

非小细胞肺癌患者不同类型样本中表皮生长因子受体基因突变的差异研究*

喻晶, 李运雷, 刘晓翌 (北京大学深圳医院检验科, 广东深圳 518036)

摘要:目的 检测 238 例非小细胞肺癌(NSCLC)患者不同类型样本中表皮生长因子受体(EGFR)基因的突变情况,探讨不同类型样本在 EGFR 基因突变中的应用价值。方法 采用扩增阻碍突变系统(ARMS)检测 238 例 NSCLC 中 EGFR 基因 18~21 外显子的突变情况,探讨不同样本类型、不同性别、不同年龄、不同病理分型和不同临床分期的 EGFR 突变频率的差异及临床意义。结果 238 例 NSCLC 患者 EGFR 总的突变率为 44.5%(106/238),其中组织、血浆和胸腔积液样本分别为 105 例,115 例和 18 例,其突变率分别为 52.4%(55/105),34.8%(40/115)和 61.1%(11/18),与组织样本相比,血浆样本的 EGFR 突变检出率明显低于组织样本,差异具有统计学意义($\chi^2=6.93, P<0.05$),但组织与胸腔积液样本相比其检出率差异无统计学意义($\chi^2=0.471, P>0.05$)。女性 NSCLC 患者的 EGFR 突变的检出率明显高于男性患者,差异有统计学意义(55.3% vs 36.3%, $\chi^2=8.58, P<0.01$)。>65 岁患者与≤65 岁患者的突变检出率差异无统计学意义(44.4% vs 44.6%, $\chi^2=0, P>0.05$)。肺腺癌的 EGFR 突变检出率明显高于其他类型的 NSCLC,差异有统计学意义(47.7% vs 29.3%, $\chi^2=4.68, P<0.05$)。临床 I~II 期患者的 EGFR 突变检出率与 III~IV 期的相比差异无统计学意义(35.0% vs 45.7%, $\chi^2=0.79, P>0.05$)。结论 组织样本 EGFR 基因突变的检出率与胸腔积液样本相比无统计学差异,但明显高于血浆样本,提示临床选择送检的样本类型时,可优先选择组织和胸腔积液样本。EGFR 基因突变的检出率与性别和肿瘤的病理类型相关。

关键词:表皮生长因子受体(EGFR)基因突变;不同类型样本;非小细胞肺癌;扩增阻碍突变系统(ARMS)

中图分类号:R734.2;R730.43 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2018)04-031-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2018.04.008

Detection of Epidermal Growth Factor Receptor Gene Mutation in Different Sample Types of 238 Patients with Non-small Cell Lung Cancer

YU Jing, LI Yun-lei, LIU Xiao-yi (Department of Laboratory Medicine, Beijing University Shenzhen Hospital, Guangdong Shenzhen 518036, China)

Abstract: Objective To detect the epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation in different types of samples of 238 patients with non-small cell lung cancer (NSCLC), and explore the clinical application value of the EGFR gene mutation in different types of samples. **Methods** Mutations in the exons 18-21 of EGFR gene in 238 patients with non-small cell lung cancer were detected by amplification refractory mutation system (ARMS), to investigate the frequency and clinical significance of EGFR mutation in different sample types, genders, ages, pathological types, and clinical stages. **Results** The total mutation rate of EGFR was 44.5% (106/238) in 238 patients with NSCLC. The number of tissue, plasma and pleural effusion samples were 105, 115 and 18, and the mutation rate was 52.4% (55/105), 34.8% (40/115), 61.1% (11/18) respectively. Compared with tissue sample, the mutation rate of plasma samples was significantly lower than that of tissue samples, the difference was statistically significant ($\chi^2=6.93, P<0.05$), but there was no statistical difference of mutation rate in pleural effusion samples compared with tissue samples ($\chi^2=0.471, P>0.05$). The EGFR mutations rate in female NSCLC patients was dramatically higher than that of male patients (55.3% vs 36.3%, $\chi^2=8.58, P<0.01$). No statistical difference of the mutation rate was found between patients >65 years old and ≤65 years old (44.4% vs 44.6%, $\chi^2=0, P>0.05$). The EGFR mutation rate in patients with lung adenocarcinoma was significantly higher than that of patients with other types of NSCLC (47.7% vs 29.3%, $\chi^2=4.68, P<0.05$). There was no statistical difference in the EGFR mutation rate between patients in clinical stage I-II and in stage III-IV (35.0% vs 45.7%, $\chi^2=0.79, P>0.05$). **Conclusion** The EGFR mutations rate in tissue samples had no significant difference from that of pleural effusion samples, but it was significantly higher than that of plasma samples. This suggests that tissue and pleural effusion samples could be the first choice for the clinical selection to be submitted for EGFR mutation detection. The EGFR mutation rate is related to gender and the pathological type of the lung tumor.

Keywords: epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation; different types of samples; non-small cell lung cancer (NSCLC); amplification refractory mutation system (ARMS)

肺癌是目前全球发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一,非小细胞肺癌(non-small cell lung

* 作者简介:喻晶(1967-),女,医学硕士,主任技师,主要从事临床分子生物学研究,E-mail:jing_yu2004@aliyun.com。

cancer, NSCLC)约占肺癌的85%,大部分NSCLC患者就诊时已是晚期,失去了手术治疗的机会^[1]。NSCLC中存在多个驱动基因,其中表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)基因是NSCLC分子靶向治疗最重要的靶点,EGFR酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKI)已成为治疗NSCLC的重要手段,而EGFR基因突变是EGFR-TKI疗效的预测指标^[2,3]。有EGFR基因突变的NSCLC患者在EGFR-TKI靶向治疗中不仅生存获益,且患者生活质量提高,不良反应小。目前肿瘤组织是EGFR突变检测的首选样本^[2],但对于晚期无法获得组织样本的NSCLC患者,只能采用其他类型的样本进行EGFR突变检测,本研究探讨不同类型样本在EGFR基因突变检测中的应用价值,为临床合理选择样本类型提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集2013年12月~2018年4月北京大学深圳医院238例非小细胞肺癌(NSCLC)门诊及住院患者的样本,其中组织样本105例,血浆样本115例,胸腔积液样本18例。男性135例,平均年龄为57.5岁;女性103例,平均年龄56.8岁。肺腺癌197例,其他非小细胞肺癌41例。根据病程分期,I和II期的NSCLC患者20例,III和IV期的患者127例。12例NSCLC患者同时提供组织和血浆样本,4例患者同时提供了胸腔积液和血浆标本。

1.2 试剂和仪器

1.2.1 试剂:人类EGFR基因突变检测试剂盒,石蜡组织(FFPE)核酸提取试剂,血浆游离DNA核酸提取试剂盒和胸腔积液核酸提取试剂盒均由厦门艾德生物医药科技有限公司提供。

1.2.2 仪器:ABI7500荧光定量扩增仪(美国ABI公司),Nanodrop 2000微量分光光度计(美国Nanodrop公司)。

1.3 方法

1.3.1 石蜡样本DNA提取:由病理医师确定肿瘤区域后,用一次性手术刀片刮取5~10 μm 石蜡切片5~10张到EP管中,按照FFPE核酸提取试剂盒的说明书提取DNA。

1.3.2 血浆游离DNA提取:用EDTA抗凝管采血5~6 ml,采用2次离心法分离血浆(2 000 r/min离心10 min,取上清,然后8 000 r/min离心10 min),分离的血浆样本不少于2 ml,按照血浆游离DNA提取试剂盒说明书提取DNA。

1.3.3 胸腔积液样本DNA提取:取胸腔积液样本40 ml,2 000 r/min离心10 min,弃上清,加入生理盐水吹打混匀,置于EP管中,13 000 r/min离心5 min,弃上清,按照胸腔积液核酸提取试剂盒提取DNA。

1.3.4 EGFR基因荧光扩增:提取的DNA通过Nanodrop微量分光光度计测定DNA浓度和质量,将DNA浓度稀释到1~3 ng/L,按照人类EGFR基因突变检测试剂盒说明书的程序扩增并分析结果。

1.4 统计学分析 应用SPSS分析软件,EGFR突变在不同样本类型、不同性别、不同年龄、不同病理分型、不同临床分期的差异比较采用卡方检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EGFR基因突变类型的分析 238例样本中,EGFR基因突变106例,突变率为44.5%,其中19号外显子的缺失突变(19del)62例(58.5%, 62/106),21号外显子的替代突变(L858R)36例(34.0%, 36/106),18号外显子的替代突变(G719X)4例(3.8%, 4/106),20号外显子的插入突变(20ins)3例(0.9%, 3/106)。

2.2 EGFR基因突变与临床特征的关系 见表1。

表1

EGFR突变与临床特征的关系

临床特征	n	野生型[n(%)]	突变型[n(%)]	χ^2	P
性别					
男	135	86(63.7)	49(36.3)	8.58	0.003
女	103	46(44.7)	57(55.3)		
年龄(岁)					
≤65	175	97(55.4)	78(44.6)	0	0.986
>65	63	35(55.6)	28(44.4)		
病理类型					
肺腺癌	197	103(52.3)	94(47.7)	4.68	0.031
其他	41	29(70.7)	12(29.3)		
临床分期					
I~II期	20	13(65.0)	7(35.0)	0.797	0.372
III~IV期	127	69(54.3)	58(45.7)		
样本类型					
组织	105	50(47.6)	55(52.4)	6.93	0.008
血浆	115	75(65.2)	40(34.8)		
胸腔积液	18	7(38.9)	11(61.1)		

女性 NSCLC 患者的 EGFR 突变率(55.3%),明显高于男性患者(36.3%),差异具有统计学意义($\chi^2=8.58, P<0.01$)。年龄 >65 岁的 NSCLC 患者 EGFR 突变率(44.4%),与 ≤ 65 岁患者(44.6%)相比差异无统计学意义($\chi^2=0, P>0.05$)。肺腺癌的 EGFR 突变检出率(47.7%)明显高于其他类型的 NSCLC(29.3%),差异具有统计学意义($\chi^2=4.68, P<0.05$)。临床 I~II 期患者的 EGFR 突变检出率(35.0%),与 III~IV 期(45.7%)相比差异无统计学意义($\chi^2=0.79, P>0.05$)。

2.3 不同类型样本 EGFR 突变分析 238 例样本中,石蜡组织、血浆和胸腔积液样本分别为 105 例,115 例和 18 例,其突变率分别为 52.4%,34.8%和 61.1%,与组织样本相比,血浆样本的 EGFR 突变检出率明显低于组织样本,差异具有统计学意义($\chi^2=6.93, P<0.05$),但组织与胸腔积液样本相比其检出率差异无统计学意义($\chi^2=0.471, P>0.05$)。见表 1。12 例组织和血浆配对样本中,二者结果一致的样本为 9 例,一致率为 75%(9/12),敏感度为 50%(2/4),特异度为 87.5%(7/8)。4 例胸腔积液与血浆配对的样本中,二者的一致率为 50%(2/4)。

3 讨论 EGFR 基因是肺癌生长的重要调控基因^[4],也是肺癌分子靶向治疗最重要的靶点,目前 EGFR 酪氨酸酶抑制剂(EGFR-TKI)是治疗 NSCLC 的主要方法,而 EGFR 基因的突变状态是 EGFR-TKI 疗效的重要预测因子^[2,3],检测 EGFR 基因突变可以筛查对靶向药物敏感的 NSCLC 患者,从而实现对病人的个体化靶向治疗,使患者受益。

肿瘤组织是 EGFR 检测的首选样本,但对于无法获得肿瘤组织的晚期 NSCLC 患者,只能采用其他类型的样本进行 EGFR 突变检测。本研究比较了组织、胸腔积液和血浆三种不同类型的样本中 EGFR 突变的检测情况,结果显示,组织和胸腔积液的 EGFR 突变检出率没有明显差异,与文献报道一致^[5],但是血浆的突变检出率明显低于组织,提示在组织样本无法获取的情况下,可优先选择胸腔积液样本。12 例血浆与组织配对的样本,血浆检测的敏感度、特异度和一致性分别为 50%,87.5%和 75%,与文献报道基本一致^[6],提示 ARMs 法检测血浆游离 DNA(cf DNA)中的 EGFR 突变,灵敏度不够高,如果检测结果为野生型,需要注意假阴性的可能,其原因可能与肿瘤细胞释放进入血液的 DNA 量少有关。尽管血浆检测的灵敏度低于组织,对于无法获得组织和胸腔积液样

本的病人,可以考虑采用检测血浆游离 DNA 中的 EGFR 突变,动态监测疗效,本研究中有 5 例病人使用靶向药物前后均检测了血浆 cfDNA 中的 EGFR 突变,1 例患者用药后出现了 T790M 耐药突变(由 19del 变为 19del+T790M 双突变),2 例由 19del 突变转为野生,还有 2 例突变状态保持不变。用药后,动态监测突变状态,有利于临床观察疗效和耐药情况,及时调整用药方案。

研究显示^[4],EGFR 基因突变主要发生在胞内酪氨酸激酶区的 18~21 外显子上,19 外显子缺失突变(19del)和 21 外显子的替代突变(L858R)是对 EGFR-TKI 治疗敏感的主要突变,20 外显子的插入突变和 T790M 突变是对一代 TKI 治疗耐药的突变,我们的研究显示 19del 突变率为 58.5%(62/106),21 号外显子的 L858R 突变率为 34.0%(36/106),EGFR 的敏感突变集中在 19 和 21 号外显子,与报道一致^[7]。

综上所述,临床可以根据肿瘤患者的实际情况选择合适的样本进行 EGFR 突变检测,首选样本是肿瘤组织,其次是胸腔积液,当组织和胸腔积液都无法获取时,可以采用血浆样本,但要注意血浆检测结果假阴性的可能。由于本研究组织和血浆,组织和胸腔积液的配对样本例数较少,存在偏倚,需要扩大样本量来进一步验证。

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] Reck M, Heigener DF, Mok T, et al. Management of non-small-cell lung cancer: recent developments [J]. Lancet, 2013, 382(9893):709-719.
- [3] 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.
- [4] Sharma SV, Bell DW, Settleman J, et al. Epidermal growth factor receptor mutation status in lung cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(3):169-181.
- [5] 禹乐, 朱启淦, 杨立民, 等. 胸水细胞块 EGFR 基因突变检测在非小细胞肺癌中的临床意义 [J]. 山西医科大学学报, 2017, 48(5):462-466.
Yu L, Zhu QG, Yang LM, et al. Clinical significance of EGFR gene mutation in pleural effusion cell blocks in non-small cell lung cancer [J]. Journal of Shanxi Medical University, 2017, 48(5):462-466.
- [6] Goto K, Ichinose Y, Ohe Y, et al. Epidermal growth factor receptor mutation status in circulating free DNA in serum: from IPASS, a phase III study of gefitinib or carboplatin/paclitaxel in non-small cell lung cancer [J]. J Thorac Oncol, 2012, 7(1):115-121.
- [7] Gao B, Sun Y, Zhang J, et al. Spectrum of LKBI, EGFR, and KRAS mutations in Chinese lung adenocarcinomas [J]. J Thorac Oncol, 2010, 5(8):1130-1135.

收稿日期:2018-05-05

修回日期:2018-06-12