

华南地区非小细胞肺癌患者 肿瘤组织 EGFR, ALK 和 ROS1 基因突变分析*

黎谢梦丹, 罗 凯, 吴顺芳, 贺智敏

(广州医科大学附属肿瘤医院, 广州医科大学肿瘤研究所, 广州 510095)

摘要:目的 探讨华南地区非小细胞肺癌(NSCLC)患者肿瘤组织表皮生长因子受体(EGFR), 变性淋巴瘤激酶(ALK)和 C-ros 原癌基因 1 酪氨酸激酶(ROS1)基因突变特点及其与临床特征的关系。方法 收集 2016 年 11 月~2017 年 6 月间华南地区 76 例 NSCLC 患者肿瘤组织及相应临床资料, 利用 ARMS 法三基因突变联合检测试剂盒检测各肿瘤组织的 EGFR, ALK, ROS1 基因突变状态, 并做各基因突变率与临床特征的相关性分析。结果 在华南地区 76 例 NSCLC 患者中, EGFR 基因突变率为 55.3%(42/76), 19 del 和 L858R 突变为其主要突变类型, 检出 1 例 19del 联合 L858R 共突变; ALK 基因融合阳性率为 17.1%(13/76), 检出 4 例 ALK 基因融合联合 EGFR 基因突变; ROS1 基因融合的阳性率为 1.3%(1/76), 未见 ROS1 基因联合 EGFR 基因或 ALK 基因共突变。与 ROS1 基因相比, EGFR 和 ALK 基因突变率更高, 差异具有统计学意义($\chi^2=54.515, P=0.000$; $\chi^2=11.329, P=0.001$)。非吸烟 NSCLC 患者 EGFR 基因突变率高于吸烟患者, 差异具有统计学意义($\chi^2=4.578, P=0.032$), 而 ALK 与 ROS1 基因突变率的差异则不具有统计学意义($\chi^2=0.000$, 均 P 值 >0.05); 不同年龄、性别和组织学分型的 NSCLC 患者其 EGFR, ALK 与 ROS1 基因突变率的差异不具有统计学意义($\chi^2=0.000\sim2.219$, 均 P 值 >0.05)。结论 EGFR, ALK 和 ROS1 基因突变均可见于华南地区 NSCLC 患者, 其中以 EGFR 和 ALK 基因突变率更高。

关键词:非小细胞肺癌; 表皮生长因子受体; 变性淋巴瘤激酶; C-ros 原癌基因 1 酪氨酸激酶; 联合检测

中图分类号:R734.2; R730.43 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2017)05-016-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2017.05.005

Mutation Analysis of EGFR, ALK and ROS1 in Tumor Tissues of Patients with Non-Small Cell Lung Cancer in South of China

LIXIE Meng-dan, LUO Kai, WU Shun-fang, HE Zhi-min

(Affiliated Cancer Hospital of Guangzhou Medical University,

Cancer Research Institute of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510095, China)

Abstract: Objective To investigate the characteristics of EGFR, ALK and ROS1 mutations in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) in South of China and its relationship with clinical features. **Methods** The tumor tissues and corresponding clinical data of 76 NSCLC patients in South of China from November 2016 to June 2017 were collected. The mutations of EGFR, ALK and ROS1 were detected by ARMS assay with Joint detection kit. Meanwhile, the correlation between gene mutation rate and clinical features was analyzed. **Results** The mutation rate of EGFR was 67.3% (42/76) in 76 patients with NSCLC in South of China, 19 del and L858R mutations were the main mutation types. There was a co-mutation including 19 del and L858R. The positive rate of ALK gene fusion was 17.1% (13/76), and 4 cases of ALK gene fusion combined with EGFR mutation were detected. The positive rate of ROS1 gene fusion was 1.3% (1/76), and there was no co-mutation with other genes. Compared with ROS1, EGFR and ALK mutation rate was higher, the difference was statistically significant ($\chi^2=54.515, P=0.000$; $\chi^2=11.329, P=0.001$). The mutation rate of EGFR in non-smoking NSCLC patients was significantly higher than that in smokers ($\chi^2=4.578, P=0.032$), while the mutation rate of ALK and ROS1 was not statistically significant ($\chi^2=0.000, P>0.05$). There was no statistically significant difference in EGFR, ALK and ROS1 gene mutation rates among NSCLC patients of different age, sex and histology ($\chi^2=0.000\sim2.219, P>0.05$). **Conclusion** EGFR, ALK and ROS1 gene mutations can be seen in patients with NSCLC in South China, in which EGFR and ALK gene mutation rate is higher.

Keywords: non-small cell lung cancer; EGFR; ALK; ROS1; joint detection

肺癌是威胁人类健康的重要恶性肿瘤之一, 在我国, 肺癌发病率及死亡率均居首位^[1,2]。按组织学分型, 肺癌可分为小细胞肺癌与非小细胞肺癌,

其中非小细胞肺癌 (non-small-cell lung cancer, NSCLC) 约占 85%, 且五年生存率不足 20%^[3]。近年来, NSCLC 的靶向治疗因其疗效显著、毒副作

* 基金项目: 广东省中医药局科研项目 (No. 20161179)。

作者简介: 黎谢梦丹 (1987—), 女, 本科, 检验技师, 从事工作及研究方向: 肺癌的发病机制, Tel: 020-66673666, E-mail: lixiemengdan@163.com。

通讯作者: 贺智敏 (1955—), 男, 博士, 教授。从事工作及研究方向: 肿瘤耐药机制, Tel: 020-66673666, E-mail: hezhimin2005@yahoo.com。

用小的优点迅速成为了继手术、放疗和化疗后的另一大治疗手段,但其疗效的取得需通过检测相关驱动基因的异常来进行预测。相关研究报道,在表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)基因突变或存在间变性淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase, ALK), C-ros 原癌基因 1 酪氨酸激酶(C-ros oncogene 1 receptor tyrosine kinase, ROS1)基因融合的 NSCLC 患者中分别应用表皮生长因子受体酪氨酸酶抑制剂(epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors, EGFR-TKIs)或 crizotinib 进行靶向治疗时可获得较野生型患者更优的疗效,因此靶向治疗前检测 EGFR, ALK 和 ROS1 基因突变对于靶向治疗疗效预测和适宜患者筛选具有重要意义^[4~6]。目前,针对 EGFR, ALK 和 ROS1 基因突变的检测方法各异且对标本的要求各不相同,所以在临床应用中往往是分别检测,这就造成了患者标本、时间、金钱的浪费。因而,针对已有靶向药物的靶点进行联合检测就成为了一种趋势。本研究旨在利用基于扩增阻滞突变系统(amplification refractory mutation system, ARMS)法的三基因联合检测试剂盒检测临床标本,以期了解华南地区 NSCLC 患者中 EGFR, ALK 和 ROS1 基因突变的频率及其可能的相互关系,同时评价基于 ARMS 法的联合检测试剂盒对这三种突变的检测效能是否符合临床要求。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集 2016 年 11 月~2017 年 6 月广州医科大学附属肿瘤医院经病理学确诊的 NSCLC 患者肿瘤组织样本 76 例,具体纳入标准为:可获得符合检测要求的组织样本且肿瘤细胞含量大于 10%,性别年龄不限,无并发其他肿瘤。其中男性 42 例,女性 34 例;腺癌 73 例,非腺癌 3 例;患者年龄范围 33~85 岁,中位年龄 61 岁。

1.2 试剂和仪器 核酸提取试剂盒与 EGFR, ALK, ROS1 基因突变检测试剂购自厦门艾德;分光光度计为美国 Thermo 公司 NanoDrop 2000;荧光定量 PCR 仪为美国 Thermo 公司 7500。

1.3 样本 DNA 与 RNA 提取 依据说明书实验步骤提取样本的基因组 DNA 与总 RNA,微量分光光度计分别测定样本 DNA 与 RNA 的浓度和质量;随后按说明书要求将样本稀释至最佳检测浓度备检。

1.4 EGFR, ALK 和 ROS1 基因突变检测 取已稀释好核酸样本加样上荧光定量 PCR 仪,实验设置阴阳性对照、外控与内参。实验结束后按说明书结果判别标准判读样本基因突变检测结果。该试

剂盒基因突变检测范围参见说明书。

1.5 生物信息学分析 利用生物信息学在线软件 cBioPortal^[7,8] (<http://www.cbioportal.org/>) 分析 EGFR, ALK 和 ROS1 基因突变的相互关系。

1.6 统计学分析 采用 SPSS16.0 软件进行统计分析。率的分析采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。当 $T(\text{理论频数}) < 1$ 时采用 Fisher 确切概率法,当 $1 \leq T(\text{理论频数}) < 5$ 时做 Yates 连续性校正卡方值。

2 结果

2.1 华南地区 EGFR, ALK, ROS1 基因突变情况

在 76 例华南地区 NSCLC 患者中,EGFR 基因突变率为 55.3%(42/76),其中 19 外显子缺失突变(19del), 21 外显子 L858R 突变和其他突变类型的突变率分别为 23.7%(18/76), 28.9%(22/76) 和 2.6%(2/76),同时在 EGFR 基因突变样本中检出 19del 与 L858R 双突变 1 例。ALK 基因融合阳性率为 17.1%(13/76),其中 ALK 基因融合联合 EGFR 基因突变 4 例(ALK 基因融合与 19del 共突变 2 例, ALK 基因融合与 L858R 共突变 2 例); ROS1 基因融合阳性率为 1.3%(1/76),未见与 EGFR 基因或 ALK 基因存在共突变。与 ROS1 基因相比,EGFR 和 ALK 基因突变率更高,差异具有统计学意义($\chi^2 = 54.515$, $P = 0.000$; $\chi^2 = 11.329$, $P = 0.001$)。

2.2 EGFR, ALK, ROS1 基因突变情况与各临床特征的关系 见表 1。在 76 例华南地区 NSCLC 患者中,非吸烟患者 EGFR 基因突变率高于吸烟者,差异具有统计学意义($\chi^2 = 4.578$, $P = 0.032 < 0.05$),不同年龄、性别和组织学分型的 NSCLC 患者其 EGFR 基因突变率差异不具有统计学意义。不同年龄、性别、吸烟状态和组织学分型的 NSCLC 患者其 ALK 与 ROS1 基因突变率差异不具有统计学意义。

2.3 EGFR, ALK 和 ROS1 基因突变互斥性的生物信息学分析 利用源自 TCGA 数据库的 522 例肺腺癌二代测序结果分析 EGFR, ALK 和 ROS1 基因突变互斥性发现:ALK 基因突变与 EGFR 和 ROS1 基因突变倾向于非互斥性,而 EGFR 和 ROS1 基因突变则倾向于互斥性。

3 讨论 伴随着治疗靶点 EGFR 的发现和相应靶向药物 EGFR-TKIs 的问世,NSCLC 的治疗跨入了靶向治疗的新时代。其后新靶点 ALK 与 ROS1 也相继被发现并开发了相应的靶向药物 crizotinib 投入临床 NSCLC 的靶向治疗。相关研究表明,存在 EGFR, ALK 和 ROS1 基因突变的 NSCLC 患者可在相应的靶向治疗中获益,因此检

测 EGFR, ALK 和 ROS1 基因突变对于靶向治疗前适宜患者的筛选具有举足轻重的意义^[9,10]。

相关研究显示,肿瘤的发生存在地域、种族的

表 1 非小细胞肺癌患者 EGFR/ALK/ROS1 基因突变与临床特征的相关性

相关因素		n	突变例数[n(%)]			χ^2			P 值		
			EGFR	ALK	ROS1	EGFR	ALK	ROS1	EGFR	ALK	ROS1
性别	男	42	20(47.6)	7(16.7)	0	2.219	0.130	0.011	0.136	0.910	0.915
	女	34	22(64.7)	6(17.6)	1(2.9)						
吸烟情况	吸烟	28	11(39.3)	5(17.9)	0	4.578	0.000	0.000	0.032	1.000	1.000
	不吸烟	48	31(64.6)	8(16.7)	1(2.1)						
年龄	≤60 岁	37	20(54.1)	7(18.9)	0	0.043	0.167	0.000	0.836	0.683	1.000
	>60 岁	39	22(56.4)	6(15.4)	1(2.6)						
组织学分型	腺癌	73	41(56.2)	13(17.8)	1(1.4)	0.035	0.000	0.000	0.852	0.984	1.000
	非腺癌	3	1(33.3)	0	0						

差异,各驱动基因的突变亦然。如 EGFR 基因突变率在东亚人群中明显高于美国和欧洲,可达 50%左右。同时在腺癌、女性和不吸烟的 NSCLC 患者中也存在更高的 EGFR 基因突变率。而 ALK 与 ROS1 基因融合阳性的 NSCLC 患者具有相似的临床特征,即在年轻、不吸烟的肺腺癌患者中更常见,其在 NSCLC 中突变率分别可达 5% 和 2%^[11~13]。在该研究中,EGFR 基因的突变率与相关报道相符,但仅在非吸烟患者中发现 EGFR 基因突变率显著性增加。而 ALK 和 ROS1 基因的突变率则较相关报道的突变率偏高且与各临床特征不相关。分析其原因可能与地域、种族、样本数量的局限有关,需进一步研究探讨。该研究结果提示 EGFR, ALK 与 ROS1 基因突变均可见于华南地区 NSCLC 患者,其中以 EGFR, ALK 基因突变更常见。

肿瘤异质性是指肿瘤细胞在大体、表型和基因型层面上存在的差异性。肿瘤异质性是肿瘤患者个体疗效差异性的基础之一,同时也影响肿瘤靶向治疗的耐药。在该研究中发现了 1 例 NSCLC 患者不同部位肿瘤组织样本 EGFR 基因突变结果不同(左肺:19del;右肺:L858R),这为 NSCLC 肿瘤异质性的存在提供了实验依据。同时,也提示临床在检测驱动基因突变并根据其结果制订治疗方案时应考虑患者肿瘤异质性可能带来的影响。Shea 等^[14]曾提到 NSCLC 患者的主要驱动基因多存在互斥性。但在该研究中,生物信息学分析结果却提示 ALK 基因突变与 EGFR 和 ROS1 基因突变并非互斥关系。同时在该研究中也检出 4 例标本存在 EGFR 突变与 ALK 基因融合共存的情况。提示在部分 NSCLC 患者中 EGFR 突变与 ALK 基因融合可以以共存的形式出现。因此,为保证临床能获得充分、准确的基因突变信息来指导靶向治疗方

案的制订,联合检测非互斥关系的驱动基因突变显得非常必要。

目前,针对 EGFR 基因突变的检测方法主要有 Sanger 测序法、第二代测序技术(next generation sequencing, NGS), ARMS 等。其中, Sanger 测序法不仅能检测已知突变,还能检测未知突变,但操作复杂,检测丰度低;NGS 能高通量检出突变,准确度及灵敏度均高,检测范围广^[15],但价格昂贵,限制了广泛的临床应用;而 ARMS 因其操作简单,特异度和灵敏度高,重复性好等优点,已经得到广泛的应用^[16]。对于基因融合的检测,免疫组化(immunohistochemistry, IHC)、荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)、反转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)已在临床广泛应用。FISH 检测基因融合的特异度好,但操作繁琐、耗时长,检测通量低;IHC 操作简单、费用低廉,但灵敏度低、特异度和重复性较差。RT-PCR 操作简单、灵敏度高,但仅能检测已知融合类型^[17]。当前情况下,临床多是选择不同的检测方法分别进行 EGFR 基因突变检测和 ALK, ROS1 基因融合检测,这种选择虽然保证了检测结果的准确性但也存在标本用量大、花费高、耗时长等缺点。因此寻找一种基于相同检测平台的精准的多基因突变联合检测方法有望节约标本用量、缩短检测周期和节约检测费用,具有临床实用性。本研究选择了基于 ARMS 法的联合检测试剂盒进行 EGFR, ALK 和 ROS1 基因突变的检测,虽然存在仅能检出已知突变类型的局限,但各基因突变的阳性率与相关报道基本相符,提示该联合检测平台的突变检出率符合临床要求。同时,完成该联合检测所需的标本量仅与单独进行 EGFR 基因突变检测的标本量相同,同时检测周期可缩短至 1 天,因此该(下转 23 页)

(上接 18 页)方法具有节约标本量、检测效率高的明显优势。由此可见,基于 ARMS 法的 EGFR, ALK 和 ROS1 基因突变联合检测平台是一种适用于临床的高效、经济、快速的 NSCLC 驱动基因突变检测平台。

综上所述,EGFR,ALK 与 ROS1 基因突变均可见于华南地区 NSCLC 患者,其中 EGFR,ALK 基因突变率更高。基于 ARMS 法的 EGFR,ALK 和 ROS1 基因突变联合检测是一种高效的 NSCLC 驱动基因突变检测平台。

参考文献:

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015 [J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2015, 65 (1): 5-29.
- [2] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2016, 66(2): 115-132.
- [3] Chen Z, Fillmore CM, Hammerman PS, et al. Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases [J]. Nature Reviews Cancer, 2014, 14 (8): 535-546.
- [4] Li T, Kung H, Mack PC, et al. Genotyping and genomic profiling of non-small-cell lung cancer: implications for current and future therapies [J]. Journal of Clinical Oncology, 2013, 31(8): 1039-1049.
- [5] Matikas A, Kentepozidis N, Georgoulas V, et al. Management of resistance to crizotinib in anaplastic lymphoma kinase-positive non-small-cell lung cancer [J]. Clinical Lung Cancer, 2016, 17(6): 474-482.
- [6] Juan O, Popat S. Treatment choice in epidermal growth factor receptor mutation-positive non-small cell lung carcinoma: latest evidence and clinical implications [J]. Therapeutic Advances in Medical Oncology, 2017, 9(3): 201-216.
- [7] Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal [J]. Science Signaling, 2013, 6 (269): pl1.
- [8] Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data [J]. Cancer Discovery, 2012, 2(5): 401-404.
- [9] 周瑞芳, 卢仁泉. EGFR 基因突变检测的临床应用

[J]. 现代检验医学杂志, 2013, 28(3): 72-74.

Zhou RF, Lu RQ. Clinical application of detecting EGFR mutations [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2013, 28(3): 72-74.

- [10] Song A, Kim TM, Kim DW, et al. Molecular changes associated with acquired resistance to crizotinib in ROS1-rearranged non-small cell lung cancer [J]. Clinical Cancer Research, 2015, 21(10): 2379-2387.
- [11] McIntyre A, Ganti AK. Lung cancer-A global perspective [J]. Journal of Surgical Oncology, 2017, 115 (5): 550-554.
- [12] Gainor JF, Varghese AM, Ou SH, et al. ALK rearrangements are mutually exclusive with mutations in EGFR or KRAS: an analysis of 1 683 patients with non-small cell lung cancer [J]. Clinical Cancer Research, 2013, 19(15): 4273-4281.
- [13] Cai W, Li X, Su C, et al. ROS1 fusions in Chinese patients with non-small-cell lung cancer [J]. Annals of Oncology, 2013, 24(7): 1822-1827.
- [14] Shea M, Costa DB, Rangachari D. Management of advanced non-small cell lung cancers with known mutations or rearrangements: latest evidence and treatment approaches [J]. Therapeutic Advances in Respiratory Disease, 2016, 10(2): 113-129.
- [15] Lindquist KE, Karlsson A, Leveen P, et al. Clinical framework for next generation sequencing based analysis of treatment predictive mutations and multiplexed gene fusion detection in non-small cell lung cancer [J]. Oncotarget, 2017, 8(21): 34796-34810.
- [16] 王京伟, 李艳, 童永清, 等. 湖北地区非小细胞肺癌 EGFR 基因突变及其意义的研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31(3): 7-11, 15.
Wang JW, Li Y, Tong YQ, et al. Detection of epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations and the significance in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) of Hubei province [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2016, 31(3): 7-11, 15.
- [17] 符萌, 冷再君, 李传应, 等. 非小细胞肺癌患者 eml4-alk 基因检测及 eml4-alk 阳性患者临床特征分析 [J]. 安徽医科大学学报, 2017, 52(4): 528-533.
Fu M, Leng ZJ, Li CY, et al. Detection of eml4-alk fusion gene and analysis of its clinical features in NSCLC patients with eml4-alk fusion gene [J]. Acta Universitatis Medicinalis Anhui, 2017, 52 (4): 528-533.

收稿日期: 2017-06-13

修回日期: 2017-07-30