

• 论 著 •

Super-ARMS PCR 和 ddPCR 检测晚期肺腺癌患者血浆循环肿瘤 DNA EGFR 基因 T790M 突变的临床价值研究^{*}

许万星,王 琳,郭巧梅,黄 霞,娄加陶[△]
上海交通大学附属胸科医院检验科,上海 200030

摘 要:目的 探讨超级扩增阻滞突变系统 PCR(Super-ARMS PCR)和微滴式数字 PCR(ddPCR)检测晚期肺腺癌患者经表皮生长因子受体抑制剂(EGFR-TKI)治疗后血浆循环肿瘤 DNA(ctDNA)表皮生长因子受体(EGFR)基因 T790M 突变情况和应用价值。**方法** 经 EGFR-TKI 治疗后耐药的 124 例患者分别应用 Super-ARMS PCR 法和 ddPCR 法检测 T790M 突变情况,比较 2 种方法检出率,用药时间及突变丰度的相关性。**结果** 2 种方法共检出 51 例 T790M 突变,诊断结果一致性较好,Kappa=0.756;2 种方法阳性符合率为 74.00%,阴性符合率 98.65%,总符合率 88.71%。用药超过 12 个月的患者采用 Super-ARMS PCR 法检测 T790M 突变的检出率高于用药小于 12 个月的患者($P<0.05$)。ddPCR 法检测突变丰度为 0.01%~68.10%。**结论** 2 种方法在晚期肺腺癌患者经 EGFR-TKI 治疗后 T790M 突变检测中具有较高的一致性,ddPCR 法灵敏度更高且可以提供突变丰度的信息。

关键词:微滴式数字 PCR; 超级扩增阻滞突变系统 PCR; 表皮生长因子受体抑制剂
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.07.014 **中图法分类号:**R734.2
文章编号:1673-4130(2021)07-0828-04 **文献标志码:**A

Super-ARMS PCR and ddPCR in the detection of plasma circulating tumor DNA EGFR gene T790M mutation in patients with advanced lung adenocarcinoma^{*}

XU Wanxing, WANG Lin, GUO Qiaomei, HUANG Xia, LOU Jiatiao[△]
Department of Clinical Laboratory, Chest Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China

Abstract: Objective To investigate the application value of super-amplification refractory mutation system (super-ARMS PCR) and droplet digital PCR (ddPCR) in detecting T790M mutation of epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in circulating tumor DNA (ctDNA) of patients with advanced lung adenocarcinoma after treatment with epidermal growth factor receptor inhibitor (EGFR-TKI). **Methods** A total of 124 patients with drug resistance after EGFR-TKI treatment were used to detect the T790M mutation by Super-ARMS PCR and ddPCR respectively. The detection rate of the two methods, the duration of medication and the correlation of mutation abundance were compared. **Results** A total of 51 cases of T790M mutation were detected by the two methods. The diagnosis results were consistent, Kappa=0.756; the positive coincidence rate of the two methods was 74.00%, the negative coincidence rate was 98.65%, and the total coincidence rate was 88.71%. The T790M mutation rate detected by the Super-ARMS PCR method in patients with medication for more than one year was higher than that of patients with medication for less than one year ($P<0.05$). The range of mutation abundance detected by ddPCR method was 0.01%—68.10%. **Conclusion** The two methods have high consistency in the detection of T790M mutation in patients with advanced lung adenocarcinoma after EGFR-TKI treatment. The ddPCR method is more sensitive and can provide information on mutation abundance.

Key words: droplet digital PCR; super-amplification refractory mutation system PCR; epidermal growth factor receptor

^{*} 基金项目:上海市胸科医院多学科协同临床研究创新项目(YJXT20190201);上海市胸科医院基础研究院内培育项目(2019YNJCQ01)。
作者简介:许万星,女,技师,主要从事分子检验相关研究。 [△] 通信作者,E-mail:loujiatiao@126.com。
本文引用格式:许万星,王琳,郭巧梅,等. Super-ARMS PCR 和 ddPCR 检测晚期肺腺癌患者血浆循环肿瘤 DNA EGFR 基因 T790M 突变的临床价值研究[J]. 国际检验医学杂志,2021,42(7):828-831.

有研究表明,表皮生长因子受体抑制剂(EGFR-TKI)在晚期非小细胞肺癌的治疗中取得突破性进展,对表皮生长因子受体(EGFR)基因药物敏感性的突变患者,EGFR-TKI 的疗效明显高于标准化疗方案^[1-2]。但是约 50% 耐药患者经 EGFR-TKI 治疗后可检测到 T790M 突变^[3]。第三代靶向药物对经过第一、二代 EGFR-TKI 治疗后耐药患者有良好的效果^[4]。研究证实肺癌患者外周血中循环肿瘤 DNA(ctDNA)可用于检测 EGFR 突变和 EGFR-TKI 疗效监测^[5-7]。目前,临床实验室检测 ctDNA 基因突变常用的方法包括超级扩增阻滞突变系统 PCR(Super-ARMS PCR)、微滴式数字 PCR(ddPCR)等。Super-ARMS PCR 检测特异度高,但灵敏度相对较低^[8]。ddPCR 检测灵敏度高且绝对定量。本研究以经过 EGFR-TKI 治疗后耐药的晚期肺腺癌患者为研究对象,分别采用 Super-ARMS PCR 和 ddPCR 检测 ctDNA 中 T790M 突变,比较 2 种方法的一致性和检出率,同时讨论检出率与用药时间的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2018 年 6 月至 2019 年 12 月本院确诊的肺癌患者 124 例。纳入标准:(1)经病理组织和分子分型确认为 EGFR 敏感突变型腺癌;(2)接受 EGFR-TKI 治疗,根据实体瘤的临床疗效评估标准出现一个或多个新病灶和(或)存在非目标病灶进展;(2)临床资料完整,包括性别、年龄、吸烟史、肿瘤分期、病理组织类型、用药时间和随访等。(3)有充足的血液标本。排除标准:(1)合并有严重心血管系统疾病;(2)近期内使用过免疫抑制剂。本研究经本院医学伦理委员会批准,患者均签署知情同意书。患者一般资料见表 1。

表 1 患者一般资料

项目	<i>n</i>	占比(%)
性别		
男	52	41.94
女	72	58.06
年龄(岁)		
<65	68	54.84
≥65	56	45.16
是否吸烟		
是	26	20.97
否	98	79.03
肿瘤分期		
Ⅲ期	11	8.87
Ⅳ期	113	91.13
EGFR-TKI 用药时间		
≤6 个月	9	7.26
>6 个月~12 个月	35	28.23
>12 个月~24 个月	50	40.32
>24 个月	30	24.19

1.2 仪器与试剂 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪、Qubit™ 荧光定量仪均购自美国 Thermo Fisher Sci-

entific 公司;QX200™ Droplet Digital™ PCR System ddPCR 仪、QX200 Droplet 微滴生成仪、微滴阅读仪、ddPCR™ Supermix for Probes(No dUTP)、ddPCR™ probe assay Kit 均购自美国 Bio-Rad 公司;DK-S12 型电热恒温水浴锅购自上海森信实验仪器有限公司;OSE-100C 恒温金属浴购自北京天根生化科技有限公司;YB-DX23D 电动吸引器购自上海斯曼峰有限公司;QIAamp 游离核酸纯化试剂盒购自德国 Qiagen 公司;人类 EGFR 基因突变检测试剂盒(多重荧光 PCR 法)购自厦门艾德生物医药公司。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 使用一次性乙二胺四乙酸真空抗凝采血管,采集患者静脉血 8~10 mL,以 1 600×g 在 4℃ 下离心 10 min 分离上层血浆,以 16 000×g 在 4℃ 下离心 10 min,再次分离上层血浆,-80℃ 保存备用。血浆需在采集后 2 h 内完成分离。

1.3.2 血浆 ctDNA 提取 取上述血浆 4~5 mL,按照 QIAamp 游离核酸纯化试剂盒说明书的操作步骤进行血浆 ctDNA 提取。采用 Qubit™ 荧光定量仪测定提取的核酸浓度,取吸光度(A_{260}/A_{280})在 1.8~2.0 的合格标本用于后续 EGFR 基因检测。

1.3.3 EGFR 基因检测 EGFR 基因分别使用 Super-ARMS PCR 法和 ddPCR 法进行检测。Super-ARMS PCR 法采用人类 EGFR 基因突变检测试剂盒。按照操作流程检测 T790M 的突变情况。使用 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪,探针模式设为 Reporter Dye: FAM、VIC、ROX、CY5;Quencher Dye: TAMRA;Passive Reference: NONE。总反应体系 72 μL:2.5 μL P-EGFR 反应液,67.5 μL 待测样品;2 μL P-EGFR 混合酶。PCR 反应程序:95℃ 10 min,1 个循环;95℃ 40 s,64℃ 40 s,72℃ 30 s,15 个循环;93℃ 40 s,60℃ 45 s,72℃ 30 s,28 个循环;第三阶段 60℃ 收集 FAM/VIC/ROX/CY5 信号。

ddPCR 法应用 ddPCR™ 探针检测试剂盒。反应体系 22 μL:EGFR ddPCR Supermix 10 μL,ddPCR T790M 探针引物 2 μL,待测 DNA 10 μL。将反应体系放入 8 通道微滴生成器中。将生成微滴于 QX200™ Droplet Digital™ PCR System ddPCR 仪上进行扩增。PCR 反应程序:95℃ 10 min;94℃ 30 s,70℃ 60 s,72℃ 30 s,40 个循环;98℃ 温浴 10 min,最后置于 4℃。PCR 反应后,将 96 孔板置于微滴阅读仪中,检测微滴荧光信号。采用 QuantaSoft 软件分析,2 个及以上微滴出现 FAM 信号阳性时,判断此标本为阳性,否则为阴性。根据泊松分布原理及阳性微滴的个数与比例,即可得出靶分子的起始拷贝数或浓度。

1.4 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件进行数据处理分析,计量资料以例数和百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验,一致性分析采用 Kappa 检验,以 $P<$

0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Super-ARMS PCR 法与 ddPCR 法检测结果比较 124 例患者分别进行 ddPCR 法与 Super-ARMS PCR 法检测 EGFR 基因 T790M 突变。其中 Super-ARMS PCR 法检出 T790M 突变 38 例(占 30.65%), ddPCR 法检出 T790M 突变 50 例(占 40.32%)。2 种方法检测结果一致性较好 ($Kappa = 0.756, P < 0.001$)。ddPCR 与 Super-ARMS PCR 法的阳性符合率为 74.00% (37/50), 阴性符合率为 98.65% (73/74), 总符合率为 88.71% (110/124)。14 例标本在 2 种检测方法中结果出现差异, 其中 13 例在 Super-ARMS PCR 法中检测为阴性标本, 在 ddPCR 法中检测为阳性标本, 1 例在 Super-ARMS PCR 法中检测为阳性标本, 在 ddPCR 法中检测为阴性标本。见表 2、3。

表 2 Super-ARMS PCR 法与 ddPCR 法检测结果比较(n)

Super-ARMS PCR	ddPCR		合计
	阳性	阴性	
阳性	37	1	38
阴性	13	73	86
合计	50	74	124

表 3 14 例检测结果不一致标本的信息

编号	Super-ARMS PCR	ddPCR	丰度(%)
xk-028	T790M	WT	0.01
xk-005	WT	T790M	0.80
xk-014	WT	T790M	0.27
xk-018	WT	T790M	2.80
xk-035	WT	T790M	0.60
xk-037	WT	T790M	0.21
xk-052	WT	T790M	1.70
xk-058	WT	T790M	0.60
xk-064	WT	T790M	0.24
xk-073	WT	T790M	0.22
xk-079	WT	T790M	0.10
xk-087	WT	T790M	0.16
xk-104	WT	T790M	0.50
xk-118	WT	T790M	0.10

注: WT 为未检出 T790M 突变, 即阴性标本。

2.2 T790M 检出率与用药时间相关性 所有患者经 EGFR-TKI 治疗后, 出现疾病进展的用药时间中位数为 14 个月。在所有入组患者中, 随着用药时间的增加, Super-ARMS PCR 法检出率升高, 用药时间 ≥ 12 个月患者采用 Super-ARMS PCR 法检测 T790M 突变的检出率高于用药时间 < 12 个月的患者 ($P < 0.05$), 而 ddPCR 法在不同用药时间人群中检出

率比较, 差异无统计学意义 ($P = 0.729$)。见表 4。

表 4 T790M 检出率与用药时间的关系(%)

检测方法	< 12 个月	≥ 12 个月	P
ddPCR	35.71	41.67	0.729
Super-ARMS PCR	28.60	31.30	< 0.05
总检出率	35.71	42.71	0.894

2.3 T790M 突变丰度分析 应用 ddPCR 法检测出 50 例 T790M 突变患者中, 突变丰度在 0.01%~68.10%。突变丰度 $\geq 5\%$ 的患者占 28.00% (14/50); 突变丰度为 1%~ $< 5\%$ 的患者占比较高, 占 38.00% (19/50); 突变丰度 $< 1\%$ 的患者占 34.00% (17/50), 其中突变丰度 $\leq 0.1\%$ 的患者占 4.00% (2/50)。

3 讨 论

随着肿瘤精准治疗时代的到来, 分子靶向和免疫治疗已经成为热点。由于大部分肿瘤患者在诊断时已经处于晚期, 且预后较差, 失去了手术根治的机会, 因此化疗成为临床上主要的治疗手段。但是一线含铂两药联合化疗的有效率也只有 35% 左右, 同时伴随十分明显的药物不良反应。因此, 包含 EGFR-TKI 在内的分子靶向药物为晚期非小细胞肺癌患者的治疗提供了新的方向。尽管 EGFR-TKI 治疗在 EGFR 突变的肿瘤患者中取得了比较优异的成效, 但是经过一段时间治疗后, 患者均会出现耐药情况。第三代 EGFR-TKI 对出现 T790M 突变伴疾病进展的耐药患者有较好的效果。因此在进行第三代 EGFR-TKI 治疗前, 对 EGFR 基因 T790M 突变的检测尤为重要。随着《非小细胞肺癌血液 EGFR 基因突变检测中国专家共识》的颁布^[9], 临床上对灵敏度较高的检测方法的需求更加迫切。目前各实验室常用的 EGFR 基因突变检测方法包括 ARMS PCR、Super-ARMS PCR、ddPCR、新一代测序(NGS)等^[10-11]。由于 ctDNA 具有片段小、浓度低、易降解的特点, 目前针对 ctDNA 中 EGFR 基因突变检测并没有公认的“金标准”技术。本实验室前期建立了 ctDNA ddPCR 和 NGS 检测平台, 经过验证, ddPCR 和 NGS 的灵敏度基本一致, 均可达 0.1%^[12]。ddPCR 不依赖循环阈值或内参基因, 可确定低至单拷贝的待检靶分子的绝对数目, 具有绝对定量、灵敏度高、标本需求量低、耐受性高等特点, 包括 PCR 和 NGS 在内的较多分子生物学检测技术会利用 ddPCR 进行比较和验证。本研究将 Super-ARMS PCR 法与 ddPCR 法在 ctDNA T790M 突变检出率和一致性方面进行了比较和分析。

本研究中 ddPCR 法和 Super-ARMS PCR 法检测耐药患者 T790M 突变检出率分别为 40.32% 和 30.65%, 与研究报道的数据较为一致^[13-14]。此外, Super-ARMS PCR 法和 ddPCR 法对晚期肺腺癌患者经 EGFR-TKI 治疗后 ctDNA EGFR 基因 T790M 突

变检测具有较高的一致性 ($Kappa = 0.756, P < 0.001$), 总符合率为 88.71%。其中, 13 例 Super-ARMS PCR 法检测 T790M 突变阴性的患者, 利用 ddPCR 法检测阳性, 通过突变丰度分析, 这 13 例患者的突变丰度较低, 在 0.01%~2.80%, 可能由于 Super-ARMS PCR 检测低突变丰度标本时, 其检测性能不稳定。1 例 Super-ARMS PCR 法检测 T790M 突变阳性的患者, 利用 ddPCR 法检测阴性, 可能由于 ddPCR 法操作过程较为复杂, 操作不当等因素造成实验失败。

耐药分为原发性和获得性, 原发性耐药临床定义为接受 EGFR-TKI 后第一时间对治疗无反应, 临床症状、疾病控制或总生存率无明显改善。获得性耐药是指开始 EGFR-TKI 靶向治疗后取得明显治疗效果, 但服药 6 个月之后, 肿瘤病灶不能得到有效抑制, 进一步增大, 根据相关标准判定为疾病进展。本研究中患者经 EGFR-TKI 治疗后, 出现疾病进展的用药时间中位数为 14 个月。在 124 例患者中, 随着患者用药时间的增加, 检出率也有升高, 用药超过 12 个月的患者采用 Super-ARMS PCR 法检测 T790M 突变的检出率高于用药小于 12 个月的患者 ($P < 0.01$)。说明用药时间超过 12 个月, 产生耐药性的患者占比较高, 提示临床可以在这段时间加强随访。

本研究应用 ddPCR 法检测出 50 例 T790M 突变, T790M 突变丰度在 0.01%~68.10%, 其中突变丰度 $\leq 0.1\%$ 的患者占 4.00%。突变丰度在 1%~<5% 的患者占比最高, 占 38.00%。当患者血浆中的 DNA 无法达到 Super-ARMS PCR 法所能检测的最低限度时, 常被其判为阴性; 本研究中, ddPCR 法的突变丰度最低可以达到 0.01%, 可以检出 Super-ARMS PCR 法检测为阴性的标本。

综上所述, Super-ARMS PCR 法和 ddPCR 法在经 EGFR-TKI 治疗后的晚期肺腺癌患者外周血标本进行 EGFR 基因 T790M 突变的检测中具有较高的一致性, 可以为临床肺腺癌患者靶向治疗提供重要参考。但 ddPCR 法灵敏度更高并且可以通过绝对定量提供突变丰度的信息, 后续可针对突变丰度与患者的用药疗效和预后开展研究, 从而为临床治疗提供更全面的信息。

参考文献

- [1] XIA G H, ZENG Y, FANG Y, et al. Effect of EGFR-TKI retreatment following chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer patients who underwent EGFR-TKI [J]. Cancer Biol Med, 2014, 11(4): 270-276.
- [2] 康雪丽, 王怡, 李升锦. ctDNA 检测晚期 NSCLC 患者 EGFR 基因突变的 Meta 分析[J]. 检验医学与临床, 2019, 16(12): 1681-1686.
- [3] ZHANG S, ZHU L, XIA B, et al. Epidermal growth factor

- receptor (EGFR) T790M mutation identified in plasma indicates failure sites and predicts clinical prognosis in non-small cell lung cancer progression during first-generation tyrosine kinase inhibitor therapy: a prospective observational study[J]. Cancer Commun (Lond), 2018, 38(1): 28.
- [4] MOK T S, WU Y L, AHN M J, et al. Osimertinib or platinum-pemetrexed in EGFR T790M-positive lung cancer [J]. N Engl J Med, 2017, 376(7): 629-640.
- [5] 曹飞飞, 张琳琳, 王双, 等. EGFR-TKIs 与化疗比较一线治疗非小细胞肺癌疗效的 meta 分析[J]. 中国肺癌杂志, 2015, 18(3): 146-154.
- [6] ANNA L M, EWELINA N, ŁUKASZ Z, et al. Detection of somatic mutations in ctDNA derived from adenocarcinoma patients-EGFR tyrosine kinase inhibitor monitoring preliminary study[J]. Contemp Oncol (Pozn), 2019, 23(2): 87-91.
- [7] 陈学瑜, 罗芳秀, 赵广垠, 等. 非小细胞肺癌患者外周血 ctDNA 中 EGFR 基因突变检测的临床意义[J]. 山东医药, 2019, 59(25): 5-8.
- [8] SHYAMALA M, SEQUIST L V, SUNITHA N, et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells[J]. N Engl J Med, 2008, 359(4): 366-377.
- [9] 吴一龙.《非小细胞肺癌血液 EGFR 基因突变检测中国专家共识》规范中国 EGFR 血液检测, 推动肺癌精准治疗[J]. 浙江医学, 2015, 37(24): 1959-1960.
- [10] YOSHIHIKO F, KENICHI S, HIDEHARU K, et al. Highly sensitive detection of EGFR T790M mutation using colony hybridization predicts favorable prognosis of patients with lung cancer harboring activating EGFR mutation[J]. J Thorac Oncol, 2012, 7(11): 1640-1644.
- [11] MASARU W, TOMOYA K, SHUN-ICHI I, et al. Ultra-sensitive detection of the pretreatment EGFR T790M mutation in non-small cell lung cancer patients with an EGFR-activating mutation using droplet digital PCR[J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(15): 3552-3560.
- [12] GUO Q M, WANG L, YU W J, et al. Detection of plasma EGFR mutations in NSCLC patients with a validated ddPCR lung cfDNA assay[J]. J Cancer, 2019, 10(18): 4341-4349.
- [13] WENXIAN W, ZHENGBO S, YIPING Z. A Comparison of ddPCR and ARMS for detecting EGFR T790M status in ctDNA from advanced NSCLC patients with acquired EGFR-TKI resistance[J]. Cancer Med, 2017, 6(1): 154-162.
- [14] 曹紫阳, 吴伟, 侯立坤, 等. 微滴数字 PCR 与 Super-ARMS PCR 检测非小细胞肺癌患者表皮生长因子受体 (EGFR) 酪氨酸激酶抑制剂治疗耐药后血浆游离 DNA EGFR 基因 T790M 突变的对比分析[J]. 中华病理学杂志, 2018, 47(12): 910.