

• 论 著 •

非小细胞肺癌患者外周血游离 DNA 中检测 EGFR 基因突变*

张世强¹, 王保庆², 王海清³, 张旭东¹

(徐州医学院第二附属医院:1. 放疗三科;2. 肿瘤内科;3. 呼吸内科, 江苏徐州 221006)

摘要:目的 检测非小细胞肺癌患者外周血游离 DNA 中表皮生长因子受体(EGFR)基因 19 和 21 外显子的突变情况,并与相应的肿瘤组织检测结果进行比较,探讨非小细胞肺癌患者应用外周血游离 DNA 检测 EGFR 突变的临床意义。方法 应用实时荧光聚合酶链反应(PCR)技术检测 32 例非小细胞肺癌患者术后肿瘤组织和术前外周血游离 DNA 中 EGFR 基因 19 和 21 外显子的突变,所有扩增标本均经基因测序法验证。结果 32 份外周血标本中,共检测到 13 份 EGFR 基因突变,突变率达 40.6%,肿瘤组织中有 16 份 EGFR 基因突变,突变率达 50.0%,外周血和肿瘤组织 EGFR 基因同时突变的有 13 份,两者突变一致性达到 81.2%,两者间差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 外周血游离 DNA 代替肿瘤组织进行 EGFR 基因突变检测具有可行性,为无法取得肿瘤组织的非小细胞肺癌患者提供一种更快捷、简便的 EGFR 基因突变检测方法,其检测结果可为临床选择靶向药物治疗提供依据。

关键词:肺肿瘤; 表皮生长因子受体; 游离脱氧核糖核酸; 肿瘤组织

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.09.009

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)09-1185-03

Detection of EGFR gene mutation in circulating DNA of patients with non-small cell lung cancer*

Zhang Shiqiang¹, Wang Baoqing², Wang Haiqing³, Zhang Xudong¹

(1. Department of radiotherapy Oncology; 2. Department of oncology; 3. Department of respiratory, The Second Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Jiangsu, Xuzhou 221006, China)

Abstract: Objective To detect the mutation in exon 19 and exon 21 of epithelial growth factor receptor(EGFR) gene in circulating DNA of non-small cell lung cancer patients. And to compare the result with that of tumor tissue, and evaluate the clinical value of EGFR mutation through detectorg circulating DNA in non-small cell lung cancer patients. **Methods** The expression of EGFR was analyzed by real time PCR in 32 NSCLC tumor tissues and its peripheral blood, The mutations of EGFR gene in exon 19 and exon 21 were proved by gene sequencing method. **Results** Among 32 cases of paired samples, EGFR gene mutation rate of peripheral blood was 40.6%, EGFR gene mutation rate of tumor tissue was 50.0%, The consistency of EGFR gene mutations with tumor tissue and peripheral blood reached 81.2%, EGFR gene mutation rate of them had no significant difference ($P>0.05$). **Conclusion** EGFR gene mutation detection is feasible by using serum circulating DNA. Detection of EGFR gene mutation in plasma may replace that in tumor tissue, providing a quicker and easier examination method for the patients lacking biopsy tissue.

Key words: lung neoplasm; epithelial growth factor receptor; circulating deoxyribonucleic acid; tumor tissue

分子靶向药物治疗在肺癌综合治疗中的作用日益受到人们的关注,大规模的随机双盲对照临床试验证实,对表皮生长因子受体(EGFR)突变型的进展期肺癌来说,分子靶向药物治疗效优于含铂类三联化疗方案^[1-4], EGFR 基因突变的检测能为肺癌患者靶向药物治疗提供依据,而大部分肺癌患者确诊时已处于肿瘤晚期,已失去手术切除机会,无法获得足够肿瘤标本进行 EGFR 基因突变的检测。因此,寻找替代肿瘤组织的 EGFR 基因突变检测标本,对于晚期患者来说具有重大的意义。本研究旨在通过探讨肺癌患者肿瘤组织及外周血游离 DNA 中 EGFR 基因突变的相关性,为晚期肺癌患者通过外周血游离 DNA 检测 EGFR 突变指导靶向药物治疗提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2013 年 6 月至 2014 年 8 月在徐州医学院第二附属医院行手术切除的非小细胞肺癌患者 32 例为研究

对象,所有患者术前未行放、化疗治疗,术后病理证实为非小细胞肺癌,其中男 18 例,女 14 例;年龄 38~65 岁,中位数 57.2 岁。组织学类型为腺癌患者 21 例,鳞癌患者 11 例。所有患者均在知情同意后术前采集血样及术后留取肿瘤组织标本。

1.2 标本的收集及 DNA 的提取 病例组采集术后新鲜肿瘤组织,手术标本石蜡包埋,从石蜡标本中切取 5~10 μm 厚度的蜡块组织 3 片置于 1.5 mL 离心管中,使用 Qiagen 公司 FFEP DNA 提取试剂盒抽提 DNA,操作步骤按照试剂盒说明书。采集术前 6 h 外周静脉血 4 mL,室温放置 2 h 后用低温高速离心机将静脉血离心(20 °C, 3 000 r/min, 10 min),取上清液血清 1 mL 放入入 2 mL 冻存试管,血清 DNA 以磁珠法全血基因组 DNA 抽提试剂盒(美国 Omega 公司生产)抽提,按说明书所述的方法抽提血清 DNA。

1.3 试剂与引物设计 聚合酶链反应(PCR)试剂包括 PCR

* 基金项目:徐州市 2013 年科技计划基金资助项目(XM13B045)。工作。

作者简介:张世强,男,副主任医师,主要从事肿瘤的基础与临床研究

缓冲液、PCR 产物纯化试剂盒、PCR 试剂盒。采用 Primer Premier5 软件设计引物, EGFR 外显子 19 上游引物: 5'- AAC GTC TTC TCC CTT CTC TCT CTG TCA-3', 下游引物: 5'- CCA CAC AGC AAA GCA GAA ACT -3', 产物大小为 150 bp; EGFR 外显子 21 上游引物: 5'-TCT TCT CGT TTT CAG GGC ATG-3', 下游引物: 5'-GGC TGA CCT AAA GCC ACC TC -3', 产物大小为 196 bp, 由大连宝生生物工程技术服务有限公司合成。

1.4 EGFR 基因在肿瘤组织和外周血游离 DNA 中表达的检测 DNA 抽提完成后进行 PCR 扩增目的片段 EGFR, PCR 扩增体系设计为 20 μ L, 模板 1 μ L。扩增外显子为 19、21 外显子。(1)95 $^{\circ}$ C, 5 min 变性。(2)95 $^{\circ}$ C 30 S, 57 $^{\circ}$ C 30 S, 72 $^{\circ}$ C 45 S, 40 个循环。(3)72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。扩增产物经 1.6% 琼脂糖凝胶电泳 100 V, 30 min 后 EB 染色摄片。对观察到阳性扩增条带的标本分离纯化后进行基因测序, 测序引物采用各外显子的上游引物。

1.5 统计学处理 应用 SPSS19.0 软件进行统计分析, 计数资料以例数成百分率表示, 采用确切概率法对计数资料进行检验。检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧), 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 非小细胞肺癌患者外周血 EGFR 突变及其与临床特征的关系 在 32 份外周血标本中, 共检测到 13 份 EGFR 突变, 总体突变率达 40.6%。在 13 例 EGFR 突变的患者中, 其中男性发生 EGFR 突变 4 例, 突变率为 22.2%; 女性 9 例, 突变率为 64.3%, 女性 EGFR 突变发生率明显高于男性 ($P<0.05$)。此外, EGFR 突变患者中腺癌 10 例, 突变率为 58.8%; 鳞癌 3 例, 突变率为 20.0%, 肺腺癌的 EGFR 突变发生率明显高于肺鳞癌 ($P<0.05$)。但是, 在年龄大于 60 岁患者和不高于 60 岁患者, EGFR 突变分别为 40.0% 和 41.7% ($P>0.05$), 见表 1。

表 1 非小细胞肺癌患者外周血 EGFR 突变与临床特征的关系

临床特征	n	EGFR 突变(n)	突变比例[% (n/n)]	P
年龄(岁)				0.287 2
>60	20	8	40.0(8/20)	
≤60	12	5	41.7(5/12)	
性别				0.017 6
男	18	4	22.2(4/18)	
女	14	9	64.3(9/14)	
病理类型				0.025 4
腺癌	17	10	58.8(10/17)	
鳞癌	15	3	20.0(3/15)	

2.2 非小细胞肺癌患者外周血游离 DNA 与肿瘤组织中 EGFR 突变的一致性 本研究中共有配对外周血游离 DNA 和肿瘤组织标本 32 份, 其中外周血有 13 份存在 EGFR 突变, 肿瘤组织中有 16 份 EGFR 突变, 外周血和肿瘤组织 EGFR 同时突变的有 13 份, 且 13 份血和组织中的突变位点一致。EGFR 同时为野生型有 16 份, 3 份组织中检测到 EGFR 突变但血中未

检测到, 两配对资料使用配对 χ^2 检验, 两者差异无统计学意义 ($P=0.083 3$)。以组织中检测到的 EGFR 状态为标准, 两者突变一致性达到 81.2%(13/16)。见表 2。

表 2 32 例非小细胞肺癌患者外周血游离 DNA 和肿瘤组织 EGFR 突变一致性

外周血游离 DNA	n	肿瘤组织	
		EGFR(+)	EGFR(-)
EGFR(+)	13	13	0
EGFR(-)	19	3	16
合计	32	16	16

+ : 阳性; - : 阴性。

3 讨 论

近年来, 肺癌在中国的发病率和死亡率逐年升高, 虽然肺癌的诊断方法和治疗手段不断进步, 但肺癌的死亡率仍无明显下降。肺癌的治疗手段仍以手术及放化疗为主。随着医学技术的发展, 靶向药物是目前治疗肺癌最有希望的方法之一, 靶向治疗已经在肺癌的临床应用中取得了明显疗效, 而且不良反应较轻^[5-6]。国内外大量研究证实, 肺癌患者 EGFR 基因突变状态与吉非替尼、盐酸厄洛替尼等靶向药物的疗效密切相关, EGFR 突变者的患者使用此类靶向药物治疗疗效显著, 能够延长患者的生存期, 改善患者生活质量^[7-9]。但是, 由于大部分非小细胞肺癌患者确诊时已处于晚期, 失去了手术治疗的机会, 临床难以获得足够组织标本用于 EGFR 基因突变状态的检测。

EGFR 基因突变是肿瘤特异性的体细胞遗传改变, 这类突变基因仅存在于癌细胞中, 体内所有正常细胞均属于野生型^[10]。研究证实, 血清游离 DNA 是一种存在于体液中的游离状态的 DNA, 正常人的外周血游离 DNA 来源于淋巴细胞或其他有核细胞, 肿瘤患者的外周血游离 DNA 主要来源于肿瘤细胞的坏死或凋亡、循环肿瘤细胞裂解所释放, 血清游离 DNA 与恶性肿瘤组织 DNA 具有相同的遗传变异特性^[11-12]。因此, 理论上通过检测血清游离 DNA 的 EGFR 基因突变, 可以间接反映肺癌患者肿瘤组织的 EGFR 基因突变状态, 从而为临床应用靶向药物治疗提供依据, 同时以血浆为标本具有非创伤性和可重复性的特点, 可以动态监测 EGFR 基因突变状态。

本研究发现, 在 32 例肺癌患者的外周血标本中, 共检测到 13 份 EGFR 突变, 总体突变率达 40.6%, 进一步分析发现, 外周血 EGFR 基因的突变状态与性别、病理类型具有密切的相关性, 与既往以肿瘤组织为检测标本的研究结果一致^[13]。另外, 在本研究中发现外周血 EGFR 基因突变与肿瘤组织一致性达 81.2%, 本试验结果显示外周血 EGFR 基因突变为阳性结果, 其对应的肿瘤组织检测 EGFR 基因突变也为阳性, 提示外周血检测 EGFR 基因突变结果可以间接反映患者肿瘤组织的 EGFR 突变状态。此结果与许多报道的结果一致, 如 Kimura 等^[14]国外学者报道肿瘤组织及外周血 EGFR 检测的一致性为 93%, 而国内黄进肃等^[15]学者也报道了极好的一致性 (100%), 虽然本研究结果稍低于已有的报道, 考虑与选择的样本量较少及检测方法不同有关。因此, 对于晚期 NSCLC 患者不能获得肿瘤组织标本时, 使用血浆中的游离 DNA 替代组织

标本进行 EGFR 突变检测是可行的, 可以作为临床应用靶向药物治疗肺癌的依据。但由于外周血肿瘤细胞的数量较肿瘤组织少, 可能存在假阴性的可能, 在本研究中就发现了 3 份肿瘤组织中检测到 EGFR 突变但外周血游离 DNA 中未检测到。

对于晚期 NSCLC 患者无法获得肿瘤组织时, 可以使用外周血替代肿瘤组织进行突变检测, 采用外周血标本进行 EGFR 突变检测, 具有无创性、实时性和动态性的特点, 患者易于接受。可作为临床分子靶向治疗个体化预测的有效选择之一。

参考文献

[1] Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma[J]. N Engl J Med, 2009, 361(10): 947-957.

[2] Rosell R, Moran T, Queralt C, et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung Cancer[J]. N Engl J Med, 2009, 361(10): U38-958.

[3] Gatzemeier U, Pluzanska A, Szczesna A, et al. Phase III study of erlotinib in combination with cisplatin and gemcitabine in advanced non-small-cell lung Cancer: the Tarceva Lung Cancer Investigation Trial[J]. J Clin Oncol, 2007, 25(12): 1545-1552.

[4] Morita S, Okamoto I, Kobayashi K, et al. Combined survival analysis of prospective clinical trials of gefitinib for non-small cell lung Cancer with EGFR mutations[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(13): 4493-4498.

[5] 乔建兵, 陈文萍. 比较吉非替尼与化疗一线治疗晚期非小细胞肺癌的 Meta 分析[J]. 临床肿瘤学杂志, 2013, 18(5): 426-430.

[6] Kim DW, Lee SH, Lee JS, et al. A multicenter phase II study to evaluate the efficacy and safety of gefitinib as first-line treatment for Korean patients with advanced pulmonary adenocarcinoma harboring EGFR mutations[J]. Lung Cancer, 2011, 71(1): 65-69.

[7] Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung Cancer with mutated EGFR[J]. N

Engl J Med, 2010, 362(25): 2380-2388.

[8] Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung Cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJ-TOG3405): an open label, randomised phase 3 trial[J]. Lancet Oncol, 2010, 11(2): 121-128.

[9] Fukuoka M, Wu YL, Thongprasert S, et al. Biomarker analyses and final overall survival results from a phase III, randomized, open-label, first-line study of gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients with advanced non-small-cell lung Cancer in Asia (IPASS)[J]. J Clin Oncol, 2011, 29(21): 2866-2874.

[10] Chintala L, Kurzrock R. Epidermal growth factor receptor mutation and diverse tumors: case report and concise literature review [J]. Mol Oncol, 2010, 4(4): 306-308.

[11] Jahr S, Hentze H, Engelsch S, et al. DNA fragments in the blood plasma of Cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells[J]. Cancer Res, 2001, 61(4): 1659-1665.

[12] Vlassov VV, Laktionov PP, Rykova EY. Circulating nucleic acids as a potential source for Cancer biomarkers[J]. Curr Mol Med, 2010, 10(2): 142-165.

[13] 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.

[14] Kimura H, Suminoe M, Kasahara K, et al. Evaluation of epidermal growth factor receptor mutation status in serum DNA as a predictor of response to gefitinib (IRESSA) [J]. Br J Cancer, 2007, 97(6): 778-784.

[15] 黄进肃, 董强刚, 许凯黎, 等. 血清循环 DNA 的 EGFR 基因突变与肺癌选择性靶向治疗研究[J]. 肿瘤, 2007, 27(12): 968-972.

(收稿日期: 2015-01-02)

(上接第 1184 页)

in children with chronic renal diseases[J]. Pediatr Int, 2010, 52(4): 563-568.

[5] Randers E, Erlandsen EJ. Serum cystatin C as an endogenous marker of the renal function—a review[J]. Clin Chem Lab Med, 1999, 37(4): 389-395.

[6] Kim SS, Song SH, Kim IJ, et al. Clinical implication of urinary tubular markers in the early stage of nephropathy with type 2 diabetic patients[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2012, 97(2): 251-257.

[7] Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation[J]. Diabet Med, 1998, 15(7): 539-553.

[8] Jefferson JA, Shankland SJ, Pichler RH. Proteinuria in diabetic kidney disease: a mechanistic viewpoint[J]. Kidney Int, 2008, 74(1): 22-36.

[9] Kanauchi M, Nishioka H, Hashimoto T, et al. Diagnostic signifi-

cance of urinary transferrin in diabetic nephropathy [J]. Nihon Jinzo Gakkai Shi, 1995, 37(11): 649-654.

[10] Lebkowska U, Malyszko J, Lebkowska A, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin and cystatin C could predict renal outcome in patients undergoing kidney allograft transplantation: a prospective study[J]. Transplant Proc, 2009, 41(1): 154-157.

[11] Abassi Z, Sagi O, Armaly Z, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NAGL): a novel biomarker for acute kidney injury[J]. Harefuah, 2011, 150(2): 111-116.

[12] Fassett RG, Robertson IK, Ball MJ, et al. Effects of atorvastatin on NGAL and cystatin C in chronic kidney disease: a post hoc analysis of the Lord trial[J]. Nephrol Dial Transplant, 2012, 27(1): 182-189.

[13] 李培敏, 陶庆枢. 血清胱抑素 C 与超敏 C 反应蛋白联检诊断早期糖尿病肾损伤的价值[J]. 现代医院, 2007, 7(4): 19.

(收稿日期: 2015-01-11)