

ARMS 法检测肺腺癌 EGFR 基因突变及临床意义*

李晓锋, 刘 希, 张冠军, 汪园园 (西安交通大学第一附属医院病理科, 西安 710061)

摘要:目的 探讨扩增阻滞突变系统(ARMS)法在肺腺癌中表皮生长因子受体(EGFR)基因突变检测的应用及其临床意义。方法 收集2015年1月~2016年8月西安交通大学第一附属医院病理科的肺腺癌标本566例作为研究对象。其中,胸腔积液细胞块标本34例,肺活检标本401例,手术切除标本131例,采用ARMS法进行石蜡标本EGFR基因突变检测,分析EGFR基因突变与肺腺癌患者临床资料的相关性。结果 肺腺癌标本566例中,吸烟腺癌患者239例,非吸烟腺癌患者327例。吸烟患者中,EGFR突变率与患者年龄、性别、手术方式等无明显关联($P>0.05$),而与肺癌原发部位关系密切($P<0.05$);非吸烟患者中,EGFR突变率与性别、年龄、标本类型及肺癌原发病灶部位无明显相关性($P>0.05$)。结论 ARMS法可有效应用于肺腺癌临床病理石蜡标本中EGFR基因突变检测。吸烟是EGFR突变率的重要影响因素,且对左、右肺均有影响,但是对右肺的影响较大。

关键词:扩增阻滞突变系统;肺腺癌;表皮生长因子受体;肺癌原发部位

中图分类号:R734.2;R730.43 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2018)02-042-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2018.02.013

Detection of EGFR Gene Mutation in Lung Adenocarcinoma by ARMS and Its Clinical Significance

LI Xiao-feng, LIU XI, ZHANG Guan-jun, WANG Yuan-yuan (Department of Pathology,
the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

Abstract: Objective To investigate the efficacy and clinical significance of amplification refractory mutation system (ARMS) in epidermal growth factor receptor (EGFR) gene mutation in lung adenocarcinoma. **Methods** Collected 566 specimens of lung adenocarcinoma in pathology from Department of the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University from January 2015 to August 2016. As the research object, which included 34 cases of pleural cell specimens, 401 cases of lung biopsy specimens and surgical specimens from 131 patients with ARMS to complete the above specimens EGFR gene mutation detection, analysis of EGFR gene mutations associated with non-small cell lung cancer patients clinical data. **Results** Among 566 cases of lung cancer specimens, the EGFR mutation rate of 239 cases of patients with smoking had no obvious correlation with age, gender and surgical methods ($P>0.05$), but primary lung site was closely related ($P<0.05$), and EGFR mutation rate of 327 cases of patients with non smoking had no obvious correlation with age, sex, operation mode and primary lung site ($P>0.05$). **Conclusion** ARMS is an ideal method for the detection of EGFR gene mutation in non-small cell lung cancer. Smoking is a great influence on EGFR mutation rate in both lung tissue, and for right lung tissue is more dramatic.

Keywords: amplification refractory mutation system (ARMS); lung adenocarcinoma; epidermal growth factor receptor (EGFR); primary lung site

肺癌是最常见致命的恶性肿瘤,严重威胁人类健康和生命。研究显示,仅2015年,我国就大约有429万新发恶性肿瘤病例和281万死亡病例,肺癌的发病率和死亡率位于各种肿瘤类型之首^[1]。肺癌按组织学分型可分为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)和小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)。其中,NSCLC占原发性肺癌的80%左右。近年来肺腺癌的发病率不断上升,成为最常见的原发性肺恶性肿瘤。尽管肺癌的诊断、治疗已日趋规范,但目前尚缺乏有效的早期筛查的方法,很多患者在就诊时已经为晚期,难以根治,5年生存率仅16%^[2]。自2004年表皮生长因

子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)基因的作用机制被发现后,针对这一靶点的个体化治疗使NSCLC的预后发生了戏剧性的改变。研究发现,NSCLC体细胞EGFR基因突变状况与NSCLC患者分子靶向治疗获益情况有关,突变的患者对酪氨酸蛋白激酶小分子抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI)特别敏感,而EGFR基因野生型的患者几乎不能获益,针对EGFR-TKIs在NSCLC治疗中的出现,其针对特定人群疗效高、副作用小,给这部分患者的生存带来希望。可见对EGFR基因进行突变检测以选择合适的患者进行靶向治疗十分必要^[3~5]。课题组所用的扩增阻滞

* 基金项目:陕西省国际科技合作与交流计划(项目编号:2016KW-009)。

作者简介:李晓锋(1978—),男,本科,主管技师,主要从事工作及研究方向:肿瘤分子病理, E-mail:15291816606@163.com。

通讯作者:汪园园(1988—),女,硕士,实习研究员,主要从事工作及研究方向:肿瘤分子病理, E-mail:1051815925@qq.com。

突变系统(amplification refractory mutation system, ARMS)法,在实时荧光定量 PCR 的基础上,利用特异性的引物对 DNA 靶向序列进行准确的 PCR 扩增,然后利用荧光标记探针对 PCR 扩增产物进行检测。本实验采用 ARMS 法对本院确诊的肺腺癌患者标本 EGFR 基因突变进行检测研究。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集 2015 年 1 月~2016 年 8 月西安交通大学第一附属医院病理科有住院病历的肺腺癌患者标本,共 566 例,其中女性 254 例,男性 312 例,年龄 28~91 岁,中位年龄 61 岁;吸烟者 239 例,不吸烟者 327 例;胸腔积液细胞块标本 34 例,肺活检标本 401 例,手术切除组织标本 131 例。

1.2 试剂与仪器 FFPE DNA 提取试剂盒(厦门艾德生物医药科技股份有限公司),人类 EGFR 基因 29 种突变荧光 PCR 检测试剂盒(厦门艾德生物医药科技股份有限公司),PCR 扩增仪(美国 BIO-Rad 公司的 CFX96)。

1.3 实验方法 采用 ARMS 完成上述标本 EGFR 基因突变监测。(1)标本采集:收集本科室石蜡标本,包括微小标本和大体标本。微小标本包括 CT 引导下穿刺、支气管镜活检等,大体标本为手术石蜡切片、细胞石蜡标本,所有标本在进行 EGFR 突变检测前均经我们科室医生病理确诊和评估。(2)DNA 提取:①切取 5 μm 厚组织 5~8 片放入 1.5 ml 离心管中。②脱蜡及脱苯。③使用厦门艾德生物医药科技股份有限公司的 FFPE DNA 提取试剂盒提取 DNA。(3)DNA 的纯度和浓度检测:使用 QUAWELL 分光光度计检测所提取 DNA,要求标本 DNA $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 在 1.8~2.0 之间,且 $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}} > 2.0$,然后将标本 DNA 质量浓度调整至 2 ng/ μl 。(4)ARMS 法检测 EGFR 突变:使用厦门艾德生物医药科技股份有限公司的

人类 EGFR 基因 29 种突变荧光 PCR 检测试剂盒进行检测。试剂盒应用 8 联 PCR 管设计,每管内装有对应的 EGFR 突变检测试剂及内部质控试剂,将 50 μl 模板 DNA 和 3 μl Taq 酶混匀后,向对应的 PCR 管内加入 5 μl 混合液即可构成 PCR 反应体系。采用 BIO-Rad 公司的 CFX96 荧光定量 PCR 仪 PCR,反应条件按试剂盒说明书设置,并设置对应的阳性、阴性对照。收集到的信号需满足以下 4 点,则认为检测成功、结果可信:①阴性对照无 FAM 信号升起;②阳性对照 Ct 值 < 20 ;③外控 FAM 信号升起且 Ct 值在 15~21 之间;④内控 VIC 信号升起。

1.4 统计学分析 采用统计软件 SPSS22 进行统计学分析,对于不同性别、年龄段、标本类型及是否吸烟等 EGFR 基因突变率差异应用 χ^2 卡方检验及 Fisher 精确概率法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果 见表 1。肺腺癌标本进行 EGFR 检测,探究 EGFR 基因突变率与吸烟和非吸烟肺腺癌患者临床病理特征的相关性,对 EGFR 基因突变与患者的年龄、性别、手术方式及肺癌原发部位进行统计分析。结果显示,吸烟患者 EGFR 突变率低于非吸烟患者,在吸烟与非吸烟患者标本中 EGFR 突变率与性别、年龄、标本类型都无明显关联($P > 0.05$)。也就是说,在排除吸烟因素后,男性和女性 EGFR 突变率无统计学意义。在肺原发部位中,非吸烟患者在左肺和右肺中 EGFR 突变率分别为 61%和 57%,无统计学差异,而在吸烟患者中 EGFR 突变率分别为 41%和 25%,有统计学差异,因此,吸烟是 EGFR 突变率的主要影响因素。进一步统计发现,吸烟对于双侧肺组织都有影响,对于右侧肺组织影响较大。

表 1 吸烟与非吸烟腺癌患者 EGFR 基因突变影响因素分析[n(%)]

相关因素	吸 烟				非吸烟			
	n	EGFR 突变例数	χ^2	P 值	n	EGFR 突变例数	χ^2	P 值
年龄(岁)	< 61	113	35(31.0)	0.152	166	98(59.0)	0.014	0.905
	≥ 61	126	42(33.3)		161	94(58.4)		
性别	男	235	76(32.3)	0.613	77	41(53.2)	1.243	0.265
	女	4	1(25.0)		250	151(60.4)		
标本类型	手术	54	16(29.6)	0.077	77	48(62.3)	0.904	0.636
	活检	178	56(31.5)		223	127(57.0)		
	细胞	7	5(71.4)		27	17(63.0)		
肺原发部位	左肺	101	41(40.6)	0.026	133	81(60.9)	0.753	0.686
	右肺	132	33(25.0)		180	102(56.7)		
	双肺	6	3(50.0)		14	9(64.3)		

3 讨论 EGFR(络氨酸激酶受体)^[6]是一个 170 kda 具有 486 个氨基酸跨膜受体蛋白。它属于 ErbB 家族之一, ErbB 的家族总共有四大成员: HER1(erbB1), HER2(erbB2), HER3(erbB3) 和 HER4(erbB4), 均定位于细胞膜。根据肿瘤本身不同, 这些受体蛋白表现出不同分布和分子表型改变。EGFR 家族成员它们结构都比较相似, 包括胞内区、跨膜区和胞外区共三部分组成。胞外区是与其相应配体结合的所在部位。而 EGFR 跨膜区将受体锚定在胞膜区, 酪氨酸激酶活性在调节细胞分化和增殖起着非常重要的作用。EGFR 作为 NSCLC 治疗的重要分子靶标被普遍关注。因此, 针对 EGFR 靶点的药物也在不断发展: 包括一代 EGFR-TKI 吉非替尼(gefitinib)和厄洛替尼(erlotinib)等; 二代 EGFR-TKI 阿法替尼和三代 EGFR-TKI 奥希替尼等^[7]。2017 年 V5 版美国国立综合癌症网络(National Comprehensive Cancer Network, NCCN) NSCLC 在临床实践的指南中指出^[8], 对于晚期、转移或者复发的非鳞癌 NSCLC 患者及非吸烟患者或可取得小的活体组织或肿瘤为混合组织学来源的鳞癌, 推荐行 EGFR 基因突变检测, 阳性患者推荐用 EGFR-TKIs 进行一线治疗。

针对 EGFR 靶点的研究显示^[9~11], 直接测序法的灵敏度很有限, 对于肿瘤组织的突变含量至少达到 20% 才能被检测出来, 而实体肿瘤的突变大多是体细胞突变, 突变的细胞与野生的细胞常常混杂在一起, 因此在所提取的 DNA 中常有大量野生型 DNA 混杂, 那么就必须要求检测法有相对较高的特异度和敏感度, 各方法的敏感度、操作方法的难易程度及检测 EGFR 突变范围的不同, 基于荧光定量 PCR 技术为基础的 ARMS 法, 根据不同位点设计的特异性探针能够仅识别并扩增 EGFR 突变序列, 在突变信号的收集过程较少受到肿瘤组织中混杂的正常细胞的干扰。ARMS 法检测技术在设计上能最大限度地缩短扩增产物的目标长度, 避免从石蜡包埋组织(FFPE)标本提取的 DNA 出现片段化而无法检测到准确结果的难点。ARMS 法与测序法相比而言, 它的操作简单, 敏感性好, 能检测到 DNA 中含量低至 1% 的突变基因, 并且能检测 EGFR 基因多达 29 种突变类型。结合 RT-PCR 平台在扩增时采用了一个闭管操作, 简单, 不需要产物的后处理, 很大程度避免了扩增产物的污染, 在临床样品检测比较容易开展^[12~14]。我们的研究也表明采用 ARMS 法, 对于大体手术标本、穿刺、支气管镜标本及恶性胸腔积液标本进行 EGFR 检测, 其突变率并无差异, 也说明其检测的敏感性和

可靠性。

有研究证明, EGFR 突变在亚裔、女性、非吸烟患者中高发, 与本文结果一致^[15]。本文同时也证明, 对于男性不吸烟患者, 其突变率与女性患者无统计学差异, 提示吸烟对于 EGFR 突变率影响较大, 排除吸烟因素后对性别影响较小。有研究表明^[16], EGFR 突变与 TNM 分期、肿瘤原发灶部位及标本类型差异无统计学意义, 本研究结果显示 EGFR 突变与年龄、性别及标本类型无统计学差异, 而与肿瘤原发灶部位却有密切关系。与非吸烟患者比较, 吸烟患者的两侧肺组织 EGFR 突变率均降低, 其右肺突变率明显低于左肺, 提示吸烟对于右侧肺组织影响较大。同时提示, 对于晚期无法手术的患者, 也可通过肺部、淋巴结穿刺、支气管镜活检或胸腔积液脱落细胞检查进行 EGFR 检测, 从而进行有效的治疗。

综上所述: ①EGFR 高突变率发生在肺腺癌、亚裔、不吸烟患者等的特异指标; ②肺、淋巴结穿刺及支气管镜标本, 恶性胸腔积液可替代手术标本进行 EGFR 检测; ③吸烟对于左、右肺 EGFR 突变率均有影响, 但是对于右肺的影响较大; ④ARMS 法可有效应用于肺癌临床病理石蜡标本中 EGFR 基因突变检测。

参考文献:

- [1] Chen W. Cancer statistics; updated cancer burden in China[J]. Chin J Cancer Res, 2015, 27(1): 1.
- [2] Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, et al. Cancer statistics, 2001[J]. CA-A Cancer J Clin, 2001, 51(1): 15-36.
- [3] Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, et al. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers[J]. J Natl Cancer Inst, 2005, 97(5): 339-346.
- [4] 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[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(36): 13306-13311.
- [5] 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.
- [6] Zandi R, Larsen AB, Andersen P, et al. Mechanisms for oncogenic activation of the epidermal growth factor receptor[J]. Cell Signal, 2007, 19(10): 2013-2023.
- [7] Ke EE, Wu YL. EGFR as a pharmacological target in EGFR-mutant non-small-cell lung cancer: where do we stand now? [J]. Trends in Pharmacological Sciences, 2016, 37(11): 887-903.
- [8] Ettinger DS, Wood DE, Aisner DL, et al. Non-small cell lung cancer, version 5. 2017, NCCN clinical prac-

- tice guidelines in oncology[J]. Journal of the National Comprehensive Cancer Network Jncn, 2017, 15(4): 504-535.
- [9] 赵婧雅,王笑影,曾海英,等.直接测序法与蝎形探针扩增阻滞突变系统检测肺癌小活检标本 EGFR 基因突变的比较[J].中国癌症杂志,2013,23(2):106-113.
Zhao JY, Wang XY, Zeng HY, et al. The comparison of EGFR mutation detection in clinical biopsy samples of lung cancer by ARMS and direct sequencing[J]. China Oncology, 2013, 23(2): 106-113.
- [10] 宿杰阿克苏,侯英勇,刘亚岚,等.PCR直接测序法与 ARMS 检测非小细胞肺癌 EGFR 基因突变[J].临床与实验病理学杂志,2014,30(3):328-332.
Sujie AKS, Hou YY, Liu YL, et al. PCR direct sequencing and ARMS detection of EGFR gene mutation in non small cell lung cancer[J]. Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2014, 30(3): 328-332.
- [11] 闵生萍.直接测序法与荧光定量 PCR 法检测非小细胞肺癌 EGFR 基因突变对比分析[J].淮海医药,2016,34(6):633-635.
Min SP. Comparison of direct sequencing and fluorescence quantitative PCR for GEFR mutations detection in non-small cell lung cancer[J]. J Huaihai Med, 2016, 34(6): 633-635.
- [12] Lacerra G, Musollino G, Di Noce F, et al. Genotyping for known Mediterranean alpha-thalassemia point mutations using a multiplex amplification refractory mutation system[J]. Haematologica, 2007, 92(2): 254-255.
- [13] Little S. Amplification-refractory mutation system (ARMS) analysis of point mutations[M]. Curr Protoc Hum Genet, 2001, Chapter 9:8-9.
- [14] 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.
- [15] Tanaka T, Matsuoka M, Sutani A, et al. Frequency of and variables associated with the EGFR mutation and its subtypes[J]. International Journal of Cancer, 2010, 126(3): 651-655.
- [16] 贺锐,李建民,王跃华,等. EGFR 基因突变与肺腺癌新分类及临床病理特征的关系[J].临床与实验病理学杂志,2013,29(12):1323-1328.
He R, Li JM, Wang YH et al. Correlation of epidermal growth factor receptor mutations with the new lung adenocarcinoma classification and their clinicopathological features[J]. Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2013, 29(12): 1323-1328.
- 收稿日期:2017-12-13 修回日期:2017-01-08
- (上接 41 页)
- Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2014, 14(5): 436-439.
- [5] 陈伟,刘文恩,李艳明,等.流感嗜血杆菌分布与耐药性分析[J].临床检验杂志,2013,31(6):469-471.
Chen W, Liu WE, Li YM, et al. Distribution and drug resistance of *Haemophilus influenzae* [J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2013, 31(6): 469-471.
- [6] 董方,王艳,刘锡青,等.2009~2015年北京儿童医院临床分离细菌的分布及耐药性监测[J].中国感染与化疗杂志,2017,17(1):61-70.
Dong F, Wang Y, Liu XQ, et al. Distribution and antimicrobial resistance profile of the clinical bacterial strains isolated from Beijing Children's Hospital from 2009 to 2015[J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2017, 17(1): 61-70.
- [7] 高雪,尚小领,张玉妥.流感嗜血杆菌自身因子在生物膜形成过程中的作用[J].天津医药,2015,43(3):330-333.
Gao X, Shang XL, Zhang YT. Role of *Haemophilus influenzae* factor in the process of biofilm formation [J]. Tianjin Medical Journal, 2015, 43(3): 330-333.
- [8] 王瑛,王东,郭治,等.阿奇霉素对气管导管内流感嗜血杆菌生物被膜的影响[J].重庆医学,2016,45(1):40-41,46.
Wang Y, Wang D, Guo Z, et al. Effects of azithromycin on the formation of nontypeable *haemophilus influenzae* biofilm on endotracheal tubes[J]. Chongqing Medicine, 2016, 45(1): 40-41, 46.
- [9] 田磊,张真,陈中举,等.某院流感嗜血杆菌耐药性及其对氨苄西林耐药机制[J].中国感染控制杂志,2015,14(2):73-76.
Tian L, Zhang Z, Chen ZJ, et al. Antimicrobial resistance and ampicillin resistance mechanism of *Haemophilus influenzae* from a hospital [J]. Chinese Journal of Infection Control, 2015, 14(2): 73-76.
- [10] 郑红艳,宋文琪,董方,等.儿童患者中分离 189 株卡他莫拉菌的分布和耐药性分析[J].中国感染与化疗杂志,2016,16(5):614-617.
Zheng HY, Song WQ, Dong F, et al. Distribution and antimicrobial resistance of 189 strains of *Moraxella catarrhalis* in children [J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2016, 16(5): 614-617.
- [11] 杨晓华,王桂兰,汪伟山,等.儿童呼吸道卡他莫拉菌感染状况及耐药性和耐药基因的研究[J].国外医药(抗生素分册),2017,38(2):72-75.
Yang XH, Wang GL, Wang WS, et al. Study on the infection status, drug resistance and drug resistance genes of *Moraxella catarrhalis* in children with respiratory tract infection [J]. World Notes on Antibiotics, 2017, 38(2): 72-75.
- [12] 陈芳.扶阳罐治疗反复呼吸道感染的疗效观察[J].湖北中医杂志,2014,36(5):37-38.
Chen F. Treatment of recurrent respiratory tract infection by Fuyang cup [J]. Hubei Journal of Traditional Chinese Medicine, 2014, 36(5): 37-38.
- 收稿日期:2017-12-23 修回日期:2018-02-23