

## 论著·临床研究

# Sanger 测序与 ARMS-PCR 在非小细胞肺癌 EGFR 基因突变检测中的比较及应用评价<sup>\*</sup>

葛 闻,易 琳,唐万燕,吴明凤,杨 薇,辇伟奇<sup>△</sup>

(重庆大学附属肿瘤医院/重庆市肿瘤研究所/重庆市肿瘤医院,肿瘤转移与个体化诊治转化研究重庆市重点实验室,重庆 400030)

**摘要:**目的 比较 Sanger 测序法与 ARMS-PCR 法检测肺癌表皮生长因子受体(EGFR)基因突变的差异,评价两种基因突变检测方法用于目标人群的临床应用价值。方法 收集 2016 年 4—9 月 123 例非小细胞肺癌(NSCLC)患者标本。用 Sanger 测序法与 ARMS-PCR 法检测 EGFR 基因第 18~21 号外显子基因突变,分析两种检测手段之间的方法学差异以及临床病理行为对基因突变的影响,随访并比较受检人群的生存状况。结果 Sanger 测序法 EGFR 基因突变总检出率为 36.6%(45/123),ARMS-PCR 法基因突变总检出率为 48.0%(59/123)。Sanger 测序与 ARMS-PCR 两种方法在不同类型标本中的阳性率分别是手术标本:35.8%(19/53)与 49.1%(26/53),穿刺标本:50.0%(11/22)与 54.5%(12/22),纤维支气管镜标本:30.0%(3/10)与 40.0%(4/10),胸水标本:31.6%(12/38)与 44.7%(17/38)。EGFR 基因突变多见于≤65 岁(54.2%)、女性(61.0%)、非吸烟(60.6%)、腺癌(50.9%)人群。未接受靶向治疗组与接受靶向治疗的 Sanger 阳性患者组、ARMS-PCR 阳性患者组的治疗效果差异均有统计学意义( $\chi^2=4.797, P=0.029$ ;  $\chi^2=7.270, P=0.007$ ),Sanger 组敏感突变患者与 ARMS-PCR 组敏感突变患者接受 TKIs 的疗效差异无统计学意义( $\chi^2=0.141, P=0.708$ )。结论 两种检测方法对 NSCLC 患者的靶向治疗决策均具有积极意义,但基于灵敏度更高、操作更简便的最优原则,ARMS-PCR 法在临床实践中更具优势。

**关键词:**非小细胞肺癌; 表皮生长因子受体; Sanger 测序; ARMS-PCR; 靶向治疗

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2018.21.015      **中图法分类号:**R-331;R734.2

**文章编号:**1673-4130(2018)21-2648-06

**文献标识码:**A

## Comparison and application evaluation of Sanger sequencing and ARMS-PCR in detecting EGFR gene mutation in non-small cell lung cancer<sup>\*</sup>

GE Chuang, YI Lin, TANG Wanyan, WU Mingfeng, YANG Wei, NIAN Weiqi<sup>△</sup>

(Chongqing Key Laboratory of Translational Research for Cancer Metastasis and Individualized Treatment, Chongqing Cancer Hospital Affiliated to Chongqing University/Chongqing Cancer Research Institute/Chongqing Cancer Hospital, Chongqing 400030, China)

**Abstract: Objective** To investigate the differences between Sanger sequencing and ARMS-PCR for the detection of the epidermal growth factor receptor (EGFR) gene mutations in lung cancer, and to evaluate the clinical application of the two methods for target populations. **Methods** A total of 123 specimens were obtained from non small cell lung cancer(NSCLC) patients during April and September in 2016. The mutations in exons 18,19,20 and 21 of EGFR were detected by both Sanger sequencing and ARMS-PCR. The methodological differences between the two methods and the influence of clinicopathological behavior on gene mutation were analyzed. The survival status of the subjects was followed up and compared. **Results** The total detection rate of Sanger sequencing method was 36.6%(45/123), and the total detection rate of ARMS-PCR mutation was 48.0%(59/123). The positive rates of Sanger sequencing and ARMS-PCR were 35.8%(19/53) and 49.1%(26/53) of operative specimens, 50.0%(11/22) and 54.5%(12/22) of puncture specimens, 30.0%(3/10) and 40.0%(4/10) of bronchoscopy specimens, 31.6%(12/38) and 44.7%(17/38) of pleural effusion specimens, respectively. EGFR mutations were more common in young≤65 years old people (54.2%), female

\* 基金项目:重庆市科委社会事业与民生保障科技创新专项基金资助项目(cstc2016shmszx130042)。

作者简介:葛闻,男,技师,主要从事肿瘤分子生物学研究。 △ 通信作者,E-mail:nwqone@126.com。

本文引用格式:葛闻,易琳,唐万燕,等. Sanger 测序与 ARMS-PCR 在非小细胞肺癌 EGFR 基因突变检测中的比较及应用评价[J]. 国际检验医学杂志,2018,39(21):2648-2653.

(61.0%), non-smoking (60.6%), adenocarcinoma (50.9%). There was a significant difference in the treatment effect between the untargeted treatment group and the targeted therapy ( $P<0.05$ ). There was no statistical difference in the efficacy of targeted therapy between the Sanger group and the ARMS-PCR group that received targeted therapy ( $\chi^2=0.141, P=0.708$ ). **Conclusion** Both of the two methods have positive significance for the targeted treatment decision of NSCLC patients, but ARMS-PCR has more advantages in clinical practice based on the principle of higher sensitivity and simpler operation.

**Key words:** non small cell lung cancer; epidermal growth factor receptor; Sanger sequencing; ARMS-PCR; targeted therapy

非小细胞肺癌(NSCLC)是病死率最高的恶性肿瘤之一<sup>[1-2]</sup>,大部分患者发现时已是晚期且预后很差,近10年来以化疗为主的治疗手段并未使NSCLC的疗效获得突破性进展。因此,NSCLC分子靶向治疗成为研究的热点,在众多的分子靶向药物中表皮生长因子受体(EGFR)-TKIs的治疗效果尤为令人瞩目<sup>[3]</sup>。目前,在肿瘤基因检测中组织样本依然是最重要的信息载体<sup>[4]</sup>。本研究旨在用Sanger测序法与ARMS-PCR法同步检测NSCLC患者的组织样本<sup>[5]</sup>,通过数据统计分析,以期为临床制订治疗方案提供支持。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集本院2016年4—9月经病理组织学确诊的肺癌患者的原发或转移灶标本123例。参照2015年世界卫生组织肺肿瘤分类及诊断标准,病理组织分型包括腺癌108例,鳞癌15例。肿瘤分期依据国际抗癌联盟(UICC)第7版TNM分期,包括I~Ⅲ期肺癌38例,Ⅳ期肺癌85例。组织学分类明确,其中手术标本53例,穿刺标本22例,胸水标本38例,纤维支气管镜标本10例。石蜡标本以10%中性福尔马林固定,常规石蜡包埋封存。本研究获得医院医学伦理学委员会批准,临床资料及标本采集均获患者知情同意。

**1.2 仪器与试剂** Stratagene Mx3000P PCR仪(美国Agilent Technologies), Applied Biosystems 3500Dx基因分析仪(美国ABI公司),2000超微量分光光度计(美国NanoDrop公司);1248冰冻离心机(Gene公司),血液/细胞/组织基因组DNA提取试剂盒(天根公司),EGFR基因突变检测试剂盒(测序法,广州立菲达安公司,规格为20T/盒),人类EGFR基因突变检测试剂盒(荧光PCR法,AmoyDx公司,规格为12T/盒)。

## 1.3 方法

**1.3.1 核酸提取** 基因组DNA提取,石蜡组织DNA抽提采用TIANGEN试剂盒。刮取3~5片5 $\mu\text{m}$ 厚的石蜡切片放于1.5 mL的Axygen管中,用1.0 mL的二甲苯将组织表面的蜡层脱去,1.0 mL的无水乙醇洗去多余的二甲苯得到组织匀浆;加入200 $\mu\text{L}$ 的缓冲液及20 $\mu\text{L}$ 的蛋白酶,混匀后放入温度已升至56℃的恒温加热器中,孵育1~3 h,掌式离心机

离心5~10 s;加入200 $\mu\text{L}$ 的无水乙醇沉淀DNA;将上面得到的溶液及沉淀加入吸附柱中,12 000 r/min,30 s;依次加入缓冲液GD、PW分别洗去蛋白质、盐离子;根据情况,加入50~200 $\mu\text{L}$ 的洗脱缓冲液TE,室温放置2~5 min,12 000 r/min,2 min,将溶液收集到离心管中,用NanoDrop 2000分光光度计进行核酸样本的质量评估和浓度检测,提取的DNA如不能立即使用可于-20℃环境中保存但不超过24 h,长期保存需在-80℃环境。

**1.3.2 Sanger测序分析** 采用PCR仪分别对EGFR基因的第18、19、20及21号4个外显子进行扩增。4种外显子扩增片段大小分别约为382、297、390、304 bp。第一次PCR体系为50 $\mu\text{L}$ ,扩增条件为50℃,2 min;95℃,15 min预变性;94℃,30 s,55℃,30 s,72℃,45 s,共40个循环;最后72℃延伸7 min。用柱子法对PCR产物进行纯化。测序PCR体系为测序染料(BigDye)2 $\mu\text{L}$ ,测序反应液(BigDye Sequencing Buffer)3 $\mu\text{L}$ ,测序引物1 $\mu\text{L}$ ,PCR产物10~50 ng,灭菌超纯水补齐20 $\mu\text{L}$ ,扩增程序为96℃1 min;96℃10 s,50℃5 s,60℃4 min,共25个循环;4℃保温。测序产物采用Life公司纯化试剂进行纯化,纯化产物加入10 $\mu\text{L}$ Hi-Di Formamide充分溶解,然后95℃变性5 min并迅速置冰中冷却4 min。变性后的测序产物依次加入3500Dx基因分析仪进行测序分析。该实验同时采用4个质控品进行测序质量控制,具体为阴性质控品无测序峰;野生型阳性质控品应有明显的测序峰且信号强度>800,同时测序峰各自独立,无明显交叉,燃料峰与乙醇峰在可控范围内,其测序信号与标准野生型信号保持一致;19号外显子突变型阳性质控品应与E746-A750del(2)突变型保持一致;21号外显子突变型阳性质控品应与L858R突变型信号保持一致。在同时满足4个质控品标准的情况下,与标准序列比对每一例检测样本的测序信号,确定其是否突变。

**1.3.3 ARMS-PCR分析** EGFR反应混合液和Taq酶置于冰上解冻,振荡混匀,并快速离心15 s待用。向42.3 $\mu\text{L}$ 待测样品DNA中加入2.7 $\mu\text{L}$ Taq酶,涡旋器上混匀10~15 s,然后快速离心5~6 s。依次取5.0 $\mu\text{L}$ 混好的DNA样品沿着PCR管壁加入8联PCR反应管中,闭盖,上机运行实验。PCR循环参

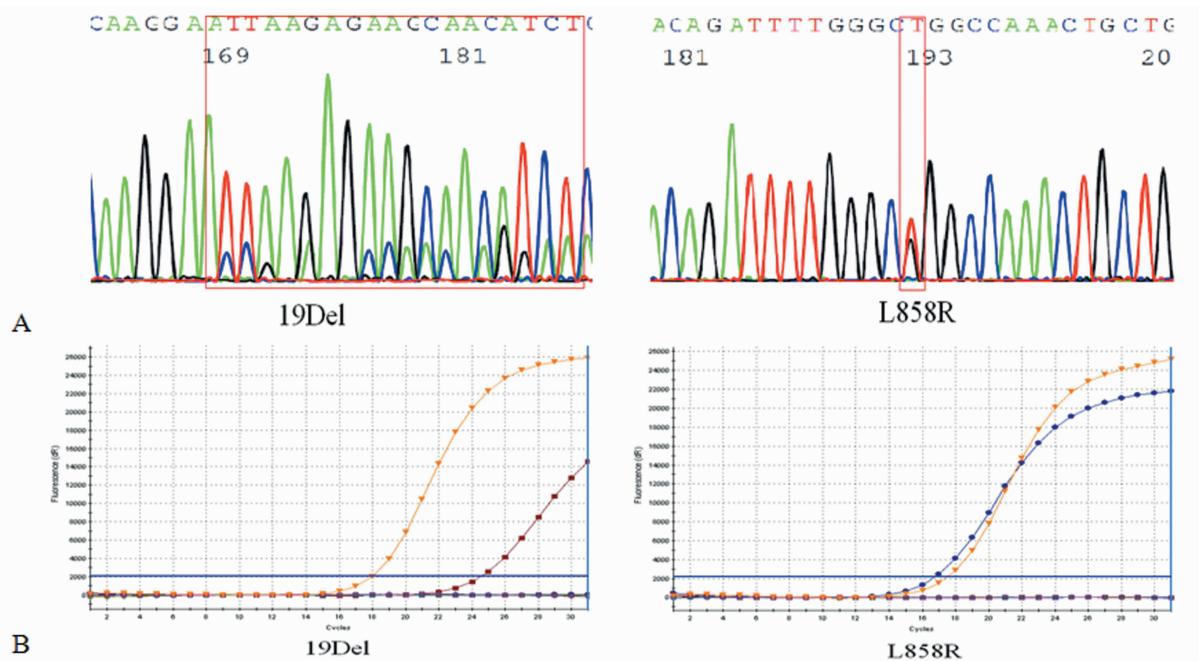
数:95 °C 预变性 5 min;95 °C 25 s, 64 °C 20 s, 72 °C 20 s, 共 15 个循环;93 °C 25 s, 60 °C 35 s, 72 °C 20 s, 共 31 个循环。为保证检测结果的可靠, ARMS-PCR 分析采取阴阳对照+内控+外控的多重质控措施。具体为阴性对照的 1~7 号管的 FAM 信号应无扩增曲线升起, 若 7 管其中任一管 FAM 信号升起, 则此次实验结果无效; 阳性质控品的 Ct 值一般<20; 内控即为检测样本或阴阳对照品的 1~7 号管的 HEX 信号, 正常情况下 HEX 信号应有明显升起, 此措施主要监控每一管是否漏加核酸; 外控即为检测样本或阴阳对照品的 8 号管的 FAM 信号, 正常情况下该信号应有明显升起, 此措施主要监控样本的核酸质量。若阴阳对照均正常, 则初步判断该批次实验满足检测要求, 需查看检测样本的内控信号是否正常, 若内控正常, 接下来需查看外控的 FAM 信号是否升起, 若外控信号升起且其 Ct 值在 15~21, 即可判断该检测样本符合检测要求。用检测样本的突变 CT 值与临界值 ( $\Delta CT = \text{突变 Ct} - \text{外控 Ct}$ ) 判读 EGFR 是否发生了突变。若突变信号 CT 值<26, 则直接判读该突变类型为强阳性突变; 若  $26 \leq CT < 29$ , 同时符合 19Del 检测孔的  $\Delta CT < 11$ , L858R<11, T790M<7, 20Ins<9, G719X<7, S768I<8, L861Q<8 任何一种及以上, 则判定该样本为突变。

#### 1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分

析。计数资料以率(%)表示, 采用  $\chi^2$  检验或 Fisher's 精确检验分析不同临床病理特征(性别、吸烟史、组织分型和临床分期)患者之间 EGFR 基因突变率的统计学差异, 生存曲线分析用 Graph Pad Prism 5 软件进行分析制作。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 两种方法检测结果比较** Sanger 测序法共检测到 EGFR 基因突变有 45 例。其中 EGFR 第 19 号外显子 E746-A750del 阳性样本有 11 例, E747\_S752del 阳性样本 11 例, E746\_S752del 阳性样本 1 例; 第 20 号外显子 T790M 阳性样本 1 例, V769\_D770insASV 阳性样本 1 例; 第 21 号外显子 L858R 阳性样本有 17 例, L861Q 阳性样本 2 例, L858R、20Ins 双阳性样本 1 例, 总阳性率为 36.6%。其中 19Del、T790M、V769\_D770insASV、L858R 突变数分别占阳性标本的 51.1%、4.4%、44.4%, 且所有 EGFR 点突变或缺失均为杂合型, 没有检测到 18 号外显子 c. 2156 位点突变、19 号外显子其他点突变。ARMS-PCR 法分析共检出 59 例 EGFR 基因突变患者, 其中第 19 号外显子 19Del 突变 29 例; 第 20 号外显子 T790M 突变 1 例, 20Ins 突变 1 例, S768I 突变 1 例; 第 21 号外显子 L858R 突变 23 例, L858R、20Ins 双突变 1 例, L861Q 突变 3 例; 同样未发现第 18 号外显子 c. 2156 位点突变。两种检测方法结果比较见图 1、表 1。



注:A 为 Sanger 测序图,B 为 ARMS-PCR 图

图 1 Sanger 测序与 ARMS-PCR 典型检测结果代表图

**2.2 Sanger 测序法和 ARMS-PCR 法检测不同类型标本 EGFR 突变** Sanger 测序法和 ARMS-PCR 法检测不同类型标本结果见表 2。在 53 例手术标本中, Sanger 测序法检出突变者 19 例, 阳性率为 35.8%; ARMS 法检测到突变者 26 例, 突变率为 49.1%。22

例穿刺标本中, Sanger 测序法检出突变者 11 例, 阳性率为 50.0%; ARMS 法检测到突变者 12 例, 突变率为 54.5%。10 例纤维支气管镜标本中, Sanger 测序法检出突变者 3 例, 阳性率为 30.0%; ARMS 法检测到突变者 4 例, 突变率为 40.0%。38 例胸水标本中,

Sanger 测序法检出突变者 12 例, 阳性率为 31.6%; ARMS 法检测到突变者 17 例, 突变率为 44.7%。在

临床样本检测中, ARMS 法较 Sanger 测序法拥有更高的突变检出率。

表 1 Sanger 测序法和 ARMS-PCR 法检测结果比较

突变区域	Sanger 测序		ARMS-PCR	
	突变类型	阳性例数(n)	突变类型	阳性例数(n)
EXON19	E746-A750del	11	19Del	29
	E747_S752del	11		
	E746_S752del	1		
EXON20	T790M	1	T790M	1
	V769_D770insASV	1	20Ins	1
			S768I	1
EXON21	L858R	17	L858R	23
	L861Q	2	L861Q	3
EXON20/21	L858R+20 Ins	1	L858R+20 Ins	1

表 2 Sanger 测序法和 ARMS-PCR 法检测不同类型标本 EGFR 突变[n(%)]

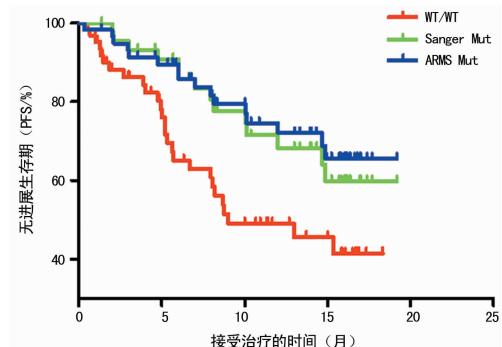
标本类型	n	Sanger 测序	ARMS-PCR
手术标本	53	19(35.8)	26(49.1)
穿刺标本	22	11(50.0)	12(54.5)
纤维支气管镜标本	10	3(30.0)	4(40.0)
胸水标本	38	12(31.6)	17(44.7)
总计	123	45(36.6)	59(48.0)

表 3 EGFR 基因突变与临床、病理特征

项目	n	EGFR 突变[n(%)]	$\chi^2$	P
年龄(岁)				
≤65	83	45(54.2)	3.994	0.046
>65	40	14(35.0)		
性别				
女	59	36(61.0)	7.736	0.005
男	64	23(36.0)		
吸烟				
无	71	43(60.6)	10.676	0.001
有	52	16(30.8)		
组织类型				
鳞癌	15	4(26.7)	3.106	0.078
腺癌	108	55(50.9)		
临床分期				
<4	38	21(55.3)	2.716	0.279
≥4	85	38(44.7)		
合计	123	59(48.0)		

**2.3 EGFR 基因突变与患者临床病理特征之间的关系** EGFR 基因突变与患者的临床参数及病理特征关系见表 3。女性患者 EGFR 基因突变率显著高于男性( $P=0.05$ );未吸烟患者阳性率明显高于吸烟患

者( $P<0.05$ );≤65 岁患者的阳性率(54.2%)远高于>65 岁患者的阳性率(35.0%),差异有统计学意义( $P<0.05$ );组织分型中腺癌与鳞癌 EGFR 突变率虽差异无统计学意义( $P>0.05$ ),但腺癌 EGFR 突变率(50.9%)远高于鳞癌(26.7%);临床分期中 EGFR 突变率差异无统计学意义( $P>0.05$ )。



注:红线为 ARMS-PCR 法和 Sanger 测序法均检测 EGFR 野生型患者,未接受靶向治疗;绿线为 Sanger 测序法检测出靶向药敏感突变者,接受靶向治疗;蓝线为 ARMS-PCR 法检测出靶向药敏感突变型患者,接受靶向治疗

图 2 3 组患者接受治疗的无进展生存期分析

**2.4 EGFR 基因突变与 EGFR-TKI 疗效** 共 123 例患者接受随访,其中 64 例用 Sanger 测序法与 ARMS-PCR 检测均为 EGFR 野生型或 EGFR 耐药突变,未接受 EGFR-TKI 治疗;Sanger 测序法测序结果为阳性的样本有 45 例,接受 EGFR-TKIs 治疗;ARMS-PCR 法阳性样本有 59 例,同样接受 EGFR-TKIs 治疗。未接受靶向治疗的 64 例患者的无进展生存时间为 9 个月;两种方法均为阳性且接受靶向治疗的患者仍在进一步随访中。未接受靶向治疗组与接受靶向治疗的 Sanger 阳性患者组、ARMS-PCR 阳性患者组的治疗效果差异均有统计学意义( $\chi^2=4.797, P=0.029$ ;  $\chi^2=7.270, P=0.007$ );值得注意的是,在接受

靶向治疗的 Sanger 测序组、ARMS-PCR 组随访患者中,靶向治疗的疗效差异无统计学意义( $\chi^2=0.141$ , $P=0.708$ )。见图 2。

### 3 讨 论

肺癌是威胁人类健康的主要恶性肿瘤之一,传统的化疗和放疗由于缺乏特异性,在获得疗效的同时往往也杀伤了大量正常的人体细胞,给患者带来较大的毒副作用,严重影响患者的生存和生活质量。吉非替尼作为近年肺癌靶向治疗领域的一个里程碑,其以 EGFR 分子作为靶标的治疗模式正在改变人们对肺癌治疗的认知<sup>[6-7]</sup>。目前针对 EGFR 基因突变检测的方法种类繁多,主要有 ARMS-PCR 法、Sanger 测序法、高分辨率熔解曲线法、高效液相色谱分析法,以及高通量测序法<sup>[8]</sup>等,而 Sanger 测序法、ARMS-PCR 法是主流检测平台。Sanger 测序法是最早应用于 EGFR 基因突变检测的技术之一,也是 EGFR 检测的金标准,其最大的优势在于可检测靶标区域的所有突变类型,尤其是一些罕见突变类型<sup>[9]</sup>。Sanger 测序法的方法学基础是毛细管电泳,因此,其对标本的质量要求较高,通常需要突变细胞占总量的 20% 以上;根据 Life 公司的特殊算法,可使 Sanger 测序法的灵敏度大幅提升,也可检出突变丰度为 5% 的各型突变。ARMS-PCR 法利用特异引物对突变靶序列进行高精度扩增放大,在实时荧光定量 PCR 平台上实现对样品 DNA 的检测,以达到对基因突变检测的高特异度和高灵敏度。但利用特异性引物检测也意味着 ARMS-PCR 法只能检测出已知突变类型。

本研究比较了 ARMS-PCR 与 Sanger 测序法检测 NSCLC 患者 EGFR 变异分布,结果表明 ARMS-PCR 法的 EGFR 突变总阳性率为 48.0%,高于 Sanger 测序法的 36.6%。两种检测方法的结果均表明 19Del、L858R 是主要突变类型,在突变患者中占比分别达到 42.4%、33.9%;标本类型是影响 EGFR 阳性率的重要因素,其中 EGFR 阳性率最高的标本类型是穿刺标本,ARMS-PCR 与 Sanger 测序法阳性率分别是 54.5%、50.0%;其次是手术标本,ARMS-PCR 与 Sanger 测序法阳性率分别为 49.1%、35.8%;纤维支气管镜标本和胸水标本阳性率最低。与传统认知不同的是,手术标本的阳性率并不是最高,这可能与肿瘤的空间异质性有关,在取样及病理切片过程中容易出现突变细胞或组织的丢失;随着现代肿瘤定位技术的快速发展,穿刺的精度越来越高,肿瘤的空间异质性在穿刺标本上反而不明显。

综合研究了常见的病理特征如年龄、性别、吸烟史、组织类型、以及临床分期与 EGFR 基因突变的关系<sup>[10-11]</sup>,结果表明患者的年龄、性别、吸烟史是影响 EGFR 阳性检出重要的影响因子。其中年轻的不吸烟女性患者是 EGFR 阳性检出的最显著特征人群<sup>[12-13]</sup>。腺癌与鳞癌患者、临床分期之间的阳性检出

率差异不显著。目前对于肺鳞癌的研究报道较少,国外文献报道其阳性率为 3%~5%<sup>[14]</sup>,本研究中鳞癌患者入组较少,最终结论尚需更大样本研究支持。一直以来晚期肺癌患者是研究的焦点,但也有研究显示肿瘤直径是影响 EGFR 阳性检出的重要因子,YANO 等<sup>[15]</sup>研究发现直径≤3 cm 的肿瘤患者阳性率最高,早期患者同样具有较高 EGFR 基因突变检出可能。

本研究共 123 例患者接受随访,其中 64 例用 Sanger 测序法与 ARMS-PCR 检测均为 EGFR 野生型或 EGFR 耐药突变,未接受 EGFR-TKI 治疗;Sanger 测序法测序结果为阳性的样本有 45 例,接受靶向治疗;ARMS-PCR 法阳性样本有 59 例,同样接受靶向治疗。未接受靶向治疗的 64 例患者的无进展生存时间为 9 个月;两种方法均为阳性且接受靶向治疗的患者仍在进一步随访中。未接受靶向治疗组与接受靶向治疗的 Sanger 阳性患者组、ARMS-PCR 阳性患者组的治疗效果差异均有统计学意义( $\chi^2=4.797$ , $P=0.029$ ; $\chi^2=7.270$ , $P=0.007$ );有文献报道血浆中 EGFR 突变丰度高的患者接受 EGFR-TKIs 治疗疗效较好<sup>[16]</sup>,但本研究表明接受靶向治疗的 Sanger 测序组、ARMS-PCR 组随访患者中,靶向治疗的疗效差异无统计学意义( $\chi^2=0.141$ , $P=0.708$ ),这种差异可能与组织标本更适合反映基因突变含量而不是突变丰度有关。

综上所述,Sanger 测序法与 ARMS-PCR 法在 EGFR 敏感突变患者的疗效预测方面不具有显著性差异,因此,两种检测方法的优劣评价应该更多地集中在临床应用方面。从检测灵敏度方面来看,ARMS-PCR 法要优于 Sanger 测序法,前者 48.0% 的阳性检出率远高于后者的 36.6%,而这意味着更多的肿瘤患者将从 ARMS-PCR 的检测中获益。就特异度而言,Sanger 测序法可以直接读取高频突变的外显子区域的基因信息,显然能够很好地解决 ARMS-PCR 无法回避的假阴性问题。从操作的简易程度看,Sanger 测序因为需要对测序样品进行两轮 PCR 扩增和 2 轮纯化步骤才能进行序列分析,步骤多且耗时较长,增加了出现错误的概率;而 ARMS-PCR 仅需 2 h 即可完成检测分析。从检出通量上看,Sanger 测序法可以一次完成 24 例样本的 4 个外显子检测,高于 ARMS-PCR 最常见的 12 例样本。但由于 ARMS-PCR 的 12 例样本通量是同时检测,而 Sanger 测序法如果采用 8 通道的检测方式,完成 24 例样本检测需要 12 轮才能完成,因此,ARMS-PCR 的实际检测通量要高于 Sanger 测序法。从经济角度看,Sanger 测序法需要特殊且昂贵的设备,同时对环境要求较高;而 ARMS-PCR 对仪器和环境的适应性更强。

### 4 结 论

目前,Sanger 测序与 ARMS-PCR 是肺癌基因检测的主流应用平台,两种检测方法对临床医生为

NSCLC 患者制订个性化的治疗方案均具有积极意义,但基于检测方法灵敏度更高、操作更简便的最优原则,ARMS-PCR 法在临床实践中更具优势。因此,Sanger 测序法适合兼具教学及科研任务的实验室开展,而 ARMS-PCR 似乎更适合以临床应用为主的检测单位使用。值得注意的是,当前高通量测序技术及市场应用愈发成熟,同时可以为临床医生提供更全面的患者基因数据支撑,代表了肿瘤精准检测的发展方向之一。

## 参考文献

- [1] FADI S,WISSLAM H. Targeted therapies in non-small cell lung carcinoma: what have we achieved so far[J]. Ther Adv Med Oncol,2013,5(4):249-270.
- [2] BENNETT C W,BERCHEM G,KIM Y J,et al. Cell-free DNA and next-generation sequencing in the service of personalized medicine for lung cancer [J]. Oncotarget, 2016,7(43):71013-71035.
- [3] WANG J,WANG B C,CHU H L,et al. Intrinsic resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in advanced non-small-cell lung cancer with activating EGFR mutations [J]. Onco Targets Ther,2016,9:3711-3726.
- [4] MORGENSEN D,CAMPO M J,DAHLBERG S E, et al. Molecularly targeted therapies in non-small-cell lung cancer annual update 2014[J]. J Thorac Oncol,2015,10(1 Suppl 1):S1-63.
- [5] SCHMID-BINDERT G,WANG Y S,JIANG H B,et al. EBUS-TBNA provides highest RNA yield for multiple biomarker testing from routinely obtained small biopsies in non-small cell lung cancer patients - a comparative study of three different minimal invasive sampling methods[J]. PLoS One,2013,8(10):e77948.
- [6] DRAGOWSKA W H,WEPPLER S A,WANG J C,et al. Induction of autophagy is an early response to gefitinib and a potential therapeutic target in breast cancer [J]. PLoS One,2013,8(10):e76503.
- [7] BENLLOCH S,BOTERO M L,BELTRAN-ALAMILLO J,et al. Clinical validation of a PCR assay for the detection of EGFR mutations in non-small-cell lung cancer: retrospective testing of specimens from the EURTAC trial[J]. PLoS One,2014,9(2):e89518.
- [8] SHI X H,WU H W,LU J L,et al. Screening for major driver oncogene alterations in adenosquamous lung carcinoma using PCR coupled with next-generation and Sanger sequencing methods[J]. Sci Rep,2016,6:22297.
- [9] ALTIMARI A,DE BIASE D,DE MAGLIO G,et al. 454 next generation-sequencing outperforms allele-specific PCR, Sanger sequencing, and pyrosequencing for routine KRAS mutation analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded samples[J]. Onco Targets Ther, 2013, 6: 1057-1064.
- [10] COSTANZO R,PICCIRILLO M C,SANDOMENICO C, et al. Gefitinib in non small cell lung cancer[J]. J Biomed Biotechnol,2011,2011:815269.
- [11] TISEO M,BARTOLOTTI M,GELSOMINO F,et al. Emerging role of gefitinib in the treatment of non-small-cell lung cancer (NSCLC)[J]. Drug Des Devel Ther,2010,4 (1):81-98.
- [12] KIM H R,CHO B C,SHIM H S,et al. Prediction for response duration to epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors in EGFR mutated never smoker lung adenocarcinoma[J]. Lung Cancer,2014,83(3):374-382.
- [13] WEI W E,MAO N Q,NING S F,et al. An analysis of EGFR mutations among 1 506 cases of Non-Small cell lung cancer patients in Guangxi, China[J]. PLoS One, 2016,11(12):e0168795.
- [14] DEARDEN S,STEVENS J. Mutation incidence and coincidence in non small-cell lung cancer; meta-analyses by ethnicity and histology (mutmap)[J]. Ann Oncol, 2013, 24(9):2371-2376.
- [15] YANO M,SASAKI H,KOBAYASHI Y,et al. Epidermal growth factor receptor gene mutation and computed tomographic findings in peripheral pulmonary adenocarcinoma[J]. J Thorac Oncol,2006,1(5):413-416.
- [16] ZHOU Q,ZHANG X C,CHEN Z H,et al. Relative abundance of EGFR mutations predicts benefit from gefitinib treatment for advanced non-small-cell lung cancer[J]. J Clin Oncol,2011,29(24):3316-3321.

(收稿日期:2018-03-02 修回日期:2018-06-21)

(上接第 2647 页)

- [10] Clinical and Laboratory Standards Institute. User demonstration of performance for precision and accuracy; approved guideline; EP15-A[S]. Wayne,PA:CLSI,2001.
- [11] 张葵. 定量检测系统方法学性能验证实验的基本方法 [J]. 临床检验杂志,2009,27(5):321-323.
- [12] Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: EP6-A[S]. Wayne,PA:CLSI,2003.

- [13] Clinical and Laboratory Standards Institute. Interference testing in clinical chemistry; proposed guideline: EP7-P [S]. Wayne,PA:CLSI,1986.
- [14] Clinical and Laboratory Standards Institute. HOW to define and determine reference intervals in the clinical Laboratory;approved guideline; C28-A2[S]. 2nd ed. Wayne, PA:CISI,2000.

(收稿日期:2018-02-18 修回日期:2018-05-20)