

• 临床检验研究论著 •

2种方法检测非小细胞肺癌EGFR基因突变的比较

罗凯¹,王倩²,刘季芳¹,潘东晓¹,薛兴阳¹,傅文凡¹,贺智敏^{1△}

(1. 广州医学院肿瘤研究所/广州医学院附属肿瘤医院, 广东广州 510095;

2. 广州市中医院病理科, 广东广州 510130)

摘要:目的 比较测序法和Taqman实时荧光PCR法检测表皮生长因子受体(EGFR)基因19、21外显子基因突变的一致性,为寻找适宜临床应用的EGFR基因突变检测方法提供实验依据。方法 收集60例非小细胞肺癌患者肿瘤组织,应用测序法和Taqman实时荧光PCR法分别检测EGFR基因19、21外显子基因突变,比较两种方法的有效性。结果 两法检测EGFR基因19、21外显子突变结果符合率分别为96.7% (58/60)和98.3% (59/60),差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 2种方法均可用于EGFR基因19、21外显子突变检测,测序法更适合指导临床分子靶向治疗。

关键词:受体, 表皮生长因子; 基因测序; 聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.02.016

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)02-0162-03

Detection of EGFR mutations in non-small cell lung cancer tissues by two methods

Luo Kai¹, Wang Qian², Liu Jifang¹, Pan Dongxiao¹, Xue Xingyang¹, Fu Wenfan¹, He Zhimin^{1△}

(1. Guangzhou Medical University Cancer Institute and Hospital, Guangzhou, Guangdong 510095, China;

2. Department of Pathology, Guangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510130, China)

Abstract: Objective To compare DNA sequencing and Taqman real-time PCR detecting EGFR exon 19 and 21 mutations in order to find a suitable clinical detection method of gene mutations. **Methods** To detect EGFR exon 19 and 21 mutations in 60 non-small cell lung cancer patients by DNA sequencing and Taqman real-time PCR and to analyze two methods' efficiency. **Results** There was no significant difference between two methods in detecting EGFR exon 19 and 21 mutations ($P>0.05$) and the result coincidence rates of exon 19 and 21 mutations detection were 96.7% (58/60) and 98.3% (59/60), respectively. **Conclusion** DNA sequencing and Taqman Real-time PCR all could be used for mutations detection of EGFR exon 19 and 21. DNA sequencing is more suitable for guiding the clinical molecular targeted therapy.

Key words: receptor, epidermal growth factor; gene sequencing; polymerase chain reaction

肺癌是威胁人类健康的主要恶性肿瘤之一,非小细胞肺癌(NSCLC)约占肺癌的80%以上,很多NSCLC患者在确诊时已是肺癌晚期,具有较差的预后^[1]。近年来,表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKI)类小分子靶向药物已进入NSCLC患者的临床治疗并取得良好的疗效。许多研究表明^[2-4],EGFR基因酪氨酸激酶功能区的体细胞基因突变与NSCLC患者EGFR-TKI靶向治疗敏感性密切相关,其中约90%的突变发生于19、21外显子上,EGFR-TKI在突变患者中的有效率可达70%以上,而在非突变患者中有效率仅10%左右。因此检测EGFR基因19、21外显子突变对于指导临床EGFR-TKI对NSCLC患者的靶向治疗具有重要意义。

目前临床应用的检测EGFR基因突变的方法主要为测序法和实时荧光PCR法,其中实时荧光PCR法又分为Taqman实时荧光PCR法、特异引物双扩增荧光PCR法等亚类,上述方法各有优缺点。本研究选择临床常用的测序法和Taqman实时荧光PCR法检测60例NSCLC患者肿瘤组织EGFR基因19、21外显子突变情况,并分析结果间的差异,旨在为临床选择合适的EGFR基因突变检测方法提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集2011年广州医学院附属肿瘤医院NSCLC患者肿瘤组织样品60例,其中石蜡切片样品42例,75%乙醇固定组织样品18例;男性37例,女性23例,年龄34~78岁,中位年龄58岁。

1.2 仪器与试剂 测序法、Taqman实时荧光PCR法检测EGFR基因19、21外显子基因突变试剂盒分别购自北京鑫诺美迪科技有限公司、北京金菩嘉医疗科技有限公司,两法对应的检测仪器分别为美国ABI 3130xl基因测序仪和ABI 7500 fast实时荧光定量PCR仪。

1.3 方法

1.3.1 样品前处理 石蜡切片样品:取1.5 mL Eppendorf管1支,加入1 mL二甲苯。依据组织大小与肿瘤细胞含量取石蜡切片6~15片,每片滴加1~2滴二甲苯,取洁净手术刀片刮取玻片上组织放入Eppendorf管中,振荡混匀后静置10 min,12 000×g离心5 min,弃上清液。重复以上步骤用1 mL二甲苯洗涤样品1次,加入1 mL无水乙醇,12 000×g离心5 min,弃上清液。再使用无水乙醇重复洗涤样品1次。室温开盖静置,待无水乙醇彻底挥干。75%乙醇固定组织样品:用洁净手术刀于送检肿瘤组织中做4~6点取样放入Eppendorf管中,75%乙醇洗涤样品1次,弃上清液。室温开盖静置,待乙醇彻底挥干。

1.3.2 基因组DNA提取 使用天根口腔拭子基因组DNA提取试剂盒,按试剂盒说明书操作步骤提取基因组DNA,提取后测OD260/OD260/OD280评估DNA含量与纯度。

1.3.3 DNA测序突变检测 实验全程设置阴、阳性对照。依据试剂盒说明书,利用PCR仪扩增EGFR基因19、21外显子扩增引物如下:19-F 5'-CCT TAG GTG CGG CTC CAC AGC-

3',19-R 5'-CAT TTA GGA TGT GGA GAT GAG C-3';21-F 5'-CAG CCA TAA GTC CTC GAC GTG-3', 21-R 5'-TCC TCC CCT GCA TGT GTT AAA C-3'。PCR 反应条件为: 94 ℃ 2 min; 94 ℃ 15 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 45 s, 45 个循环; 72 ℃ 7 min。取 PCR 产物 5 μL 加入 2 μL SAP 酶混合物混匀, 37 ℃ 1 h, 80 ℃ 15 min。酶解产物做双向测序反应, 以 PCR 上下游扩增引物分别作为正、反向测序引物。测序反应体系如下: PCR 酶解产物 3 μL、Bigdye3.1(美国 ABI 公司)1 μL、测序引物 2 μL。反应条件为: 预变性 96 ℃ 1 min; 变性 96 ℃ 10 s, 退火 50 ℃ 5 s、延伸 60 ℃ 4 min, 25 个循环; 4 ℃ 恒温保存。测序反应产物加入醋酸钠乙醇溶液(3 mol/L 醋酸钠: 无水乙醇 = 1:15)16 μL, 剧烈振荡, 避光静置 15 min, 4 ℃ 12 000×g 离心 30 min, 弃上清液。加 70 μL 70% 预冷乙醇, 温和颠倒混匀数次, 4 ℃ 12 000×g 离心 15 min, 弃上清液。70% 预冷乙醇重复洗涤 1 次。室温开盖静置待乙醇挥发干净, 加入 10 μL 高去离子甲酰胺后置 PCR 仪上变性: 95 ℃ 4 min, 4 ℃ 4 min, 上 ABI 3130xl 测序仪测序。所得序列图采用 Chromas2.23 软件通过与 NCBI 基因库标准序列比对, 分析测序结果。

表 1 测序法检测 EGFR 基因 19、21 外显子基因突变类型

外显子	核苷酸序列改变	氨基酸序列改变	n
19 外显子	del2235G→2249C del2236G→2250A del2239T→2262A, 2264C→2265CIns(CAA) 2234A→2235G(InsAAT TCC CGT CGC TAT CAA)正向 2214T→2215A(InsAAA ATT CCC GTC GCT ATC)反向	del E746→A750 del E746→A750 del L747→K754, A755→N756(InsN) K745→E746(InsIPVAIK) V738→K739(InsKIPVAI)	7 3 1 1
21 外显子	Sub2573T→G	L858R	11

2.2 Taqman 实时荧光 PCR 法结果 Taqman 实时荧光 PCR 法共检出突变 21 例(突变率 36.7%), 其中 19 外显子突变 10 例(突变率 16.7%), 均为 delE746-A750 型突变, 21 外显子突变 12 例(突变率 20.0%), 均为 L858R 突变。未见 19 外显子 del L747-P753insS 突变和 21 外显子 L861Q 突变, 见图 2(见《国际检验医学杂志》网站论文附件)。

2.3 两种方法结果比较 两法检测 EGFR 基因 19、21 外显子突变结果总符合率为 97.5% (117/120), 差异无统计学意义($P>0.05$)。19、21 外显子结果符合率分别为 96.7% (58/60)、98.3% (59/60), 差异无统计学意义($P>0.05$)。其中 2 例 19 外显子测序法检测为罕见突变的样品 Taqman 实时荧光 PCR 法检测为阴性, 1 例 21 外显子 Taqman 实时荧光 PCR 法检测为 L858R 突变阳性的样品测序法检测为野生型, 见表 2。

表 2 两种方法检测 EGFR 基因 19、21 外显子突变(n)

测序法	实时荧光 PCR 法					
	19 外显子			21 外显子		
	突变型	野生型	合计	突变型	野生型	合计
突变型	10	2	12	11	0	11
野生型	0	48	48	1	48	49
合计	10	50	60	12	48	60

3 讨 论

EGFR 基因位于人类染色体 7p12, 含 28 个外显子, 编码

1.3.4 Taqman 实时荧光 PCR 突变检测 按试剂盒说明书配制双重荧光 PCR 反应体系, 19 外显子检测 delE746-A750、del L747-P753insS 两种突变类型, 21 外显子检测 L858R、L861Q 两种突变类型, 实验设置阴、阳性对照和空白对照。反应条件: 50 ℃ 2 min; 95 ℃ 10 min; 95 ℃ 15 s, 62 ℃ 1 min, 40 个循环。结果判读: 首先空白对照、阴性对照无扩增曲线, 阳性对照出现扩增曲线, 实验有效。然后未出现扩增曲线或 $CT>38$ 判断为阴性样品, 出现扩增曲线且 $CT\leq 34$ 判断为阳性样品, $34 < CT \leq 38$ 判断为可疑样品需重复。所有阴性样品 PCR 产物均进行 2% 琼脂糖凝胶电泳排除假阴性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS11.0 软件进行统计学处理, 采用 χ^2 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 测序法结果 测序法共检出突变 23 例(突变率 38.3%), 其中 19、21 外显子分别突变 12 例(突变率 20.0%) 和 11 例(突变率 18.3%)。19 外显子突变样品中有 2 例为罕见突变类型, 且其中 1 例突变样品正反向测序结果不一致, 详见表 1 及图 1(见《国际检验医学杂志》网站论文附件)。

一种跨膜酪氨酸激酶受体, 通过与相应配体结合调节细胞的生长、分化与增殖。EGFR-TKI 是一种抑制 EGFR 酪氨酸激酶的小分子靶向抗肿瘤药物, 其治疗敏感性与 EGFR 基因 18、19、20、21 外显子突变状态密切相关, 因此检测 EGFR 基因突变对于指导临床 EGFR-TKI 对 NSCLC 患者的靶向治疗具有重要意义^[5]。

本研究选择了临床主要应用的检测 EGFR 基因突变的测序法和 Taqman 实时荧光 PCR 法, 比较两法的检测性能差异。其中测序法是基因突变检测的金标准方法, 可检测已知与未知突变, 结果可靠、重复性好, 但对样品要求较高、步骤多、耗时长^[6]。Taqman 实时荧光 PCR 法步骤简单、耗时短, 但只能检测已知突变位点与类型。

本研究对测序法和 Taqman 实时荧光 PCR 法检测 NSCLC 患者 EGFR 基因 19、21 外显子的突变情况进行比较, 两法结果符合率达到 97.5%, 差异无统计学意义($P>0.05$), 表明两法的检测性能接近, 均可用于 EGFR 基因突变检测。

在两法检测 19 号外显子时, 有 2 例结果不符, 测序法检测为突变而 Taqman 实时荧光 PCR 法检测为阴性。其原因为该 2 例样品 19 外显子突变类型超出了本研究选用的 Taqman 实时荧光 PCR 法突变检测试剂盒的检测范围。实验中共发现 19 外显子的 6 种突变类型, 其中 3 种超出了本研究选用的 Taqman 实时荧光 PCR 法突变检测试剂盒的检测范围, 同时发现 1 例样品正反向测序结果不一致, 以上结果提示华南地区 EGFR 基因 19 外显子突变位点多样、突变类型复杂, 两种突变

类型共存的情况实际存在。针对此类突变区域, Taqman 实时荧光 PCR 法只有增加针对不同突变类型的特异性突变检测探针的数量才能有效扩展突变检测覆盖范围, 但对于未知突变仍会漏检。同时随着突变检测范围的扩展, 实验的成本和复杂性快速增加, 故针对此类区域更适合选用测序法检测突变。

在两法检测 21 号外显子时, 均只检测到 L858R 突变, 有 1 例样品 Taqman 实时荧光 PCR 法检测为 L858R 突变而测序法检测为野生型, 可能为样品肿瘤细胞含量过低所致。测序法在实验过程中同时检测肿瘤细胞和正常细胞目的片段区域的 DNA 序列信息, 如样品的正常细胞比例过高, 则肿瘤细胞的突变信号可能被掩盖, 导致假阴性结果。故测序法对样品要求较高。以上结果表明, 华南地区 EGFR 基因 21 外显子突变类型相对单一, 两种突变检测方法均适用, Taqman 实时荧光 PCR 法灵敏度略高。

Sharma 等^[4]已报道 EGFR 基因酪氨酸激酶功能区的 39 种突变类型, 其 18、19、20、21 外显子突变构成比及突变类型数分别为 5%、45%、5%、40%~45% 和 7 种、18 种、8 种、6 种。除以上 39 种突变类型外的新突变类型仍不时见于报道^[7~9]。由此可见指导 NSCLC 患者分子靶向治疗的 EGFR 基因 18~21 外显子突变呈现突变位点和突变类型的多样性。其中 21 外显子突变位点与类型较单一可使用 Taqman 实时荧光 PCR 法检测, 19 外显子突变位点与类型较复杂, Taqman 实时荧光 PCR 法易漏检, 宜选用测序法。同时 18、20 外显子突变占总突变数的 10% 左右, 临床应用时增加对 18、20 外显子突变的检测可进一步提高 EGFR 基因突变检测指导分子靶向治疗的有效性。

相关研究显示^[9~12], EGFR 基因突变存在显著的地域、种群差异性, 即使在中国不同地区也不尽相同, 如 EGFR 基因突变在台湾地区以 21 外显子为主、在吉林、广东、云南省以 19 外显子为主, 而在北京、上海两者间无明显差异。因此, 同一检测方法在不同地区应用时可能会表现出不同的突变检出率; 故临床选择 EGFR 基因突变检测方法时, 除了方法学性能外还应考虑当地的 EGFR 基因突变分布特点。因本研究用于方法比对的样品数仍相对偏少, 故接下来将进一步扩大比对样品数量以期获得更具代表性的结果。

综上所述, 在选择临床适宜的 EGFR 基因突变检测方法时首先应了解当地的 EGFR 基因突变分布情况, 且检测范围应尽量涵盖 18~21 外显子。测序法与 Taqman 实时荧光 PCR 法均可用于 EGFR 基因 19、21 外显子突变的检测。与 Taqman 实时荧光 PCR 法相比, 测序法可同时、全面检测各种已知、未知突变, 更适合指导临床靶向用药, 但在具体检测时应注

(上接第 161 页)

- [6] Leroy S, Bouissou F, Fernandez-Lopez A, et al. Prediction of high-grade vesicoureteral reflux after pediatric urinary tract infection: external validation study of procalcitonin-based decision rule[J]. PLoS One, 2011, 6(12): e29556.
- [7] 季丽娜, 曹力, 陈大坤, 等. 膀胱输尿管反流高危患儿的临床和影像学检查结果分析[J]. 中华儿科杂志, 2011, 49(4): 282~286.
- [8] Ipek IO, Sezer RG, Senkal E, et al. Relationship between procalcitonin levels and presence of vesicoureteral reflux during first febrile urinary tract infection in children[J]. Urology, 2012, 79(4): 883~887.

意合格标本的采集。在进行少数突变位点或突变类型检测时, 实时荧光 PCR 法则更能发挥其简单、快速、灵敏的特点。

参考文献

- [1] 廖松林, 刘彤华, 李维华, 等. 肿瘤病理诊断与鉴别诊断学[M]. 福州: 福州科学技术出版社, 2006: 312~320.
- [2] Mitsudomi T, Kosaka T, Endoh H, et al. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene predict prolonged survival after gefitinib treatment in patients with non-small-cell lung cancer with postoperative recurrence[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(11): 2513~2520.
- [3] Costanzo R, Piccirillo MC, Sandomenico C, et al. Gefitinib in non small cell lung cancer[J]. J Biomed Biotechnol, 2011, 2011: 815269.
- [4] Sharma SV, Bell DW, Settleman J, et al. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(3): 169~181.
- [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] 高云, 陈嘉昌, 朱振宇, 等. EGFR 基因突变及其检测方法的研究进展[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2011, 3(1): 51~57.
- [7] Le Maignan L, Mirebeau-Prunier D, Vervueren L, et al. First case of A859T epidermal growth factor receptor mutation responding to erlotinib[J]. J Thorac Oncol, 2011, 6(3): 639~640.
- [8] Costa DB, Schumer ST, Tenen DG, et al. Differential responses to erlotinib in epidermal growth factor receptor (EGFR)-mutated lung cancers with acquired resistance to gefitinib carrying the L747S or T790M secondary mutations[J]. J Clin Oncol, 2008, 26(7): 1184~1186.
- [9] 尹光浩, 刘伟, 吴勇, 等. 中国人原发性肺腺癌 EGFR 基因突变分析[J]. 中国老年学杂志, 2009, 29(4): 443~445.
- [10] Sahoo R, Harini VV, Babu VC, et al. Screening for EGFR mutations in lung cancer, a report from India[J]. Lung Cancer, 2011, 73(3): 316~319.
- [11] 董强刚, 韩宝惠, 黄进肃, 等. 176 例非小细胞肺癌的 EGFR 基因突变分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2006, 28(9): 686~690.
- [12] Huang SF, Liu HP, Li LH, et al. High frequency of epidermal growth factor receptor mutations with complex patterns in non-small cell lung cancers related to gefitinib responsiveness in Taiwan[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(24): 8195~8203.

(收稿日期: 2012-07-11)

tonin levels and presence of vesicoureteral reflux during first febrile urinary tract infection in children[J]. Urology, 2012, 79(4): 883~887.

- [9] Chevalier I, Gauthier M. Procalcitonin and vesicoureteral reflux in children with urinary tract infection[J]. Pediatrics, 2005, 116(5): 1261~1262.

(收稿日期: 2012-07-14)