探讨肺癌临床靶向个体化治疗进行 EGFR 分子病理检查的最佳方法。**方法** 应用聚合酶链反应(PCR)结合直接测序法检测 171 例肺癌 DNA 样本;TaqMan 探针荧光定量 PCR 法检测 88 例肺癌 DNA 样本;扩增阻碍突变系统(ARMS)法检测 42 例肺癌 DNA 样本。**结果** PCR 直接测序法、TaqMan 探针荧光定量 PCR 法、ARMS 法的阳性总检出率分别是 31.58%、27.27%、42.86%。**结论** PCR 直接测序法和 TaqMan 探针荧光定量 PCR 法阳性总检出率差异无统计学意义($P>0.05$),ARMS 法阳性总检出率高于 PCR 直接测序法和 TaqMan 探针荧光定量 PCR 法(P 均 <0.01)。对于不同来源的肺癌组织标本,不同方法检测 EGFR 突变具有各自的优点和不足。

[关键词] 肺癌;表皮生长因子受体;突变

[中图分类号] R574 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-271X(2012)05-0387-03

Respective analysis of EGFR mutations in non-small cell lung cancer

WANG Xuan, SHI Shan-shan, MA Heng-hui, ZHOU Xiao-jun, WANG Jian-dong. Department of Pathology, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, PLA, Nanjing, Jiangsu 210002, China

[Abstract] **Objective** The results of epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in 301 tissues with non-small cell lung cancer (NSCLC) detected by three different methods were respectively analyzed. The differences among three methods were compared. The objective of this study was to explore the proper molecular method for personalized target therapy in lung cancer. **Methods** Polymerase chain reaction combine with direction sequencing was used to detect EGFR mutations in 171 patients. Real-time PCR with TaqMan fluorescent probe was used to detect EGFR mutations in 88 patients and amplification refractory mutation system PCR (ARMS-PCR) was used to detect EGFR mutations in 42 patients. **Results** The total positive rates for sequencing, TaqMan real-time PCR, and ARMS-PCR methods were 31.58%, 27.27%, and 42.86% respectively. **Conclusion** No significant difference in total positive rate between direct sequencing and TaqMan real-time PCR ($P>0.05$). The total positive rate was higher in ARMS-PCR than that in direct sequencing and TaqMan real-time PCR ($P<0.01$). To different tissues, different methods have their superiority when used for detection of EGFR mutations in lung cancer.

[Key words] lung cancer; EGFR; mutation

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一,国内肺癌的死亡率占城市恶性肿瘤之首^[1],其中非小细胞肺癌(NSCLC)占 75%~80%。近年来,针对受体酪氨酸激酶家族中表皮生长因子受体(EGFR)的靶向药物的研发,给 NSCLC 治疗带来了希望。EGFR 是一种细胞膜表面的糖蛋白受体,具有酪氨酸激酶活性并参与细胞增殖分化、肿瘤生长、转移、血管生成及凋亡抑制等^[2]。大量研究^[3-5]显示,靶向治疗只对 EGFR 基因突变的患者有效,因此 EGFR 基因突变检测

成为 NSCLC 靶向治疗前的重要分子病理学检测^[6]。目前,国内外用于 EGFR 突变检测的方法、种类非常多^[7],相关机构亦未予以统一。本文就常见的 3 种 EGFR 检测方法,回顾分析 301 例 NSCLC 基因突变检测结果,客观评估不同检测方法的优缺点,为 NSCLC 靶向治疗前 EGFR 检测方法的选择提供参考意见。

1 材料与方法

1.1 材料 总结 2010 年 1 月至 2011 年 12 月在本实验室进行 EGFR 突变检测的 301 例 NSCLC,所有标本经病理学检查确认。其中 171 例标本为 PCR 直接测序法检测,88 例为 TaqMan 探针荧光定量 PCR 法检测,42 例为扩增阻碍突变系统(amplifica-

基金项目:国家自然科学基金(30970813;81171391)

作者简介:王 璇(1983-),女,江苏丹阳人,本科,技师,从事病理技术专业

作者单位:210002 江苏南京,南京军区南京总医院病理科

通讯作者:王建东, E-mail: jdwang1216@163.com

tion refractory mutation system, ARMS) 法检测。

1.2 DNA 提取及不同方法 EGFR 突变检测

1.2.1 石蜡组织标本 DNA 提取 取 4 ~ 10 片 8 μm 厚的石蜡切片,应用石蜡组织基因 DNA 提取纯化试剂盒(OMEGA 公司)提取基因组 DNA,具体操作步骤按照试剂盒说明书进行。

1.2.2 PCR 直接测序法 针对 EGFR 基因酪氨酸激酶编码区第 18、19、20、21 号外显子和相邻内含子的 DNA 序列,设计并合成 PCR 扩增引物(上海英骏生物技术有限公司),分别为第 18 号外显子上游引物(F):5'-TCCAAATGAGCTGGCAAGTG-3',下游引物(R):5'-TCCCAAACACTCAGTCAAACAAA-3';第 19 号外显子上游引物(F):5'-GTGCATCGCTGCTA-ACATCC-3',下游引物(R):5'-TGTGGAGATGAG-CAGGGTCT-3';第 20 号外显子上游引物(F):5'-ATCGCATTCATGCGTCTTCA-3',下游引物(R):5'-ATCCCCATGGCAAACCTCTTG-3';第 21 号外显子上游引物(F):5'-GCTCAGAGCCTGGCATGAA-3',下游引物(R):5'-CATCCTCCCCTGCATGTGT-3',扩增产物分别为 397、297、378 和 348 bp。采用双脱氧链末端终止法(Sanger 法)测序,按试剂说明书(美国应用生物系统公司)进行,测序结果用 Chromas 比对软件进行 DNA 序列分析。

1.2.3 TaqMan 探针荧光定量 PCR 法 采用荧光定量 PCR 仪(ABI 7500),EGFR 基因突变检测试剂盒(北京金菩嘉医疗科技有限公司),检测第 19 号外显子 del E746 ~ A750、del L747 ~ P753insS 及第 21 号外显子 L858R、L861Q 共 4 个位点。PCR 反应条件分别为:50℃ 2 min;95℃ 10 min;95℃ 15s, 62℃ 1 min,共 40 个循环。按试剂盒标准判断结果。

1.2.4 ARMS 法 采用荧光定量 PCR 仪(ABI 7500),ADx-ARMSTM 人类 EGFR 基因 21 种突变检测试剂盒(厦门艾德生物医药科技有限公司),检测 EGFR 基因第 18、19、20、21 号外显子共 21 种已知常见突变。PCR 反应条件分别为:95℃ 5 min;95℃ 25 s,64℃ 20 s,72℃ 20 s,15 个循环;然后 93℃ 25 s,60℃ 35 s,72℃ 20 s,31 个循环。按试剂盒标准判断结果。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 11.0 统计学分析软件处理检测数据,组间率的比较行 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PCR 直接测序法检测结果 表 1 列出了应用 PCR 直接测序法检测 171 例 NSCLC 的 EGFR 基因第 18、19、20、21 号外显子突变的结果。

表 1 应用 PCR 直接测序法检测肺癌 EGFR 突变[$n(\%)$]

指标	<i>n</i>	18 外显子	19 外显子	20 外显子	21 外显子	突变率(%)
性别						
男	103	1(0.97)	19(18.45)	0	13(12.62)	32.04
女	68	0	10(14.71)	1(1.47)	10(14.71)	30.88
年龄						
<70 岁	125	0	19(15.20)	1(0.80)	16(12.80)	28.80
≥70 岁	46	1(2.18)	10(21.74)	0	7(15.22)	39.13
病理分型						
肺腺癌	140	1(0.71)	28(20.00)	1(0.71)	21(15.00)	36.43
肺鳞癌	26	0	1(3.85)	0	2(7.69)	11.54
其他	5	0	0	0	0	0.00
总计	171	1(0.58)	29(16.96)	1(0.58)	23(13.45)	31.58

2.2 TaqMan 探针荧光定量 PCR 法检测结果 表 2 列出了应用 TaqMan 探针荧光定量 PCR 法检测 88 例 NSCLC 的 EGFR 基因第 19、21 号外显子突变的结果。

表 2 应用 TaqMan 探针荧光定量 PCR 法检测肺癌 EGFR 突变[$n(\%)$]

指标	<i>n</i>	19 外显子	21 外显子	突变率(%)
性别				
男	54	5(9.26)	5(9.26)	18.52
女	34	4(11.76)	10(29.41)	41.18
年龄				
<70 岁	62	6(9.68)	13(20.97)	30.65
≥70 岁	26	3(11.54)	2(7.69)	19.23
病理分型				
肺腺癌	66	9(13.64)	13(19.69)	33.33
肺鳞癌	11	0	1(9.09)	9.09
其他	11	0	1(9.09)	9.09
总计	88	9(10.23)	15(17.05)	27.27

2.3 ARMS 法检测结果 表 3 列出了应用 ARMS 法检测 42 例 NSCLC 的 EGFR 基因第 18、19、20、21 号外显子突变的结果。

2.4 三种检测方法阳性检出率比较 见表 4。

表 3 应用 ARMS 法检测肺癌 EGFR 突变[$n(\%)$]

指标	<i>n</i>	18 外显子	19 外显子	20 外显子	21 外显子	突变率(%)
性别						
男	19	0	2(10.53)	0	4(21.05)	31.58
女	23	0	6(26.09)	0	6(26.09)	52.17
年龄						
<70 岁	30	0	7(23.33)	0	5(16.67)	40.00
≥70 岁	12	0	1(8.33)	0	5(41.67)	50.00
病理分型						
肺腺癌	34	0	8(23.53)	0	8(23.53)	47.06
肺鳞癌	4	0	0	0	0	0
其他	4	0	0	0	2(50.00)	50.00
总计	42	0	8(19.05)	0	10(23.81)	42.86

表 4 三种检测方法阳性检出率之间的比较

检测方法	n	阳性	阳性检出率(%)
PCR 直接测序法	171	54	31.58*
TaqMan 探针荧光定量 PCR 法	88	24	27.27*
ARMS 法	42	18	42.86

注:与 ARMS 法比较,* $P<0.01$

3 讨 论

随着肿瘤个体化靶向治疗在我国的逐步开展,分子病理检测在病理检查中的作用亦越来越受到重视。许多相关教研室、研究所和生物技术公司也参与到分子病理检测中,在一定程度上共同推动了我国分子病理检测的开展,缓解了医院病理科的压力,起到积极作用。另一方面,检测方法的多样、敏感性的差异,也给临床医师和患者带来了很大的困惑。就 EGFR 突变检测来说,目前使用较多的有 PCR 直接测序法、TaqMan 探针荧光定量 PCR 法和 ARMS 法。由于国际上关于使用何种方法检测 EGFR 突变用于靶向治疗尚没有具体规定,在一定时间内这三种方法会在我国分子病理检测中长期存在。分析比较这三种方法的优缺点和适用性,对于指导临床和病理医师开展 EGFR 突变检测具有重要意义。

本文对 301 例病理诊断明确的 NSCLC 进行 EGFR 三种方法检查结果的回顾性分析发现,PCR 直接测序法、TaqMan 探针荧光定量 PCR 法、ARMS 法检出突变总阳性率分别为 31.58%、27.27%、42.86%。前两者检测 EGFR 基因突变的总阳性率为 30% 左右,两种方法没有很大区别($P>0.05$);而 ARMS 法检测的总阳性率明显高于 PCR 直接测序法和 TaqMan 探针荧光定量 PCR 法(P 均 <0.01)。

PCR 直接测序法是最经典的基因突变检测方法,技术成熟,检测成本低,可对已知及未知突变进行检测,但其敏感性低,操作繁琐,易产生污染,且需要大量纯度较高的组织 DNA,较适合于检测手术标本^[8]。TaqMan 探针荧光定量 PCR 法的检测敏感性和 PCR 直接测序法接近,具有简单、快速等特点,但价格高于 PCR 直接测序法^[9]。ARMS 法检测的阳性率明显高于以上两种方法,其敏感性最高,检测周期短,尤其适合于肿瘤细胞少的肺穿刺标本和胸水脱落细胞标本^[10-11],但检测成本高,患者一般不易接受。

本文的每组标本分别应用一种方法进行 EGFR 检测,并没有对同一组标本进行三种方法的比较,但患者检测是随机的,患者总突变率在各组之间不存在很大差异,其检测的总阳性率基本反映了不同方法的敏感性。另 PCR 直接测序法和 ARMS 法检测的是

EGFR 基因第 18、19、20、21 四个外显子的突变,而 TaqMan 探针荧光定量 PCR 法检测的是第 19 和 21 两个外显子的突变。由于第 18 和 20 两个外显子突变率非常低,实际比较仍以第 19 和 21 两个外显子的突变率为主,并不影响这三种方法之间总突变阳性率的比较。随着 NSCLC 靶向治疗的开展,有患者在进行针对酪氨酸激酶小分子拮抗剂(TKI)易瑞沙等的治疗后会出现耐药,此时检测 EGFR 第 20 号外显子的耐药突变 T790M 就显得非常重要^[12]。

总之,三种 EGFR 突变检测方法各有特点,应该根据患者的经济状况、标本的类型等综合考虑,选择最适合患者的检测方法。

【参考文献】

[1] 周诚忠,夏炎春,夏海波,等. 三维适形放射治疗老年非小细胞肺癌 60 例[J]. 东南国防医药,2009,11(1):20-21.

[2] 王晓萍,丰俊东. 放射治疗与分子靶向药物在肿瘤治疗中的联合应用[J]. 东南国防医药,2008,10(4):277-280.

[3] Dahabreh IJ, Linardou H, Siannis F, et al. Somatic EGFR mutation and gene copy gain as predictive biomarkers for response to tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(1):291-303.

[4] Sholl LM, Xiao Y, Joshi V, et al. EGFR mutation is a better predictor of response to tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung carcinoma than FISH, CISH, and immunohistochemistry[J]. Am J Clin Pathol, 2010, 133(6):922-934.

[5] 宋海珠,易俊,黄桂春,等. 人肺腺癌细胞基因型与尼妥珠单抗疗效的关系[J]. 医学研究生学报,2011,24(2):148-153.

[6] Penzel R, Sers C, Chen Y, et al. EGFR mutation detection in NSCLC——assessment of diagnostic application and recommendations of the german panel for mutation testing in NSCLC[J]. Virchows Arch, 2011, 458(1):95-98.

[7] Han HS, Lim SN, An JY, et al. Detection of EGFR mutation status in lung adenocarcinoma specimens with different proportions of tumor cells using two methods of differential sensitivity[J]. J Thorac Oncol, 2012, 7(2):355-364.

[8] 张静,高洁,梁智勇,等. 非小细胞肺癌表皮生长因子受体基因突变检测的经验总结分析[J]. 中华病理学杂志,2011,40(10):712-714.

[9] 王芳,付莎,汤涛,等. 非小细胞肺癌表皮生长因子受体基因突变与临床病理特征的关系[J]. 中华病理学杂志,2011,40(10):664-666.

[10] Cheng H, Xu X, Costa DB, et al. Molecular testing in lung cancer: the time is now[J]. Curr Oncol Rep, 2010, 12(5):335-348.

[11] 王立帅,张瑜,陆小军,等. 双环探针特异引物荧光聚合酶链反应法检测非小细胞肺癌表皮生长因子受体基因突变[J]. 中华病理学杂志,2011,40(10):667-670.

[12] Bardelli A, Janne PA. The road to resistance:EGFR mutation and cetuximab[J]. Nat Med, 2012, 18(2):199-200.

(收稿日期:2012-05-07;修回日期:2012-07-18)

(本文编辑:张仲书; 英文编辑:王建东)