

多途径标本检测 aNSCLC 患者 EGFR 基因突变

冷再君¹ 徐 傲² 徐修才³ 徐 飞¹ 伍 权³ 操乐杰¹

摘要 目的 多途径标本检测进展期非小细胞肺癌(aNSCLC)患者表皮生长因子受体(EGFR)突变,及突变状态与患者临床病理学特征、标本来源及血清癌胚抗原(CEA)的关系。方法 收集 aNSCLC 患者组织、细胞学及血浆标本,采用 QIAGEN 公司新推出的 QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit 提取血浆循环游离 DNA(cfDNA),使用蝎形探针扩增阻滞突变系统(sARMS)对提取 DNA 进行 EGFR 突变检测。结果 103 例 aNSCLC 患者组织(或细胞)学标本检测 EGFR 突变率为 48.5%(50/103),与吸烟史、病理类型相关($P < 0.05$);与性别、年龄、身体状态评分、分期、血清 CEA 值无关;转移灶组突变率(58.6%)较原发灶组(35.6%)高,含有恶性胸腔积液(MPE)患者 EGFR 突变率(67.5%)较无 MPE 者(36.5%)高($P < 0.05$);29 例血浆与组织(或细胞)学标本配对检测中,血浆阳性率为 37.9%(11/29),敏感性为 43.7%(7/16),特异性为 69.2%(9/13)。结论 aNSCLC 患者 EGFR 突变在非吸烟、腺癌人群中高发,与性别、年龄、血 CEA、分期、身体状态无关。转移灶 EGFR 突变率较原发灶

高,并发 MPE 患者 EGFR 突变率较无 MPE 者高。使用 QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit 提取血浆 cfDNA 检测 EGFR 突变敏感性尚可,如降低成本,可作为组织标本的补充。由于肿瘤异质性的存在,应尽可能获取不同部位的肿瘤组织用于检测。

关键词 非小细胞肺癌;表皮生长因子受体;血浆

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)09-1320-05

表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, EGFR-TKI)如吉非替尼、厄罗替尼,已用于进展期非小细胞肺癌(advanced non-small cell lung cancer, aNSCLC)患者治疗^[1]。而 EGFR 基因突变阳性已公认成为 EGFR-TKI 疗效的预测指标。美国国家综合癌症网络(NCCN)中国版(V. 3. 2011)推荐:除了腺癌、大细胞癌和未分类的 NSCLC 患者,鳞癌也均需进行 EGFR 基因突变检测。该研究旨在关注取材方便的外周血循环游离 DNA(cell-free DNA, cfDNA)用于 EGFR 突变检测的实用性及 EGFR 基因突变状态与患者临床、病理特征、标本来源、血清癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)的关系。研究采用 aNSCLC 患者组织(或细胞)学标本与血浆配对的方法验证外周血 cfDNA 用于 EGFR 突变检测的可靠

2013-12-30 接收

基金项目:安徽省卫生厅医学科研课题计划(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¹呼吸内科、²病理科、³中心实验室,合肥 230001

作者简介:冷再君,女,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

was extracted. The genetic polymorphism of SOD3 genes was determined by ligase detection reaction and polymerase chain reaction (LDR-PCR) and serum SOD3 concentration was measured using ELISA. Lung function between the two groups before and after intervention were detected by microspirometry. **Results** ①The FEV1% and the FEV1/FVC% were increased after 3 and 6 months intervention in smoking cessation group($P < 0.05$). But there was no significant difference ($P < 0.05$) between 3 and 6 months. ② Different SOD3 genotypes have no significant on COPD pulmonary function after intervention($P > 0.05$). ③ The serum of SOD3 concentration of COPD intervention group and the control have no significance after intervention($P > 0.05$). ④ The serum of SOD3 concentration about CC and CG/GG genotype in COPD intervention group have no significance after 3 and 6 months intervention ($P > 0.05$). **Conclusion** Smoking cessation interventions for patients with COPD pulmonary function improves significance in short-term. But different SOD3 genotypes have no effect on lung function after intervention. Smoking cessation intervention has no effect on in serum SOD3 concentration of COPD patients, and has no relationship between the expression of SOD3 genotype.

Key words chronic obstructive pulmonary disease; genetic polymorphism; superoxide dismutase; lung function; FEV1/FVC%

性。cfDNA 在外周血中浓度低、片段短、肿瘤来源 cfDNA 量少,该研究采用 QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit 用于血浆 cfDNA 的提取,采用蝎形探针扩增阻滞突变系统(scorpion-shaped probe amplification refractory mutation system,sARMS)用于 EGFR 突变检测。

1 材料与方法

1.1 标本来源 收集安徽省立医院南区 2011 年 10 月 1 日~2013 年 10 月 1 日的 aNSCLC 患者肿瘤组织标本 63 例、恶性胸腔积液标本(malignant pleural effusion,MPE)40 例、血浆标本 29 例。63 例组织学标本包括手术切除标本 8 例、气管镜活检 31 例、肺穿刺活检 6 例、锁骨上转移淋巴结活检 14 例、骨转移活检 2 例、皮下转移包块活检 2 例。29 例血浆标本均含有组织或细胞学标本与之配对。患者标本采集前均未接受化疗、放疗或其他抗癌治疗。103 例 aNSCLC 患者中,男 59 例,女 44 例;年龄 28~84 (62±12)岁,≤62 岁 49 例,>62 岁 54 例;吸烟 51 例,不吸烟 52 例;腺癌 90 例,鳞癌 11 例,腺鳞癌 1 例,低分化癌 1 例;Ⅲ期 12 例,Ⅳ期 84 例;血清 CEA 值正常 60 例,升高 43 例。

1.2 主要试剂 QIAamp DNA FFPE Tissue Kit 购自德国凯捷公司(适用 FFPE 标本及新鲜冰冻标本)、QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen)(适用血浆)及 ADx-ARMS kit 购自厦门艾德公司(检测 NSCLC 患者 EGFR 基因常见的 21 种突变)。

1.3 标本处理 血浆:采集外周血 4~6 ml,4 h 内分离,3 000 r/min 离心 10 min,上层血浆分装冻存 -80℃。恶性胸腔积液:收集 50~400 ml,4 h 内分离,2 000 r/min 离心 10 min,倒去上清液,将 1 ml 沉渣吹打均匀后取少量沉渣涂片余冻存 -80℃,涂片自然干燥后行苏木精-伊红染色,光学显微镜下经病理科医师证实含有癌细胞。石蜡标本:经病理证实肿瘤细胞含量≥10%,使用一次性刀片连续切取石蜡包埋组织 5 μm 厚,共 8~10 张,使用二甲苯脱蜡、无水乙醇置换二甲苯、金属浴 40℃ 10 min 蒸干无水乙醇。

1.4 DNA 的提取 FFPE 及胸水标本应用 QIAamp DNA FFPE Tissue Kit 提取 DNA,血浆标本应用 QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit 提取 cfDNA。后使用 SMA4000 超微量紫外分光光度计(AmoyDx 北京仪器有限公司)对 DNA 进行浓度测定。

1.5 EGFR 基因突变检测 根据人类 EGFR 基因

21 种突变检测试剂盒(厦门艾德生物医药科技有限公司)说明书进行操作,并使用 Applied Biosystems 7500 实时 PCR 及操作系统(美国应用生物系统公司)行 RT-PCR。

1.6 评判标准 在此次临床试验中,对于非吸烟的患者定义为吸烟总数<400 支/年,血清 CEA 正常值按照我院检验科标准定义为 0~10 ng/ml。肺癌的病理分型依据最新分类标准(IASLC,ATS,ERS 2011)根据国际联盟对癌症转移的定义标准鉴别肿瘤的分期。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。EGFR 突变状态与临床病理特征的关系采用 2×2 列联表 χ^2 检验。不同组别血浆标本 cfDNA 浓度不符合正态分布,采用 $M[P_{25}, P_{75}]$ 表示,使用两独立样本非参数秩和检验。

2 结果

2.1 EGFR 突变与临床、病理特征及标本类型的关系 103 例 aNSCLC 患者 EGFR 突变率为 48.5% (50/103),包括 19 外显子缺失突变 35 例(占总突变 70%),21 外显子置换突变(包括 L858R 和 L816Q)12 例(24%),19 和 21 外显子双突变 2 例(4%),20 外显子插入突变(非敏感突变)1 例(2%)。女性组 EGFR 突变率高于男性组,差异有统计学意义;非吸烟组显著高于吸烟组;腺癌组高于鳞癌组差异有统计学意义($P<0.01$);根据收集标本的不同,将其分为原发灶和转移灶两组,原发灶包括手术切除、气管镜、肺穿刺活检标本;转移灶包括转移性 MPE、锁骨上淋巴结、皮下包块、骨组织活检标本。转移灶 EGFR 突变率高于原发灶,差异有统计学意义($P<0.05$);而含有 MPE 患者和不含 MPE 患者(原发灶 45 例+除 MPE 外转移灶 18 例)相比,EGFR 突变率显著增高,差异有统计学意义($P<0.01$)。EGFR 突变在不同性别、年龄、身体状态评分、分期及血清 CEA 值正常与否中差异无统计学意义,见表 1。

2.2 血浆 cfDNA 检测 EGFR 基因突变 29 例血浆与组织(或细胞)学标本配对检测 EGFR 突变的 aNSCLC 患者中,男 12 例,女 17 例;年龄 43~84 (62±12)岁,≤62 岁 16 例,>62 岁 13 例,分期ⅢB 期 2 例,Ⅳ期 27 例;鳞癌 1 例,腺鳞癌 1 例,腺癌 27 例。经检测,血浆 EGFR 突变阳性率为 37.9% (11/29),敏感性为 43.7% (7/16),特异性为 69.2% (9/13);4 例血浆突变阳性而组织学突变阴性其对应的组织

表1 EGFR 基因突变状态与患者临床病理学特征、标本来源关系(例)

项目	n	EGFR		阳性率 (%)	χ^2 值	P 值
		+	-			
吸烟						
男	52	16	35	31.4		0.327*
女	1	1	0	100.0		
不吸烟						
男	8	3	5	37.5	1.465	0.226
女	43	29	14	67.4		
年龄(岁)						
≤62	49	27	22	55.1	1.121	0.205
>62	54	23	31	42.6		
吸烟史(支/年)						
≥400	51	17	34	33.3	9.356	0.002
<400	52	33	19	63.5		
身体状态评分 PS						
0~1	69	32	37	46.4	0.531	0.531
2~4	34	18	16	52.9		
组织病理						
腺癌	90	49	41	54.4	0.001*	
鳞癌	11	0	11	0		
TNM 分期						
III	12	4	8	33.3	0.025	0.875
IV	84	34	50	40.5		
标本类型						
原发灶	45	16	29	35.6	5.397	0.020 ^a
转移灶	58	34	24	58.6		
MPE	40	27	13	67.5	9.408	0.002 ^b
非 MPE	63	23	40	36.5		
血清 CEA (ng/ml)						
0~10	60	26	34	43.3	1.562	0.211
>10	43	24	19	55.8		

a:原发灶组和转移灶组比较;b: MPE 组和非 MPE 组比较;* 采用 Fisher 确切检验

学标本分别为转移性锁骨上淋巴结活检标本 1 例、肺穿刺活检标本 1 例、气管镜活检标本 2 例。见表 2、图 1。

表2 ARMS 法配对检测血浆 cfDNA 中 EGFR 突变(例)

EGFR 突变状态	肿瘤组织和 MPE		合计
	M +	M -	
血浆			
M +	7	4	11
M -	9	9	18
合计	16	13	29

2.3 血浆 EGFR 突变检出率与 DNA 浓度间的关系 16 例组织或细胞学标本证实 EGFR 突变的患者中,血浆发现含有同种突变 7 例、未发现突变 9 例,两组血浆提取 cfDNA 浓度不符合正态分布, $M[P_{25}, P_{75}]$ 为 52.65 [32.15, 84.95] 和 44.80

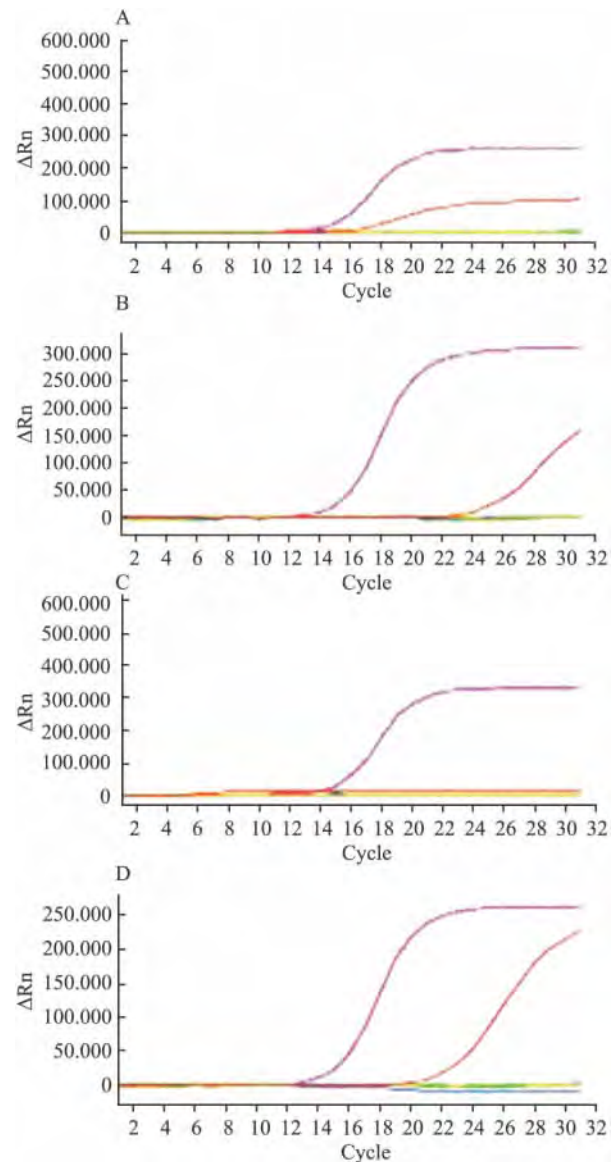


图1 2例患者配对标本 sARMS 法检测 EGFR 突变 RT-PCR 图

A:气管镜标本 19-del 突变 $\Delta Ct = 3.36$; B:血浆标本 19-del 突变 $\Delta Ct = 9.82$; A、B:来自同一患者; C:转移性锁骨上淋巴结野生型; D:血浆标本 19-del 突变; C、D:来自同一患者

[28.81, 67.70] $\text{ng}/\mu\text{l}$, 采用非参数秩和检验, 两组差异无统计学意义 ($Z = -0.735$, $P = 0.462$)。

3 讨论

文献^[2-3]显示, EGFR 突变率在东亚人群中为 36.4%~66.3%, 多见于亚裔、女性、腺癌、非吸烟人群, 与本研究结果基本相符。考虑到女性患者多为非吸烟人群, 在剔除了吸烟因素后, EGFR 突变与性别无相关性。

约 63.6% 的 aNSCLC 患者存在血清 CEA 升高, 以肺腺癌为主, 临床常通过监测血清 CEA 来评估肿

瘤病情。CEA 的作用尚未完全阐明,可能在癌细胞的生长和抗凋亡中发挥作用。有学者认为,血清 CEA 是 EGFR 突变的独立相关因素,且突变率随着血清 CEA 值的升高而增加,这可能是因为 EGFR 突变体下游分子激活抗凋亡的发生,提高了抗凋亡产物 CEA 蛋白的表达^[4]。但本研究未发现血清 CEA 与 EGFR 突变的一致性关系。

在外周血 cfDNA 提取方面,研究^[5]显示,血浆 cfDNA 在肺癌患者中普遍升高,但个体差异很大。cfDNA 多为片段、<200 bp、与野生型 cfDNA 混杂在一起的。所以,可信的提取方法、敏感性较高的扩增方法对于扩增这些小片段 DNA 至关重要。而肿瘤特异性 cfDNA 多为小片段 DNA^[6],目前实验室常用的离心柱式 QIAamp DNA Mini Kit 提取的 cfDNA 多为高分子量 DNA。考虑到部分小分子 cfDNA 在使用 QIAamp DNA Mini Kit 提取过程中的丢失,Qiagen 公司新推出了 QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit 以提高小分子 DNA 的提取量,操作过程简单、通量高,可一次性提取 5 ml 的血浆标本。在检测方法中,相较于直接测序法、DHPLC 法及突变富集 PCR 法,sARMS 法突变率最高,且检测结果稳定、特异性高^[7-8]。

本研究使用 QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit 提取血浆 cfDNA,使用 sARMS 法进行 EGFR 突变检测,显示血浆 EGFR 突变的阳性率为 39.1%,敏感性为 43.7%,特异性为 69.2%。与使用 QIAamp DNA Mini Kit 提取血清 cfDNA 检测 EGFR 突变的日本 IPASS 研究^[9]43.1% (22/51) 的敏感性相一致。不过,低于同样试剂 Liu et al^[10] 检测的敏感性 67.5% (27/40),这可能是因为选择人群的不同所造成的差异。

本研究显示和原发肿瘤相比,EGFR 突变多见于转移灶。与不含 MPE 患者相比,EGFR 突变多见于含 MPE 患者。这与近期的研究结果相一致,如 Han et al^[11] 发现 EGFR 突变在原发灶和转移灶中存在 16.2% (6/37) 的不一致。Park et al^[12] 发现有 11.2% (12/101) 的原发灶与转移性淋巴结的 EGFR 突变状态不同。Wu et al^[13] 发现含有 MPE (68.4%) 较无 MPE (50.5%) 的肺癌患者 EGFR 突变率更高。以上结果均显示 EGFR 突变率在肺癌原发和转移灶中不一致,这种不同甚至存在于胸膜转移灶中,而 MPE 中肿瘤细胞是非锚定、可自由移动的,所以可能是更加同质、更能代表转移肿瘤细胞特征的。

对于 4 例血浆与配对肿瘤组织 EGFR 突变状态的不同,考虑其中 3 例配对的肿瘤组织均来自原发灶,除了样本取材和分析错误,也有其他可能,如随着肿瘤进展而出现的不同克隆和(或)转移灶环境诱导不同突变的出现^[14],即不同部位肿瘤 EGFR 突变存在异质性。血浆 EGFR 突变的检出,说明肿瘤已发生血道转移;那么血浆 EGFR 突变状态或许可以代表转移灶的突变状态,这与本研究显示转移灶 EGFR 突变率高于原发灶相符。关于肿瘤 EGFR 突变异质性,文献报道不一,Bai et al^[15] 通过微切割肿瘤组织,发现将近 30% 的 NSCLC 患者存在 EGFR 突变异质性。而 Yatabe et al^[16] 发现 EGFR 不均一性在肺腺癌中非常少见,推测异质性的发现是等位基因的不平衡扩增和检测方法的敏感性不同所导致。

虽然本研究未证实 EGFR 突变与肿瘤分期的关系,但从 MPE、转移灶 EGFR 突变率的升高和血浆 EGFR 突变的检出,提示肺癌 EGFR 突变异质性这一方向的研究前景是可观的,并可能作为 EGFR-TKI 耐药出现的原因。故探讨 NSCLC 患者原发灶、转移灶、cfDNA 之间 EGFR 突变异质性的规模、标准化研究值得探索。

参考文献

- [1] Peters S, Adjei A A, Gridelli C, et al. Metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up [J]. *Ann Oncol* 2012 23 (Suppl 7): vii 56-64.
- [2] Gao B, Sun Y, Zhang J, et al. Spectrum of LKB1, EGFR and KRAS mutations in chinese lung adenocarcinomas [J]. *J Thorac Oncol* 2010 5 (8): 1130-5.
- [3] Rosell R, Carcereny E, Gervais R, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EORTAC): a multicentre, open-label, randomized phase 3 trial [J]. *Lancet Oncol* 2012 13(3): 239-46.
- [4] Shoji F, Yoshino I, Yano T, et al. Serum carcinoembryonic antigen level is associated with epidermal growth factor receptor mutations in recurrent lung adenocarcinomas [J]. *Cancer* 2007 110 (12): 2793-8.
- [5] Nakano H, Soda H, Takasu M, et al. Heterogeneity of epidermal growth factor receptor mutations within a mixed adenocarcinoma lung nodule [J]. *Lung Cancer* 2008 60(1): 136-40.
- [6] Yuan H, Zhu Z Z, Lu Y, et al. A modified extraction method of circulating free DNA for epidermal growth factor receptor mutation analysis [J]. *Yonsei Med J* 2012 53(1): 132-7.
- [7] Qin L, Zhong W, Zhang L, et al. Comparison of three methods for

- detecting epidermal growth factor receptor mutations in plasma DNA samples of Chinese patients with advanced non-small cell lung cancer[J]. *Chin Med J* 2011 ,124(6) :887 – 91.
- [8] Xu F , Wu J , Xue C , et al. Comparison of different methods for detecting epidermal growth factor receptor mutations in peripheral blood and tumor tissue of non-small cell lung cancer as a predictor of response to gefitinib[J]. *Onco Targets Ther* 2012 5 :439 – 47.
- [9] Goto K , Ichinose Y , Ohe Y , et al. Epidermal growth factor receptor mutation status in circulating free DNA in serum[J]. *J Thorac Oncol* 2012 7(1) :115 – 21.
- [10] Liu X , Lu Y , Zhu G , et al. The diagnostic accuracy of pleural effusion and plasma samples versus tumour tissue for detection of EGFR mutation in patients with advanced non-small cell lung cancer: comparison of methodologies[J]. *J Clin Pathol* ,2013 66 (12) :1065 – 9.
- [11] Han H S , Eom D W , Kim J H. EGFR mutation status in primary lung adenocarcinomas and corresponding metastatic lesions: discordance in pleural metastases[J]. *Clin Lung Cancer* , 2011 ,12 (6) :380 – 6.
- [12] Park S , Holes-Tisch A J , Cho E Y , et al. Discordance of molecular biomarkers associated with epidermal growth factor receptor pathway between primary tumors and lymph node metastasis in non-small cell lung cancer[J]. *J Thorac Oncol* 2009 4(7) :809 – 15.
- [13] Wu S G , Gow C H , Yu C J , et al. Frequent epidermal growth factor receptor gene mutations in malignant pleural effusion of lung adenocarcinoma[J]. *Eur Respir J* 2008 32(4) :924 – 30.
- [14] Klein C A. Parallel progression of primary tumours and metastases[J]. *Nat Rev Cancer* 2009 9(4) :302 – 12.
- [15] Bai H , Wang Z , Wang Y , et al. Detection and clinical significance of intratumoral EGFR mutational heterogeneity in Chinese patients with advanced non-small cell lung cancer[J]. *PLoS One* , 2013 8(2) :e54170.
- [16] Yatabe Y , Matsuo K , Mitsudomi T. Heterogeneous distribution of EGFR mutations is extremely rare in lung adenocarcinoma[J]. *J Clin Oncol* 2011 ,29(22) :2972 – 7.

Detection of EGFR mutation with multiple pathways specimens in advanced non-small cell lung cancer patients

Leng Zaijun¹ , Xu Ao² , Xu Xiucan³ , et al

(¹Dept of Respiratory , ²Dept of Pathology , ³Dept of Center Laboratory ,
The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230001)

Abstract Objective To detect epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations with multiple pathways specimens in advanced non-small cell lung cancer (aNSCLC) patients and study the relationship between EGFR mutation and specimen source , clinical features , pathological features , stage , the value of serum carcinoembryonic antigen (CEA). **Methods** Multiple pathways specimens like tumor tissue , cytology and plasma in aNSCLC patients were collected. QIAGEN's new QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit was used to extract cfDNA in plasma , scorpion probe amplification refractory mutation system (sARMS) was used for EGFR mutation test. **Results** The EGFR mutation rate of 103 cases in patients with NSCLC used tissue or cytology specimens was 48.5% (50/103). There was a significant correlation between EGFR mutation smoking history and histological type ($P < 0.05$). No correlation with gender , age , physical status score , stage and the value of serum CEA. The mutation rate of metastases source group (58.6%) was higher than the primary tumor source group (35.6%). Patients with malignant pleural effusions (67.5%) were higher than those without pleural effusion (36.5%) ($P < 0.05$); versus tissue or cytology specimens , the EGFR mutation positive rate in 29 cases of paired plasma samples was 37.9% (11/29) , sensitivity was 43.7% (7/16) and specificity was 69.2% (9/13). **Conclusion** aNSCLC patients with EGFR gene mutation were usually observed in non-smoking and adenocarcinoma patients. There is no significant difference with gender , serum carcinoembryonic antigen , clinical stage and physical status. The EGFR mutation rate is higher in patients with malignant pleural effusion than patients without. Using QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit for extracting cfDNA in plasma to detect EGFR mutation , the sensitivity is acceptable. If cheap , plasma may be a complementary approach for tumor tissue. Due to the existence of intratumoral EGFR mutational heterogeneity , obtaining different parts of the tumor tissue is essential.

Key words NSCLC; EGFR; plasma