

## · 综 述 ·

## 非小细胞肺癌胸腔积液 EGFR 突变检测方法的研究进展

禹 乐<sup>1</sup>综述,余英豪<sup>2</sup>审校

[摘要] 非小细胞肺癌(NSCLC)是肺癌中最常见的组织学类型。目前以吉非替尼为代表的 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKIs)是治疗 NSCLC 最重要的基因靶向治疗药物。用于检测 EGFR 基因突变的标本来源主要是肿瘤手术切除组织,但是对于心肺功能较差无法耐受手术或已经失去手术机会的 NSCLC 晚期患者,肿瘤标本的获得往往比较困难。恶性胸腔积液是晚期 NSCLC 患者常见的症状,获取比较容易。因此利用胸腔积液进行 EGFR 基因突变检测是目前研究的一个热点,文章现就 EGFR 与 NSCLC 关系、EGFR 基因突变检测方法、肺癌患者胸腔积液中 EGFR 基因突变情况进行综述。

[关键词] 肺癌;胸腔积液;细胞学;EGFR 基因

[中图分类号] R734.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1672-271X(2017)04-0380-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1672-271X.2017.04.012

肺癌不仅是欧美等发达国家发病与死亡率最高的恶性肿瘤,也成为我国城市居民死亡率第一的恶性肿瘤,且有逐年上升的趋势<sup>[1-2]</sup>,非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)是最常见的组织学类型(约占 70%~80%)<sup>[3]</sup>。近年来,随着分子生物学技术的发展,对肿瘤发病机制从细胞、分子水平的进一步认识,表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(epidermal growth factor receptor tyrosine kinases inhibitors, EGFR-TKIs)在发生 EGFR 敏感突变的 NSCLC 患者的治疗中取得了显著效果<sup>[4]</sup>。用于检测 EGFR 基因突变的最佳标本为肿瘤手术切除组织,其次是肿瘤穿刺组织、纤支镜活检组织,但是肺癌缺乏有效的早期诊断手段,70%以上的患者在确诊时已属晚期,失去了手术机会,从而难以获得用于检测 EGFR 基因突变的组织学标本,而胸腔积液是晚期肺癌患者常见的并发症之一<sup>[5-6]</sup>,胸水标本获取比较简单、安全,因此利用胸腔积液标本进行 EGFR 基因突变检测是目前研究的一个热点,本文对此作一综述。

## 1 EGFR 与 NSCLC 关系

**1.1 EGFR 的生物学特征概况** EGFR 基因位于人类第七号染色体短臂上(7p12-7p14),含 28 个外显子,长约 118 kb,其转录形成的 mRNA 长约 5.6 kb,其编码的表皮生长因子受体属于酪氨酸激酶受体家族,是分子量为 170 kD 的跨膜糖蛋白,编码蛋白由 1186 个氨基酸残基组成,在结构上分为 3 个功能区:细胞外配体结合区、跨膜区和细胞内酪氨酸激酶活性区。EGFR 是传递胞外信号到胞内的重要途径蛋白,其主要信号转导途径有:RAS-RAF-MEK-ERK-MAPK 通路,PI3K-PDK 通路,JAK-STAT 通路和 PLC- $\gamma$  通路<sup>[7-8]</sup>,通过这些途径,胞外信号将转化为胞内信号,从而有效应对外界的信号刺激,以达到调节细胞的增殖生长、分化,抑制细胞凋亡的作用。EGFR 基因的突变活化、扩增及产物蛋白过表达均可促进肿瘤细胞的增殖、分化、迁移、血管新生,并且抑制肿瘤细胞的凋亡,其中以 EGFR 基因的突变活化为主要机制<sup>[9-10]</sup>。

**1.2 EGFR 在 NSCLC 中基因突变情况** EGFR 基因突变或扩增的情况在多种肿瘤中存在着家族聚集性,如肾癌、肺癌、前列腺癌、胰腺癌、乳腺癌等,其中在肺癌中发生突变的现象较为常见<sup>[11-13]</sup>。EGFR 基因突变类型已达到 30 余种,突变部位主要集中于编码酪氨酸激酶的第 18-21 外显子区域,约 90% 的 EGFR 基因突变集中在外显子 19(delE746-A750, delL747-P753insS)及外显子 21(L858R, L861Q),全球范围内,exon19/21 突变分别占 EGFR 总突变率的 47.6%和 34%,中国 exon19/21 分别占 EGFR 总突变率的 52%和 45.3%,且突变多发生于

基金项目:南京军区医药卫生科研基金(10MA076);南京军区联勤第十八分部青年培育项目(18FBQN2015008);福建漳州市科技局资助项目(Z2011066);解放军第 175 医院科研基金(16Y020)

作者单位:1. 363000 漳州,解放军第 175 医院病理科;  
2. 350025 福州,南京军区福州总医院病理科

通信作者:余英豪, E-mail: yuyinghao0808@126.com

引用格式:禹 乐,余英豪.非小细胞肺癌胸腔积液 EGFR 突变检测方法的研究进展[J].东南国防医药, 2017,19(4): 380-384.

腺癌、非吸烟者和女性肺癌患者<sup>[14-19]</sup>。

**1.3 EGFR 突变与 NSCLC 的治疗** 2004 年美国哈佛医学院的研究人员 Lynch 等<sup>[20]</sup>及 Paez 等<sup>[21]</sup>分别提出 EGFR 发生基因突变的 NSCLC 患者对 EGFR-TKIs 有高度敏感性,且女性、非吸烟者、腺癌患者、亚洲人群更易发生 EGFR 激活突变。目前以 EGFR 为治疗靶标的分子靶向治疗受到了国内外肿瘤界的普遍关注,其中 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂 Iressa (Genfitinib)已被美国食品药品监督管理局(FDA)批准用于治疗晚期 NSCLC 患者,我国也于 2005 年 2 月批准了 Iressa 进入临床。酪氨酸激酶抑制剂 Gefitinib 是一种苯胺喹唑啉化合物,可阻断 EGFR 诱导的体外肿瘤细胞的生长<sup>[22]</sup>。现有的资料表明,存在 EGFR 外显子 19、21 突变的患者对酪氨酸激酶抑制剂的反应较好,Gefitinib 等小分子靶向药物可通过抑制 ATP 与酪氨酸激酶的结合,达到抑制酪氨酸激酶的活化及自动磷酸化进而抑制 EGFR 介导的信号转导,从而达到 NSCLC 患者病灶缩小,生活质量提高,生存期延长的效果<sup>[20-24]</sup>。

## 2 检测胸腔积液 EGFR 基因突变的方法概述

**2.1 Sanger 测序法** 70 年代末在 Frederick Sanger 发明双脱氧终止法手动测序之后,80 年代中期出现应用双脱氧终止法原理、使用荧光代替同位素及计算机图像识别的自动测序仪。目前,Sanger 测序法是检测 EGFR 基因突变最直观和最准确的方法之一,但该技术对标本与技术条件有着严格标准,且灵敏度不高,只能检测突变基因含量大于 25%~30%的样本<sup>[25-26]</sup>。胸腔积液中的大部分肿瘤突变均为体细胞突变,突变细胞往往与野生型细胞混杂,所以对体细胞的突变检测需要较高的特异性和灵敏度。而目前广泛使用的直接测序法由于灵敏度不高、耗时较长、费用较高,且检测多处突变位点的能力有限,在临床筛选基因靶向治疗患者上难以大范围推广应用。

**2.2 突变体富集 PCR (mutant-enriched PCR, ME-PCR)** ME-PCR 最早是由 Asano 等<sup>[25]</sup>建立用于检测 EGFR 基因突变的技术,其基本原理是利用 *ras* 基因家族某个密码子部位存在已知的限制性内切酶位点,用连续两次的巢式 PCR 来扩增 DNA 片段,在两次扩增反应之间用相应的内切酶消化扩增的 DNA 片段,野生型因被酶切而不能进入第 2 次 PCR 扩增,而突变型则能完整的进入第 2 次 PCR 扩增,并得到突变型产物的富集。因经过两次 PCR 扩增,可从  $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$  个野生型拷贝中检测到 1 个

EGFR 突变基因<sup>[22]</sup>,其灵敏度和特异性均较高,且成本不高。其不足之处在于只能对已知突变位点设计对应的特异性引物,进而检测一些常见的突变类型,且检测过程需要两次 PCR,操作步骤繁杂易因污染而造成假阳性,耗时较长、通量较小,因此有一定的局限性。

**2.3 高频率熔解曲线技术 (high resolution melting analysis, HRM)** HRM 技术是近年来备受关注的创新技术,理论上是通过研究 PCR 产物依赖于序列的熔解温度而对 PCR 产物进行鉴定,进而用于检测样品中存在的双链 DNA 的单核苷酸多态性基因变异,可用于体细胞突变的检测和测序前突变的筛选<sup>[27]</sup>。但该方法只能分析纯度单一的小片段 DNA,且要求有足够的 PCR 模板,模板含量不少于 1 ng 时能得到比较稳定可靠的结果。现阶段该技术尚缺少大量实验数据验证,很多检测项目仍处于开发研究论证阶段,在国内尚未大范围推广应用。

**2.4 高效液相色谱法 (denaturing high-performance liquid chromatograph, DHPLC)** DHPLC 又称为温度调控高效液相色谱,该技术最早建立于 1995 年,近年来迅速发展。该技术是由变性梯度凝胶电泳和单链构象多态性基础上发展起来的新型杂合双链突变检测技术,可自动检测单碱基替代及小片段核苷酸的缺失或插入。DHPLC 与直接测序法相比具有快速、简单等特点,不仅可用于已知突变的检测,还可用于未知突变的扫描,但无法检测出同源性突变,只能检测突变是否存在,无法检测出其突变类型;当有多个片段需要检测时,需要多个解链温度,增加了检测步骤,增加了工作量,且在结果判读时易出错。

**2.5 突变扩增阻滞系统 (amplification refractory mutation system, ARMS)** ARMS 又称等位基因特异 PCR,或称等位基因特异性扩增法。该技术是 1989 年 Newton 等<sup>[28]</sup>在 PCR 的基础上建立的,是利用 Taq DNA 聚合酶缺少 3'→5'外切酶活性,PCR 引物的 3'末端位碱基必须与其模板 DNA 互补才能有效扩增的基本原理,针对不同的已知突变,设计适当的引物以检测出突变基因。设计探针时,在引物的 3'端设计一个错配碱基,一个与突变 DNA 互补,另一个与野生 DNA 互补,使其只能与突变型或野生型互补而进行扩增。扩增后所得到的 PCR 产物可通过实时荧光定量 PCR (real-time PCR, RT-PCR) 或凝胶电泳进行分析。由于其高敏感度、高特异性、技术成熟、易推广的特点,现已广泛应用于各种已知基因突变的检测。

楔形探针扩增阻滞突变系统 (scorpions amplification refractory mutation system, Scorpions ARMS) 是将 ARMS 和 Scorpions 实时 PCR 技术相结合的一种新技术,该技术所用的探针为 Scorpion 探针是一种新型的探针,由一条引物和一条发夹结构的探针构成,探针的 5'端和 3'端分别标记有报告荧光基团和淬灭基团。在自由状态时,报告荧光基团和淬灭基团很接近,不产生荧光;变性时茎环结构被打开,退火时引物与模板结合并延伸,环区与新合成的目的基因的互补区域结合,此时 Scorpion 探针与 PCR 产物在同一条 DNA 链上,是分子内的结合。由于发夹结构被打开,报告荧光基团和淬灭基团分离,因此可检测到报告荧光发出的荧光信号。该技术自动化程度更高,操作简单,特异性和灵敏性高,重复性好,为临床基因靶向治疗提供及时、可靠的分子病理实验室依据<sup>[29]</sup>。

### 3 肺癌患者胸腔积液标本常用处理方法

胸腔积液的标本经过常规细胞学诊断可分为: NSCLC 阴性、NSCLC 可疑阳性、确诊为 NSCLC 三大类。不同类型的标本应具有最适合的标本处理方法,但现有相关资料只有少数对其研究对象的标本性质有所描述,大部分研究的侧重点在于胸腔积液和肿瘤组织的 *EGFR* 基因突变检测结果的比较,以及 *EGFR* 基因突变检测的意义,鲜有对不同类型的胸腔积液进行系统的分类及其相应的最适方法的相关研究。

现对少数提及标本类型的研究结果总结如下:常规细胞学就能确诊为 NSCLC 的胸腔积液标本可直接使用细胞沉淀提取 DNA,再进行 *EGFR* 基因突变的检测,该方法步骤简单、速度快捷、DNA 获得率高、重复性好、结果可靠;对于肿瘤含量 >40% 的标本还可选择直接提取上清液中的 DNA 进行检测<sup>[30-32]</sup>,仅通过细胞学涂片就能明确诊断,且肿瘤细胞含量 >40% 的标本较少,所以应用胸腔积液上清液检测 *EGFR* 的方法虽然可行,但实际应用局限性也较大。

细胞学诊断为可疑或确诊为 NSCLC 的胸腔积液标本,均可将细胞沉淀制作成细胞块,该技术不仅可通过 HE 切片对可疑肿瘤阳性的标本进行定性,还可通过免疫组化染色进行鉴别诊断,且细胞沉淀蜡块可长久保存,解决了脱落细胞无法保存和连续切片的问题。细胞块中肿瘤含量 >5% 时,可应用细胞块切片进行 DNA 提取,并用于 *EGFR* 基因突变检测<sup>[33]</sup>。虽然细胞块提取法的过程相较于细胞

沉淀直接提取法繁琐,肿瘤细胞 DNA 的质量和获得率等不足,但因其检测与肿瘤组织检测结果具有较高的一致性,且检测结果稳定、重复性好,并兼备诊断功能等优点,使其已成为目前临床病理处理胸腔积液标本的最主要技术方法。现阶段对于如何较好的处理肿瘤含量 <5% 胸腔积液标本的方法尚需要进一步研究。

### 4 肺癌患者胸腔积液中 *EGFR* 基因突变情况

**4.1 胸腔积液上清液检测 *EGFR* 基因突变** 临床送检的胸腔积液经过常规细胞学诊断,选择诊断为胸水中见到肿瘤细胞的标本,离心后取上清液用于 *EGFR* 基因突变检测。早期 Kimura 等<sup>[34]</sup>检测了 43 例 NSCLC 患者的胸腔积液的上清液的 *EGFR* 基因突变情况,研究结果显示突变率为 25.6% (11/43)。Soh 等<sup>[35]</sup>检测 61 例 NSCLC 患者的胸腔积液上清液的 *EGFR* 基因突变率为 26.2% (16/61),两者较为接近。潘羨心等<sup>[30]</sup>分别用直接测序法和 HMR 法检测了 43 例肺腺癌患者癌性胸水上清液标本,结果显示 HRM 法检测 *EGFR* 基因突变共 17 例,总突变率为 39.53%,其中第 19 外显子突变 14 例,第 21 外显子突变 3 例;直接基因测序结果显示,EGFR 突变 14 例,总突变率为 32.56%,均为第 19 外显子突变。Zhang 等<sup>[36]</sup>比较了 26 例 NSCLC 患者胸腔积液中上清液和细胞沉淀的突变情况,直接测序法结果显示突变率为 26.92% (7/26),有四对样本存在差异,两者检测结果符合率为 53.85%;突变富集 PCR 检测结果显示两者的突变率均为 50% (13/26),两者检测结果符合率为 100%。上述为数不多的研究结果显示,胸腔积液的上清液可作为检测 *EGFR* 基因突变的标本来源,但由于尚缺少大量实验数据验证和方法学的统一,胸腔积液上清液检测 *EGFR* 基因突变有待进一步研究论证。

**4.2 胸腔积液细胞沉淀检测 *EGFR* 基因突变** 临床送检的胸腔积液经过常规细胞学诊断,选择肿瘤细胞阳性的标本,经离心后获取的细胞沉淀可直接用于 DNA 提取,还可进行石蜡包埋制作细胞块后进行 DNA 提取,最后行 *EGFR* 基因突变检测。丁丽等<sup>[37]</sup>采用 Sanger 测序法检测 NSCLC 患者的恶性胸腔积液 23 例,EGFR 突变率为 34.8% (8/23),19 外显子突变占 50%,21 外显子突变占 20%。谢强等<sup>[38]</sup>采用 ARAMS 法同时检测 NSCLC 患者内科胸腔镜活检标本和与其相对应患者的胸腔积液 63 例,活检标本和胸腔积液标本中 EGFR 突变率分别为 54.0%、50.8%,胸腔积液细胞沉淀的 *EGFR* 基因



突变率略低于活检组织标本。赵瑾等<sup>[33]</sup>采用焦磷酸测序法检测 NSCLC 患者胸腔镜下活检标本 46 例和与其相对应患者的胸腔积液 43 例 *EGFR* 基因突变, 活检标本和胸腔积液标本中 *EGFR* 基因突变检出率分别 27.9% (12/43) 和 25.6% (11/43)。魏冰等<sup>[39]</sup>采用 RT-PCR 法同时检测恶性胸腔积液中的细胞沉淀及其每例患者所对应的纤维支气管镜或经肺穿刺活检晚期标本各 109 例, *EGFR* 基因突变率为 56.88% (62/109), 其中 19 外显子突变占到 53.23% (33/62), 21 外显子突变占 46.77% (29/62), 胸腔积液内的细胞标本检出率略高于活检组织标本, 但无明显差异。尹迎春等<sup>[40]</sup>采用 RT-PCR 检测 76 例 NSCLC 的胸水细胞块及对应的肺肿瘤穿刺标本的 *EGFR* 突变, 结果两者的 *EGFR* 突变率均为 34.21% (26/76), 一致率 100%。现有研究资料显示, 胸腔积液离心后获取沉淀, 提取 DNA 后进行 *EGFR* 突变检测, 使用不同的方法所获得的 *EGFR* 基因突变率在 25.6%~68.4% 之间, 突变主要发生在 21 号外显子和 19 号外显子上, 其中 21 号外显子的点突变 (L858R) 约占总突变率的 18%~52%, 19 号外显子上缺失 (19Del) 约占到总突变率的 48%~81%<sup>[33,37-42]</sup>; 突变率与肺癌的病理类型有关, 其中腺癌患者胸腔积液沉淀的 *EGFR* 突变率普遍高于其他类型的肺癌, 这与肿瘤组织标本检测 *EGFR* 突变率、突变热点部位及临床特点较一致<sup>[43]</sup>, 但在 *EGFR* 基因突变率与性别、吸烟史、年龄的相关性上各研究结果略有不同, 尚未形成较为一致的结论。

## 5 结 语

目前我国 NSCLC 患者的 *EGFR* 基因突变检测率不高, 难以取得满意的检测标本是主要原因之一。临床中推荐应用肿瘤组织标本进行 *EGFR* 基因突变检测, 但是对于心肺功能较差无法耐受手术或已经失去手术机会的 NSCLC 晚期患者, 组织标本的获得比较困难。因此寻找替代肿瘤组织用于基因诊断是当前迫切需要解决的问题。恶性胸腔积液是晚期 NSCLC 患者常见的症状, 获得较为容易。应用胸腔积液不仅可进行常规的病理诊断, 还为实施 *EGFR* 基因突变检测提供了可能。随着分子病理技术的不断进步和胸腔积液处理方法的不断完善, 应用胸腔积液检测 *EGFR* 基因突变将会成为了解 NSCLC 患者 *EGFR* 基因突变状况的又一可靠途径, 以期临床筛选适合应用 *EGFR* 酪氨酸激酶受体抑制剂治疗的患者提供参考价值。

## 【参考文献】

- [1] Torre LA, Bray F, Sierl RL, *et al.* Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2):87-108.
- [2] Jemal A, Jemal A, Siegel R, *et al.* Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2007, 57(1):43-66.
- [3] 周小林. CRP 和 Alb 与初诊断的非小细胞肺癌临床病理特征联系及预后价值分析 [J]. 东南国防医药, 2016, 18(5):489-492.
- [4] 许 阳, 陈良安, 田 庆, 等. 表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂在晚期非小细胞肺癌一线治疗中的应用 [J]. 中国肺癌杂志, 2010, 13(1):48-53.
- [5] Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, *et al.* Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma [J]. N Engl J Med, 2009, 361(10):947-957.
- [6] 张 纓, 李祥周, 周 瑜, 等. 非小细胞肺癌胸腔积液细胞块分子病理检测胡意义 [J]. 医学研究生学报, 2013, 26(8):829-832.
- [7] Cao C, Lu S, Sowa A, *et al.* Priming with *EGFR* tyrosine kinase inhibitor and EGF sensitizes ovarian cancer cells to respond to chemotherapeutic drugs [J]. Cancer Letters, 2008, 266(2):249-262.
- [8] Sibilio M, Kroismayr R, Lichtenberger BM, *et al.* The epidermal growth factor receptor: from development to tumorigenesis [J]. Differentiation, 2007, 75(9):770-787.
- [9] Ciardiello F, Tortora G. *EGFR* antagonists in cancer treatment [J]. N Engl J Med, 2008, 358(11):1160-1174.
- [10] 王晓萍, 丰俊东. 放射治疗与分子靶向药物在肿瘤中的联合应用 [J]. 东南国防医药, 2008, 10(4):20-21.
- [11] Paez JG, Jänne PA, Lee JC, *et al.* *EGFR* mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy [J]. Science, 2004, 304(5676):1497-1500.
- [12] Mak RH, Doran E, Muzikansky A, *et al.* Outcomes after combined modality therapy for *EGFR*-mutant and wild-type locally advanced NSCLC [J]. Oncologist, 2011, 16(6):886-895.
- [13] Luo YH, Wu CH, Wu WS, *et al.* Association between tumor epidermal growth factor receptor mutation and pulmonary tuberculosis in patients with adenocarcinoma of the lungs [J]. J Thorac Oncol, 2012, 7(2):299-305.
- [14] Zhou C, Wu YL, Chen G, *et al.* Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced *EGFR* mutation-positive nonsmall cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study [J]. Lancet Oncol, 2011, 12(8):735-742.
- [15] Chan SK, Gullick WJ, Hill ME. Mutations of the epidermal growth factor receptor in Non-small-cell lung cancer search and destroy [J]. Eur J Cancer, 2006, 42(1):17-23.
- [16] Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, *et al.* Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma [J]. N Engl J Med, 2009, 361(10):947-957.
- [17] Ren S, Kuang P, Zheng L, *et al.* Analysis of driver mutations in female non-smoker asian patients with pulmonary adenocarcinoma

- [J]. Cell Biochem Biophys, 2012, 64(2):155-160.
- [18] Tiseo M, Gelsomiano F, Boggini D, *et al.* EGFR and EML 4-ALK gene mutations in NSCLC: a case report of erlotinib-resistant patient with both concomitant mutations[J]. Lung Cancer, 2011, 71(2):241-243.
- [19] Pao W, Miler 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[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(36):13306-13311.
- [20] 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[J]. N Engl J Med, 2004, 350(21):2129-2139.
- [21] Paez JG, Janne PA, Lee JC, *et al.* EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy[J]. Science, 2004, 304(5676):1497-1500.
- [22] Ciardiello F, Caputo R, Bianco R, *et al.* Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD-1839 (Iressa), an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(5):2053.
- [23] Zhu JQ, Zhong WZ, Zhang GC, *et al.* Better survival with EGFR exon 19 than exon 21 mutations in gefitinib-treated non-small cell lung cancer patients is due to differential inhibition of downstream signals[J]. Cancer Lett, 2008, 265(2):307-317.
- [24] D'Amico TA, Aloia TA, Moore MB, *et al.* Molecular biologic sub-staging of stage I lung cancer according to gender and histology[J]. Ann Thorac Surg, 2000, 69(3):882-886.
- [25] Asano H, Toyooka S, Tokumo M, *et al.* Detection of EGFR gene mutation in lung cancer by mutant-enriched polymerase chain reaction assay[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(1):43-48.
- [26] Endo K, Fonishi A, Sasaki H, *et al.* Epidermal growth factor receptor gene mutation in non-small cell lung cancer using highly sensitive and fast TaqMan PCR assay[J]. Lung Cancer, 2005, 50(3):375-384.
- [27] Do H, Krypuy M, Mitchell PL, *et al.* High resolution melting analysis for rapid and sensitive EGFR and KRAS mutation detection in formalin fixed paraffin embedded biopsies[J]. BMC Cancer, 2008, 8:142-154.
- [28] Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, *et al.* Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS)[J]. Nucleic Acids Res, 1989, 17(7):2503-2516.
- [29] 王 璇, 时姗姗, 马恒辉, 等. 非小细胞肺癌表皮生长因子受体基因突变的结果分析[J]. 东南国防医药, 2012, 14(5):387-389.
- [30] 潘羨心, 孟加榕, 郭以河, 等. HRM 方法检测肺腺癌患者癌性胸水上清液 EGFR 基因突变的临床意义[J]. 现代肿瘤医学, 2014, 22(10):2332-2335.
- [31] 郭以河, 潘羨心, 孟加榕, 等. 恶性胸腔积液不同成分 DNA 提取结果比较分析[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2015, 18(2):280-283.
- [32] 郭以河, 孟加榕, 张闽峰, 等. 一种快速提取恶性胸水中肿瘤细胞 DNA 的方法[J]. 现代肿瘤医学, 2013, 21(12):2833-2834.
- [33] 赵 瑾, 田俏梅, 吴白平. 非小细胞肺癌胸腔积液与小活检标本中 EGFR 基因突变检测的比较[J]. 黑龙江医药科学 2014, 37(3):109-110.
- [34] Kimura H, Fujiwara Y, Sone T, *et al.* High sensitivity detection of epidermal growth factor receptor mutations in the pleural effusion of non-small cell lung cancer patients[J]. Cancer Sci, 2006, 97(7):642-648.
- [35] Soh J, Toyooka SK, Asano H, *et al.* Usefulness of EGFR mutation screening in pleural fluid to predict the clinical outcome of gefitinib treated patients with lung cancer[J]. Int J Cancer, 2006, 119(10):2353-2358.
- [36] Zhang X, Zhao Y, Wang M, *et al.* Detection and comparison of epidermal growth factor receptor mutations in cells and fluid of malignant pleural effusion in non-small cell lung cancer[J]. Lung Cancer, 2008, 60(2):175-182.
- [37] 丁 丽, 张 萍, 武晓楠, 等. 非小细胞肺癌患者胸腔积液肿瘤细胞基因突变检测及其在治疗中的价值[J]. 河北医科大学学报, 2011, 32(1):1-4.
- [38] 谢 强, 陈 群, 石 琴, 等. 内科胸腔镜非小细胞肺癌活检标本及胸腔积液中 EGFR 基因突变检测[J]. 临床与实验病理学杂志, 2013, 29(8):881-883.
- [39] 魏 冰, 马 杰, 马智勇, 等. 肺腺癌患者恶性胸腔积液中 EGFR 突变状况分析[J]. 临床与实验病理学杂志, 2012, 28(3):323-326.
- [40] 尹迎春, 王新美, 李 良, 等. 非小细胞肺癌胸腔积液细胞蜡块检测 EGFR 与 K-ras 基因突变和 EML4-ALK 融合基因及其临床病理特征[J]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2015, 22(9):870-874.
- [41] Hung MS, Lin CK, Leu SW, *et al.* Epidermal growth factor receptor mutations in cells from non-small cell lung cancer malignant pleural effusions[J]. Chang Gung Med J, 2006, 29(4):373-379.
- [42] Tsai TH, Su KY, Wu SG, *et al.* RNA is favourable for analyzing EGFR mutations in malignant pleural effusion of lung cancer[J]. Eur Respir J, 2012, 39(3):677-684.
- [43] 邢 彤, 呼 群, 苏乌云, 等. 非小细胞肺癌免疫组化指标的表达式与 EGRF 基因突变的相关性[J]. 医学研究生学报, 2017, 30(3):275-278.

(收稿日期:2017-04-10; 修回日期:2017-06-29)

(本文编辑:刘玉巧)