

网络出版时间: 2017-7-29 12:01 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170729.1200.031.html>

ARMS 与 NGS 对比检测 NSCLC 患者标本 EGFR、KRAS、BRAF、EML4-ALK 融合等基因探索

何培景 夏淮玲 符萌 冷再君 操乐杰

摘要 目的 探讨突变扩增阻滞系统(ARMS)法和下一代测序(NGS)法检测非小细胞肺癌(NSCLC)患者标本多驱动基因改变上的差异,指导临床个体化治疗。方法 51例NSCLC患者标本首先采用ARMS法,对所有样本进行表皮生长因子受体(EGFR)、鼠类肉瘤病毒癌基因(KRAS)、鼠类肉瘤滤过性毒菌致癌基因同源体B1(BRAF)、棘皮动物微管相关类蛋白4-间变性淋巴瘤激酶(EML4-ALK)等基因检测,随后采用NGS对上述标本进行高通量检测对比,收集临床资料,定期随访。结果 51例NSCLC样本应用ARMS法与NGS检测EGFR、KRAS、EML4-ALK突变阳性率(48.9% vs 53.3%、11.1% vs 8.9%、13.7% vs 5.9%)差异无统计学意义。两种方法检测出的EGFR-49del突变组比EGFR-L858R突变组靶向治疗生存期较长,差异有统计学意义($P = 0.010$),但两组在性别、年龄、靶向治疗阶段等方面差异无统

计学意义。NGS法检测出EGFR-49del、L858R突变患者肿瘤特有基因平均数量分别为7.1、4.6个,EGFR-L858R多为抑癌基因突变(91%)。2例EGFR/KRAS双突变患者较EGFR单突变患者预后差。结论 ARMS法和NGS均适用于NSCLC患者突变驱动基因检测。对于DNA点突变检测,NGS不仅显示ARMS检测的遗漏,还显示突变丰度、伴随突变及非常规突变等,对ARMS检测有补充作用。EGFR-49del患者靶向治疗生存期比EGFR-L858R突变患者长,EGFR-L858R主要为抑癌基因突变。EGFR合并KRAS双突变患者预后较差,但仍需进一步研究证实。

关键词 基因突变;非小细胞肺癌;ARMS;NGS

中图分类号 R 394.112

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)10-1553-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.10.031

2017-04-05 接收

基金项目:安徽省卫生厅医学科研课题计划项目(编号:13zc001);安徽省科技攻关计划项目(编号:1301042216)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院呼吸内科,合肥 230001

作者简介:何培景,男,硕士研究生;

操乐杰,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: sycaolejie@163.com

原发性支气管肺癌是全球最常见的恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率均呈上升态势^[1],而非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)是肺癌最常见类型,约占肺癌总发病率80%~85%,并且绝大多数NSCLC患者确诊时处于中、晚期(ⅢB、Ⅳ期),丧失了手术机会,需要内科治疗^[2]。经典的以

Study on childhood psychological trauma impact on the emotion regulation and alexithymia of patients with depression

Wang Xue, Zhang Lei, Wang Kai, et al

(Dept of Medical Psychology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the childhood psychological trauma impact on the relationship among emotion regulation and alexithymia of patients with depression. **Methods** 78 patients with depression and 80 healthy controls matched for age, gender and education were recruited. Use ERQ, TAS-20 and CQT-SF to measure patients with depression and healthy. **Results** ① Compared to controls, depression showed significantly lower in factors of emotion reappraisal ($P < 0.01$), higher scores in total and F1, F2, F3 ($P < 0.01$), significantly higher in factors of emotion abuse, emotion neglect, physical neglect ($P < 0.01$, $P < 0.05$); ② In depression group, emotion reappraisal had high negative correlation with emotion neglect and sexual abuse ($P < 0.05$). TAS-20 total scores showed high positive correlation with emotion abuse and sexual abuse ($P < 0.05$, $P < 0.01$), F3 scores showed high positive correlation with sexual abuse ($P < 0.01$). **Conclusion** Depressive patients show emotional regulation disorder and alexithymia is correlated with child psychological trauma.

Key words depression; child psychological trauma; emotional regulation; alexithymia

铂类为基础的二联化疗方案是治疗的基石,其疗效有限且其副反应大,影响肺癌患者的生活质量。近年来,通过对表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、棘皮动物微管相关类蛋白4-间变性淋巴瘤激酶(echinodem microtubule associated protein like 4-anaplastic lymphoma kinase, EML4-ALK)、c-ros 原癌基因(c-ros oncogene 1, ROS1)等相关信号通路的研究及安全性探索,证实了 EGFR-TKI、ALK-TKI、ROS1-TKI 在相应基因突变患者中具有疗效好、副作用小的优点,是目前精准医疗的优势所在。但在临床实践中显示,携带 EGFR、ALK 等基因突变的 NSCLC 患者予以靶向治疗疗效仍然存在差别,少部分(20%~30%)疗效不如意,因此对晚期 NSCLC 患者基因突变谱进行准确性及全面性评价十分重要。目前可以用于肺癌基因突变检测的方法发展的很快,如突变扩增阻滞系统(amplification refractory mutation system, ARMS)法、下一代测序(next generation sequencing, NGS)等,究竟如何选择检测方法非常重要,需要对各种检测手段进行对比研究。该研究主要探讨 ARMS 法及 NGS 法在检测晚期 NSCLC 基因突变上的差异,为 NSCLC 患者个体化治疗的开展提供依据。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集整理 2013 年 2 月~2015 年 9 月安徽省立医院的 51 例 NSCLC 患者的 DNA 标本 43 份,蜡块标本 15 份(部分患者有多份样本)。对于 DNA 标本,使用紫外分光光度计测定,保证光密度(optical density, OD)值, OD_{260}/OD_{280} 在 1.8~2.0, 保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境下。对于蜡块标本,每例病理标本组织学诊断均由两位病理科医师重新复核,确定肿瘤百分比在 10% 以上。

1.2 主要试剂 福尔马林固定石蜡包埋组织(formalin-fixed and paraffin-embedded, FFPE)样品 RNA/DNA 共分离提取试剂盒、人类 EML4-ALK 融合基因检测试剂盒及人类 EGFR 基因 21 种突变检测试剂盒、人类 KRAS 基因 7 种突变检测试剂盒、人类 BRAF 基因 V600E 突变检测试剂盒,均购自厦门艾德公司; NGS 测序平台 Illumina Hiseq 4000 及 NGS 基因检测相关试剂由南京世和基因公司提供。

1.3 方法

1.3.1 ARMs-PCR 法 所有的 NSCLC 患者样本首先使用 FFPE 样品 RNA/DNA 共分离试剂盒提取组织的 RNA 和 DNA, RNA 经逆转录形成单链 cDNA,

使用 EML4-ALK 融合基因检测试剂盒进行 RT-PCR 检测。对提取的 DNA 使用相应的试剂盒进行 EGFR、KRAS、BRAF 基因 ARMs-PCR 检测,具体操作步骤严格按试剂盒说明书进行。并使用 Applied Biosystems 7500 real-time PCR 扩增系统(美国应用生物公司)进行 RT-PCR 检测。

1.3.2 NGS 法 采用 QIAamp DNA FFPE Tissue 提取试剂盒提取 FFPE 样本的基因组 DNA,操作严格按照说明书进行。DNA 样品满足 OD_{260}/OD_{280} 为 1.8 ± 0.2 , $OD_{260}/OD_{230} \geq 1.7$, 浓度 $\geq 10\text{ ng}/\mu\text{l}$, 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 贮存至使用。采用 Illumina TruSeq 试剂盒构建 DNA 测序文库,并采用特定的探针捕获目标 DNA 片段,然后采用 Illumina Hiseq 4000 测序平台进行测序,读长为 PE150,测序深度 $>500\times$,将得到的原始数据进行过滤并生物信息学分析。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 21.0 软件进行分析。应用 χ^2 检验对计数资料进行分析,应用 Kaplan-Meier 曲线进行生存分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

入组 51 例 NSCLC 患者标本,其中手术切除肿瘤标本 9 例,纤维支气管镜活检标本、经皮肺穿刺标本、胸水沉渣包埋标本、淋巴结活检标本等小标本 42 例。其中女 62.7% (32/51),男 37.3% (19/51),年龄 26~73 岁,中位年龄为 63 岁。51 例 NSCLC 患者病理类型以腺癌为主占 98% (50/51),另外 1 例为鳞癌。临床分期,IV 期 51% (26/51),III 期 39.2% (20/51),I 期 9.8% (5/51)。其中非吸烟患者居多占 68.6% (35/51),吸烟者仅占 31.4% (16/51)。

2.1 ARMs 和 NGS 法驱动基因检出阳性率比较 本研究应用 ARMs 法与 NGS 检测 EGFR 突变阳性率分别为 49.0% (25/51) 和 51.0% (26/51),两种方法在组间差异无统计学意义。在 19del 与 L858R 敏感突变两种检测方法的一致性分别为 94.1%、92.2%,特异性分别为 94.7%、94.9%,提示两种方法在 19del 与 L858R 敏感突变检测上均很可靠(表 1、2)。

由于 7 例患者 DNA 标本较少,未能行 KRAS 检测,故剔除。ARMs 法与 NGS 检测 KRAS 突变阳性率分别为 11.4% (5/44) 和 9.1% (4/44),两者差异无统计学意义。两者的一致性高达 97.7%,特异性为 100%,提示两种方法在点突变检测上均非常可

靠(表3)。1例黏液腺癌(T2aN0M0, I b期)患者的术后组织标本,两种方法均检测出 BRAF 阳性,显示两者一致性极好。NGS 同时显示其丰度为 51.7%,目前患者生存良好。

ARMS 法与 NGS 检测 ALK 融合基因阳性检出率在 ARMS 法为 13.7%(7/51)、5.9%(3/51),差异无统计学意义。NGS 明显在检测 ALK 基因重排方面敏感性为 42.9% 偏低,但其特异性为 100% 较好(表4)。

表1 两种方法检测 19del 突变结果比较(n)

| EGFR-19del | NGS 法 | | 总数 | P 值 |
|------------|-------|----|----|-------|
| | 阳性 | 阴性 | | |
| ARMS 法 阳性 | 12 | 1 | 13 | 1.000 |
| 阴性 | 2 | 36 | 38 | |
| 总数 | 14 | 37 | 51 | |

表2 两种方法检测 L858R 突变结果比较(n)

| EGFR-L858R | NGS 法 | | 总数 | P 值 |
|------------|-------|----|----|-------|
| | 阳性 | 阴性 | | |
| ARMS 法 阳性 | 10 | 2 | 12 | 1.000 |
| 阴性 | 2 | 37 | 39 | |
| 总数 | 12 | 39 | 51 | |

表3 两种方法检测 KRAS 突变结果比较(n)

| KRAS | NGS 法 | | 总数 | P 值 |
|-----------|-------|----|----|-------|
| | 阳性 | 阴性 | | |
| ARMS 法 阳性 | 4 | 1 | 5 | 1.000 |
| 阴性 | 0 | 39 | 39 | |
| 总数 | 4 | 40 | 44 | |

表4 两种方法检测 ALK 基因重排结果比较(n)

| ALK | NGS 法 | | 总数 | P 值 |
|-----------|-------|----|----|-------|
| | 阳性 | 阴性 | | |
| ARMS 法 阳性 | 3 | 4 | 7 | 0.125 |
| 阴性 | 0 | 44 | 44 | |
| 总数 | 3 | 48 | 51 | |

2.2 ARMS 和 NGS 法驱动基因突变检测不一致情况 ARMS 和 NGS 法检测结果不一致患者共 13 例,其中 4 例为 EGFR 突变 ARMS 法检测为阴性而 NGS 检测为阳性,这 4 例标本中包括敏感突变及稀有突变各 2 例,稀有突变不在 ARMS 试剂盒检测位点中,但随后的 TKI 治疗有效,提示 ARMS 法针对少许敏感及稀有突变存在漏检(表5)。

两者检测 EGFR 阳性患者也有 4 例检测结果不一致情况,2 例 ARMS 检出 EGFR-L858R 阳性患者,NGS 在 1 例患者标本未检出突变,另外 1 例检出的是 19del 突变,丰度达 48.8%。前者,易瑞沙治疗效

表5 ARMS 和 NGS 法检测结果不一致患者检测结果汇总

| 编号 | NGS | ARMS | 对照 | 突变 | 总碱 | 突变 |
|----|-----------------|---------|------------|-----|------|-------|
| | | | 碱基数 | 碱基数 | 基数 | 丰度(%) |
| 1 | 19DEL | WT | 260 | 144 | 404 | 35.6 |
| 2 | 19DEL | 20INS | 1 | 4 | 5 | 80.0 |
| 3 | 19DEL | L858R | 818 | 630 | 1448 | 43.5 |
| 4 | L747S | 19DEL | 341 | 298 | 639 | 46.6 |
| 5 | L858R | WT | 288 | 68 | 356 | 19.1 |
| 6 | L858R | S768L | 155 | 3 | 158 | 1.9 |
| 7 | D770G | WT | 3 | 2 | 5 | 40.0 |
| 8 | Q820K D984N | ALK 阳性 | 28 | 4 | 32 | 12.5 |
| 9 | KRAS Q61H | WT | 15 | 3 | 18 | 16.7 |
| 10 | MET 14 splicing | ALK 阳性 | 293 | 306 | 599 | 51.1 |
| 11 | ERBB2 20ins | KRAS 阳性 | 288 | 49 | 337 | 14.5 |
| 12 | WT | ALK 阳性 | 平均测序深度 336 | | | |
| 13 | WT | ALK 阳性 | 平均测序深度 503 | | | |

果极差,3 个月病情明显进展提示可能存在 ARMS 检测假阳性可能。后者为肺腺癌术后患者,已经进展,易瑞沙靶向治疗效果很好。1 例检出 19del 患者,NGS 检出为 L747S 少见突变,靶向治疗效果良好。还有 1 例 ARMS 检测为 20ins 插入突变,NGS 显示为 19del。

5 例 KRAS 突变阳性患者存在 1 例两者结果不一致情况,ARMS 检测为 KRAS 突变阳性,而 NGS 提示 ERBB2 点突变,此例患者为早期肺癌术后患者,目前存活良好,继续随访中。

7 例 ALK 融合基因阳性患者中有 4 例检测结果不一致情况,不一致率为 57%,其中采用 ARMS 检测出 ALK 融合阳性的 2 例患者采用 NGS 法 1 例 NGS 法检出 MET 14 splicing,1 例检出 Q820K 及 D984N 基因突变,均超出 ARMS 法检测范围。说明 NGS 法针对 ALK 融合检测存在漏检问题,但在罕见 EGFR 突变及 MET14 外显子跳读的检测方面存在独特优势。

2.3 ARMS 和 NGS 法检测结果一致的患者预后分析

2.3.1 生存期及分层预后比较 ARMS 和 NGS 法检测结果一致的靶向治疗患者共有 26 例,全部随访,其中 EGFR19 外显子突变 11 例,EGFR21 外显子突变为 10 例,稀有突变为 2 例, KRAS 突变、ALK 突变、全阴性各 1 例。将 EGFR 突变分为 19 外显子突变组和 21 外显子突变组,19 外显子突变组患者总平均生存时间为 29.4 个月,而 20 外显子突变组患者总平均生存时间为 20.2 个月,两者无进展生存期、总生存期差异有统计学意义($P=0.010,0.031$ 图 1)。

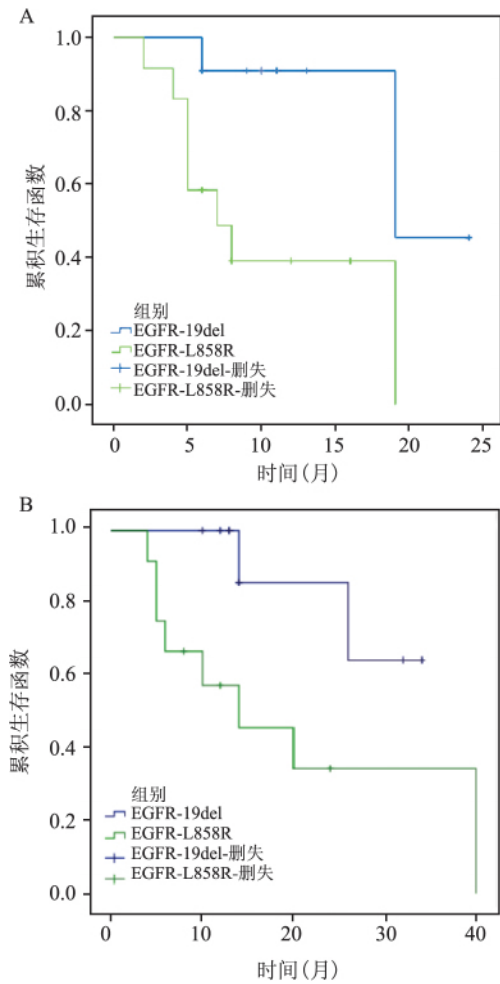


图1 EGFR 19del 与 L858R 突变患者靶向治疗生存函数
A: 无进展生存期; B: 总生存期

对性别、年龄、靶向治疗阶段等方面进行分层对比分析 19 外显子突变组和 21 外显子突变组预后情况 在对性别进行分层分析显示 ,男女患者 19 及 21 外显子突变组预后差异无统计学意义 ,但男性患者 19 外显子突变预后较好。对靶向治疗阶段进行分层分析显示 ,无论一线靶向治疗还是二线靶向治疗 , 19 外显子突变预后均较好 ,但差异无统计学意义。根据中位年龄 ,将突变组分为 < 63 岁组和 ≥ 63 岁组 ,无论哪段年龄组 ,19 外显子突变患者相对较好 ,但差异无统计学意义。

2.3.2 EGFR 合并 KRAS 突变预后比较 在 ARMS 和 NGS 法检测结果一致的靶向治疗患者中 ,NGS 还显示 EGFR-L858R 伴随低丰度 KRAS 突变 2 例 ,OS 分别为 5、6 个月 ,远低于 EGFR-L858R 总平均生存时间。

2.4 NGS 法检测 EGFR 突变位点分析 在 EGFR 突变患者 25 例中 ,14 例 EGFR-19del 阳性患者 NGS 可以测出平均每个患者肿瘤特有基因数量为 7.1 个 ,多为下游基因突变(50%) ; 11 例 EGFR-L858R 阳性患者同样 NGS 可以测出平均每个患者肿瘤特有基因数量为 4.6 个 ,多为抑癌基因突变(91%) (表 6) 。

3 讨论

ARMS 法已广泛用于晚期 NSCLC 患者突变驱动基因检测中 ,其检测结果可靠 ,与随后的疗效产生

表 6 EGFR 19del 与 L858R 突变患者肿瘤特有基因数量存在不同

| EGFR-19del 编号 | 突变数量 | EGFR 其他位点 | 下游 | 旁路 | 抑癌 | EGFR-L858R 编号 | 突变数量 | EGFR 其他位点 | 下游 | 旁路 | 抑癌 |
|---------------|------|-----------|-----|-----|-----|---------------|------|-----------|-----|----|-----|
| 1 | 6 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 4 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 2 | 8 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 7 | 0 | 1 | 0 | 1 | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 4 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 6 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 5 | 6 | 1 | 0 | 0 | 1 | 5 | 4 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 6 | 3 | 0 | 1 | 0 | 0 | 6 | 3 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 7 | 9 | 0 | 0 | 0 | 1 | 7 | 5 | 0 | 2 | 0 | 1 |
| 8 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 3 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 9 | 8 | 0 | 1 | 1 | 0 | 9 | 6 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 10 | 7 | 1 | 1 | 1 | 1 | 10 | 11 | 0 | 1 | 2 | 1 |
| 11 | 16 | 0 | 2 | 0 | 0 | 11 | 4 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 12 | 12 | 0 | 2 | 0 | 0 | | | | | | |
| 13 | 6 | 0 | 1 | 0 | 1 | | | | | | |
| 14 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | |
| 伴随率 | 7.1 | 14% | 50% | 29% | 36% | | 4.6 | 18% | 18% | 9% | 91% |

一致性结果,广泛在临床应用^[3-4]。NGS是新近应用于临床检测的技术,其海量分析及高灵敏度引起广泛重视^[5],其临床应用价值需要对比研究来证实。为此,本研究针对51例NSCLC标本应用ARMS法与NGS法进行检测和比较,为临床应用时进行合理选择提供依据。

针对两种检测方法的研究也有多篇报道,Yu et al^[6]应用ARMS-PCR和NGS对比检测晚期肺癌患者EGFR突变的一致性及灵敏性,研究应用Illumina测序平台检测24例肺癌患者病理样本的EGFR基因突变情况,并与ARMS-PCR检测结果进行对比。结果提示Illumina测序平台技术参数稳定,其检测结果与ARMS-PCR完全相同,这提示NGS在临床应用具有较好前景。

尽管ARMS与NGS检测DNA点突变的一致性、特异性均很高,但ARMS法检测EGFR突变仍有少许遗漏,随后的EGFR-TKI治疗亦证实ARMS漏检而NGS检出EGFR阳性患者予以相应TKI治疗有效,说明NGS能很好地弥补其不足,需要引起重视。对于KRAS的检测,ARMS法检出5例KRAS突变阳性,NGS法检出4例KRAS突变阳性。存在1例不一致的情况,ARMS法结果为KRAS突变阳性,NGS法结果为ERBB2,这提示即使对于易于检测的点突变各种方法之间仍然有相互补充的作用^[5]。

两种方法检测7例ALK融合样本,存在4例检测结果不一致,其中2例ARMS法检测出ALK融合,但NGS法未检测出任何驱动基因异常,而依据ARMS结果给予克唑替尼治疗有效。另外2例采用NGS法1例检出MET 14 splicing,1例检测出Q820K及G2950A突变,均超出ARMS检测范围。说明在ALK融合的检测方面NGS法检测存在漏检现象,但NGS法对于发现罕见EGFR突变及MET异常存在独特优势^[7]。

分析不同突变组靶向治疗无进展生存期、总生存期,并对性别、年龄、靶向治疗阶段等相关参数进行分层对比,显示EGFR-19外显子突变组较EGFR-21外显子突变组靶向治疗无进展生存期(progression-free survival, PFS)和总生存期(overall survival, OS)明显延长,差异有统计学意义。两者在性别、年龄、靶向治疗阶段等方面差异无统计学意义。国外文献^[8-9]报道19外显子突变患者靶向治疗生存期(PFS及OS)明显较21外显子突变患者更长,但两者在种族、性别、吸烟等方面差异无统计学意义的结

论一致。虽然通过NGS测出EGFR-19del阳性患者的平均肿瘤特有基因数量多于EGFR-L858R阳性患者,但后者主要为抑癌基因p53突变,与文献^[10]报道p53基因突变影响EGFR突变患者靶向治疗疗效及长期生存一致。

两种方案检测一致患者中,EGFR/KRAS双突变患者较单纯EGFR突变患者预后明显缩短,机制可能为KRAS突变引起EGFR下游信号转导通路持续性激活,导致EGFR-TKI原发性耐药,其治疗有效率不足3%,远低于检测阴性患者^[11-12]。但有研究^[13-14]报道,EGFR/KRAS双突变患者予以靶向EGFR-TKI治疗后,病情可以达到有效缓解。关于EGFR/KRAS双突变患者预后情况,还需进一步研究证实。

ARMS-PCR检测,利用其特异性探针仅识别并扩增突变序列,较少受到肿瘤组织中混杂成分的干扰,灵敏性较高,肿瘤突变含量低至1%也能检出,价格低廉,因此活检小标本常选用ARMS法^[15],但其不能检出稀有突变,假阴性依然会发生。NGS法不仅可以显示上下游基因改变信息,同时可以检测出未知基因,覆盖面广,尤其是可以显示EGFR-TKI治疗后的耐药分子机制,可以弥补ARMS的不足,是未来发展的方向。

参考文献

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2012, 62(1): 10-29.
- [2] Yang P, Allen M S, Aubry M C, et al. Clinical features of 5,628 primary lung cancer patients: experience at Mayo Clinic from 1997 to 2003 [J]. *Chest*, 2005, 128(1): 452-62.
- [3] Wei W E, Mao N Q, Ning S F, et al. An analysis of EGFR mutations among 1506 cases of non-small cell lung cancer patients in Guangxi, China [J]. *PLoS One*, 2016, 11(12): e0168795.
- [4] Duan H, Lu J, Lu T, et al. Comparison of EGFR mutation status between plasma and tumor tissue in non-small cell lung cancer using the Scorpion ARMS method and the possible prognostic significance of plasma EGFR mutation status [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(10): 13136-45.
- [5] Jin Y, Shao Y, Shi X, et al. Mutational profiling of non-small-cell lung cancer patients resistant to first-generation EGFR tyrosine kinase inhibitors using next generation sequencing [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(38): 61755-63.
- [6] Yu J Y, Yu S F, Wang S H, et al. Clinical outcomes of EGFR-TKI treatment and genetic heterogeneity in lung adenocarcinoma patients with EGFR mutations on exons 19 and 21 [J]. *Chin J Cancer*, 2016, 35: 30.
- [7] Liu S Y, Gou L Y, Li A N, et al. The unique characteristics of

- MET exon 14 mutation in Chinese patients with NSCLC [J]. *J Thorac Oncol*, 2016, 11(9): 1503–10.
- [8] Riely G J, Pao W, Pham D, et al. Clinical course of patients with non-small cell lung cancer and epidermal growth factor receptor exon 19 and exon 21 mutations treated with gefitinib or erlotinib [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(3 Pt 1): 839–44.
- [9] Jackman D M, Yeap B Y, Sequist L V, et al. Exon 19 deletion mutations of epidermal growth factor receptor are associated with prolonged survival in non-small cell lung cancer patients treated with gefitinib or erlotinib [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(13): 3908–14.
- [10] Canale M, Petracci E, Delmonte A, et al. Impact of TP53 mutations on outcome in EGFR-mutated patients treated with first-line tyrosine kinase inhibitors [J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 23(9): 2195–202.
- [11] Kim E Y, Cho E N, Park H S, et al. Compound EGFR mutation is frequently detected with co-mutations of actionable genes and associated with poor clinical outcome in lung adenocarcinoma [J]. *Cancer Biol Ther*, 2016, 17(3): 237–45.
- [12] Meng D, Yuan M, Li X, et al. Prognostic value of K-RAS mutations in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review with metaanalysis [J]. *Lung Cancer*, 2013, 81(1): 1–10.
- [13] Benesova L, Minarik M, Jancarikova D, et al. Multiplicity of EGFR and KRAS mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients treated with tyrosine kinase inhibitors [J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(5): 1667–71.
- [14] Choughule A, Sharma R, Trivedi V, et al. Coexistence of KRAS mutation with mutant but not wild-type EGFR predicts response to tyrosine-kinase inhibitors in human lung cancer [J]. *Br J Cancer*, 2014, 111(11): 2203–4.
- [15] 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): 106–13.

Detection of EGFR, KRAS, BRAF, EML4-ALK fusion genes by ARMS and NGS in patients with non-small cell lung cancer

He Peijing, Xia Huailing, Fu Meng et al

(Dept of Respiratory Medicine, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To explore the difference of the driving genes in non-small cell lung cancer patients by amplification refractory mutation system (ARMS) and next generation sequencing (NGS) and guide the development of clinical individualized treatment. **Methods** Firstly, ARMS method was used to detect epidermal growth factor receptor (EGFR), Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS), V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1 (BRAF) and echinoderm microtubule associated protein like 4-anaplastic lymphoma kinase (EML4-ALK) in 51 patients with non-small cell lung cancer, then NGS was used for high throughput detection of these specimens. Finally, clinical data were collected and followed up regularly. **Results** The positive rates of EGFR, KRAS and EML4-ALK in 51 cases of non-small cell lung cancer were detected by ARMS and NGS, respectively, 48.9% vs 53.3%, 11.1% vs 8.9%, 13.7% vs 5.9%, no statistical difference between two methods. The survival time of targeted therapy of EGFR-L858R mutation group was longer than that of EGFR-L858R mutation group, the difference was statistically significant ($P=0.010$), but there was no significant difference in gender, age and target treatment stage. By NGS method, the average number of tumor specific genes in patients with EGFR-L858R and L858R was 7.1 and 4.6, respectively. However, EGFR-L858R had more tumor suppressor gene mutation (91%). The prognosis of 2 patients with EGFR/KRAS double mutation was worse than that of EGFR single mutation. **Conclusion** ARMS and NGS are suitable for driving gene detection in patients with non-small cell lung cancer. For the detection of DNA point mutation, NGS not only can detect the omission of ARMS method, also shows the mutation abundance, concomitant mutations and unconventional mutations, have complementary effect on ARMS method. The survival time of target therapy of EGFR-L858R patients detected by the two methods is significantly longer than that of patients with EGFR-L858R mutation, and EGFR-L858R is mainly the mutation of tumor suppressor gene. EGFR combined with KRAS double mutation has a poor prognosis, but still need further study confirmed.

Key words gene mutation; non-small cell lung cancer; ARMS; NGS