

• 论 著 •

基于微滴式数字 PCR 的肺癌患者 BALF-EGFR 基因突变 分析在靶向治疗中的应用价值评价^{*}

梁小卉^{1,2}, 吴 飞^{1,2}, 许万星^{1,2,3}, 乔理华^{1,2,3△}

1. 上海市第一人民医院/上海交通大学医学院附属第一人民医院检验科, 上海 200080; 2. 上海交通大学医学院医学技术学院, 上海 200025; 3. 上海市胸科医院检验科, 上海 200080

摘要:目的 探究支气管肺泡灌洗液(BALF)作为表皮生长因子受体(EGFR)基因突变检测标本的临床应用价值。方法 采用微滴式数字聚合酶链反应(ddPCR)检测 52 例肺癌患者 BALF 中 EGFR 基因相关位点(L858R 和 E746_A750del)突变情况,与相应分子病理结果比较。结果 以分子病理结果为金标准,BALF 检测 E746_A750del 位点灵敏度为 58.3%(14/24),特异度为 100.0%(14/14),一致性符合率为 73.7%(28/38, $Kappa=0.508, P<0.01$);BALF 检测 L858R 位点灵敏度为 64.3%(9/14),特异度为 100.0%(14/14),一致性符合率为 82.1%(23/28, $Kappa=0.643, P<0.01$)。与分子病理结果相比,BALF 中 EGFR 基因 E746_A750del 和 L858R 突变的检出一致性较高($0.40<Kappa<0.75$),BALF 中 EGFR 基因突变检出率与肿瘤分期有关($P<0.05$),突变丰度在一定程度上可预测肺癌远端转移。结论 BALF 标本在肺癌患者 EGFR 基因突变检测中有重要的临床应用价值,可作为分子病理检测的补充。

关键词:支气管肺泡灌洗液; 微滴式数字聚合酶链反应; 表皮生长因子受体; 基因突变

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2024.23.020

中图法分类号:R446.8

文章编号:1673-4130(2024)23-2918-04

文献标志码:A

Evaluation of the application value of BALF-EGFR gene mutation in targeted therapy for lung cancer patients based on droplet digital PCR^{*}

LIANG Xiaohui^{1,2}, WU Fei^{1,2}, XU Wanxing^{1,2,3}, QIAO Lihua^{1,2,3△}

1. Department of Clinical Laboratory, Shanghai General Hospital/Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200080, China; 2. College of Health Science and Technology, Shanghai Jiao Tong University, School of Medicine, Shanghai 200025, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Shanghai Chest Hospital, Shanghai 200080, China

Abstract: Objective To evaluate the clinical application value of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) as a specimen for epidermal growth factor receptor (EGFR) gene mutation detection. **Methods** Droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) was used to detect the mutation situation of relevant sites (L858R and E746_A750del) in EGFR gene in BALF of totally 52 lung cancer patients, and the corresponding molecular pathological results were compared. **Results** With molecular pathological as a gold standard, the sensitivity of BALF for the detection of E746_A750del was 58.3% (14/24), specificity was 100.0% (14/14) and concordance was 73.7% (28/38, $Kappa=0.508, P<0.01$), while the sensitivity of BALF for the detection of L858R was 64.3% (9/14), specificity was 100.0% (14/14) and concordance was 82.1% (23/28, $Kappa=0.643, P<0.01$). Compared with the molecular pathological results, it showed high concordance in determining mutations of E746_A750del and L858R in EGFR gene in BALF ($0.40<Kappa<0.75$). The detection rate of EGFR gene mutation in BALF was related with tumor stage ($P<0.05$). The abundance of mutations could predict to some extent the distant metastasis of lung cancer. **Conclusion** BALF specimens have important clinical application value in detecting EGFR gene mutations in lung cancer patients and could serve as a supplement to molecular pathology detection.

Key words: bronchoalveolar lavage fluid; droplet digital polymerase chain reaction; epidermal growth factor receptor; gene mutation

* 基金项目:上海市第一人民医院特色研究项目(CTCCR-2021B06)。

作者简介:梁小卉,女,主管技师,主要从事肺癌早期精准诊疗方向的研究。△ 通信作者, E-mail: xqbs23@163.com。

据统计,30%~50%的东亚裔肺腺癌患者携带表皮生长因子受体(EGFR)基因突变^[1-3]。美国国立综合癌症网络(NCCN)指南将检测 EGFR 基因突变状态列为靶向治疗的依据^[4-5]。手术或者穿刺得到的肺癌原位或者转移灶组织标本、胸腔积液、支气管肺泡灌洗液(BALF)和血液等都可用于 EGFR 基因突变的检测。其中 BALF 是应用纤维支气管镜对支气管以下肺段和亚肺段进行灌洗后,采集肺泡表面衬液获得。鉴于 BALF 含有肿瘤患者的肿瘤细胞成分,携带肿瘤细胞的遗传特征,因此检测 BALF 的遗传信息,可以帮助了解患者的肿瘤相关基因变异情况^[6-7],但 BALF 中同时含有大量免疫细胞和上皮细胞,会对肿瘤来源的 DNA 检测带来很大干扰,常规的聚合酶链反应(PCR)很难对其进行检测。微滴式数字 PCR(ddPCR)作为新一代 PCR 检测技术能对低频度的基因突变进行高度灵敏的定量分析^[8-9],本研究利用 ddPCR 检测肺癌患者 BALF 中 EGFR 基因 L858R 和 E746_A750del 两个位点的突变情况,与组织细胞分子病理结果相比较,探讨基于 BALF 进行 EGFR 基因突变检测在肺癌患者靶向治疗中的临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2016 年 11 月至 2017 年 7 月就診于上海市胸科医院的 52 例按国际肺癌研究协会肺癌 TNM 分期(第 8 版)^[10] 确诊为肺癌的患者的 BALF 标本。经病理证实,其中 42 例为腺癌,8 例为鳞癌,2 例为小细胞肺癌;Ⅰ期 3 例,Ⅱ期 7 例,Ⅲ期 11 例,Ⅳ期 31 例。患者未接受任何肿瘤相关治疗,均签署知情同意书,本研究通过上海市胸科医院伦理委员会审批(编号:LS1418)。

1.2 方法

1.2.1 组织标本收集 包括肺癌组织和转移淋巴结组织。固定采用 10%中性缓冲甲醛水溶液,组织切片至少有 200~400 个肿瘤细胞,尽量剔除非肿瘤组织及细胞。

1.2.2 BALF 标本收集 按照美国胸科协会官方指南进行操作,于内镜室以 2%利多卡因进行局部麻醉,将支气管镜嵌顿在适当的支气管树分支后,经支气管镜灌入室温生理盐水 100~300 mL,均分为 3~5 次序贯灌入。每次灌入 1 份生理盐水后,以低于-100 mmHg 的负压吸引获取 BALF^[11]。临床采集的 BALF 标本(10 mL)于 2 h 内处理,先用纱布过滤,再 1 600 r/min、4 ℃离心 10 min,吸取下层沉淀转移至 2 mL EP 管,基因组 DNA 采用 TIANamp Genomic DNA Kit (Tiangen)提取,Qubit™ 荧光定量仪(Life Tech)测浓度。

1.2.3 ddPCR 检测 BALF BALF 细胞 DNA 标本用 QX200 ddPCR 系统检测(Bio-Rad),反应体系:10 μL 2×ddPCR 预混液(Bio-Rad)、8 μL 模板(约 30 ng)、1 μL 野生型引物和探针(Bio-Rad)、1 μL 突变型

引物和探针(Bio-Rad),最终反应体积为 20 μL。在 PCR 扩增前用 QX200 微滴生成仪(Bio-Rad)对样品进行微滴化处理,再放入 T100 PCR 扩增仪(Bio-Rad)进行 PCR 扩增。反应条件:95 ℃孵育 10 min,扩增 1 个循环,再 94 ℃变性 30 s,70 ℃退火延伸 1 min,扩增 40 个循环,最后酶失活 98 ℃×10 min,扩增 1 个循环,降至 4 ℃。然后将 PCR 产物放入 QX200 微滴读取仪(Bio-Rad),通过 Quanta Soft 软件分析结果。根据笔者前期数据,ddPCR 检测 E746_A750del 和 L858R 的最佳截断值为(Ch1+Ch2-)≥2 个突变微滴数^[12]。突变丰度(%)=突变型阳性微滴数/(突变型阳性微滴数+野生型阳性微滴数)×100%。

1.2.4 组织标本扩增阻滞突变系统 PCR(ARMS-PCR)检测 采用核酸提取试剂(艾德生物)进行组织 DNA 的提取,采用人类 EGFR 基因突变检测试剂盒(荧光 PCR 法,艾德生物)进行 EGFR 基因突变的检测。将待测标本 DNA 42.3 μL 和 2.7 μL Taq 酶混匀后,加入 8 联 PCR 反应条中,利用 ABI 7500 进行扩增。反应条件:95 ℃ 5 min,1 个循环;95 ℃ 25 s,64 ℃ 20 s,72 ℃ 20 s,15 个循环;93 ℃ 25 s,60 ℃ 35 s,72 ℃ 20 s,31 个循环;信号收集:第 3 阶段 60 ℃ 时收集 FAM 和 HEX 信号。根据说明书要求,进行结果判读。

1.2.5 BALF 检出率的影响因素分析 将组织细胞分子病理 E746_A750del 和 L858R 阳性患者分为两组:BALF 阳性(T+B+组)和 BALF 阴性(T+B-组),分析肿瘤分期、年龄、性别及吸烟等因素对 BALF 检出率的影响。

1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件进行统计学分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验;非正态分布的计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,组间比较采用 Mann-Whitney *U* 检验;计数资料采用频数或百分率表示,组间比较采用 Fisher 精确检验。ddPCR 和 ARMS-PCR 检测 EGFR 基因突变的一致性符合率采用 Cohen's Kappa 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

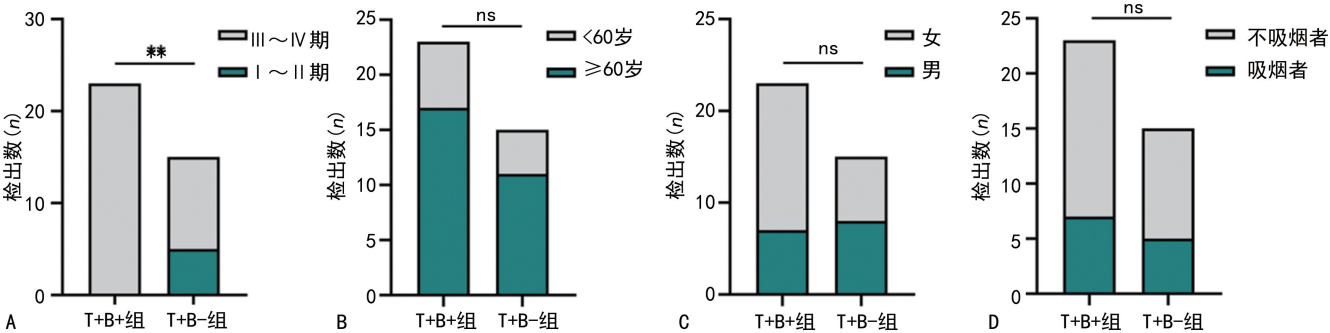
2.1 ddPCR 检测 BALF 中 EGFR 基因突变 对 52 例肺癌患者 BALF 中 EGFR 基因突变进行检测,检出基因突变的患者有 23 例,其中 E746_A750del 突变患者 14 例(60.9%),L858R 突变患者 9 例(39.1%)。与组织细胞分子病理相比,总体灵敏度为 60.5%(23/38),特异度为 100.0%(14/14),一致性符合率为 71.2%(37/52, $Kappa = 0.452, P < 0.01$)。其中, E746_A750del 灵敏度为 58.3%(14/24),特异度为 100.0%(14/14),一致性符合率为 73.7%(28/38, $Kappa = 0.508, P < 0.01$);L858R 灵敏度为 64.3%(9/14),特异度为 100.0%(14/14),一致性符合率为 82.1%(23/28, $Kappa = 0.643, P < 0.01$)。见表 1。

2.2 BALF 中 EGFR 基因突变检出率的影响因素
Ⅲ~Ⅳ期肺癌患者 BALF 中 EGFR 基因突变检出率高于Ⅰ~Ⅱ期患者($P=0.006$),BALF 中 EGFR 基

因突变检出率在不同性别、年龄、是否吸烟患者中比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 1。

表 1 BALF 中 EGFR 基因突变检测结果

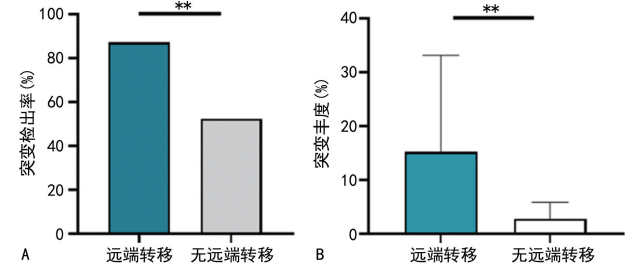
突变类型	BALF ddPCR	组织 ARMS-PCR		BALF ddPCR 效能		
		野生	突变	灵敏度(%)	特异度(%)	一致性符合率(%)
E746_A750del	野生	14	10	58.3	100.0	73.7
	突变	0	14			
L858R	野生	14	5	64.3	100.0	82.1
	突变	0	9			



注:A 为肿瘤分期对 BALF 中 EGFR 基因突变检出率的影响;B 为年龄对 BALF 中 EGFR 基因突变检出率的影响;C 为性别对 BALF 中 EGFR 基因突变检出率的影响;D 为吸烟对 BALF 中 EGFR 基因突变检出率的影响;ns 为 $P>0.05$, * 为 $P<0.05$ 。

图 1 BALF 中 EGFR 基因突变检出率的影响因素分析

2.3 BALF 中 EGFR 基因突变丰度的临床意义 进一步,笔者回顾性分析了晚期肺癌患者 BALF 中 EGFR 基因突变检出率和突变丰度与肿瘤转移的关系,发生远端转移的患者 BALF 中 EGFR 基因突变检出率高于未发生远端转移的患者($P<0.05$),此外,发生远端转移的患者 EGFR 基因平均突变丰度高于未发生远端转移的患者($P<0.05$)。见图 2。



注:A 为 BALF 中 EGFR 基因突变检出率与远端转移的关系;B 为 BALF 中 EGFR 基因突变丰度与远端转移的关系; * 为 $P<0.05$ 。

图 2 BALFEGFR 基因突变检测的临床意义

3 讨 论

EGFR 基因突变检测对于肺癌诊断及靶向治疗至关重要。目前针对 EGFR 基因突变检测主要应用组织、胸腔积液、BALF 及外周血标本^[13],组织学检测一直作为肺癌诊断的金标准,但是存在创伤性大,适用人群受限,易引发感染、气胸等缺点。对于中晚期肺癌患者来说,组织标本常经穿刺获得,获取组织量

少,所反映的信息量也较少,常规病理诊断后的剩余标本量常难以满足后续基因检测。其次,肿瘤在经过一系列治疗后会发生药物获得性基因改变,需要实时获得肿瘤信息才能较准确地反映肿瘤的特性,但晚期肺癌患者病灶多邻近大血管,穿刺出血风险高。

BALF 检测是一种传统而安全的诊断技术,可从远端气道和外围肺泡等疾病部位获取细胞和非细胞内容物^[14],适用于包括肺癌在内的各种肺部疾病。目前采用 BALF 标本进行基因检测和病因学诊断的临床研究逐渐增加,如通过对 BALF 中外泌体 DNA 进行 EGFR 基因检测,相比于组织细胞分子病理结果,灵敏度为 97.8%,特异度为 96.9%,一致性符合率为 97.7%,有助于患者更早进行靶向治疗干预^[15-17]。此外,检测 BALF 中 BRAFV600E 基因突变情况可用于评估朗格汉斯细胞组织细胞增生症^[18];还可通过检测 BALF 中病原体来诊断异基因造血干细胞移植后肺部并发症^[19]。相比于组织标本,BALF 标本因获取操作简单、无创伤性、信息多样性的优点获得了临床的关注。

本研究采用 ddPCR 检测 BALF 标本中相关位点突变(E746_A750del 和 L858R),与相应组织细胞分子病理结果比较,结果表明,EGFR 基因 E746_A750del ($Kappa = 0.508$) 和 L858R ($Kappa = 0.643$)突变在 BALF 中的检出率一致性符合率较高

($0.40 < Kappa < 0.75$), 且肿瘤分期与突变检出率存在一定联系, 晚期肺癌患者 BALF 中 EGFR 基因突变检出率明显高于早期肺癌患者 ($P = 0.006$)。但用 BALF 进行检测存在一定的假阴性, 可能受 BALF 细胞量、冲洗位置及标本运输和保存的条件、标本前处理等因素的影响, 但目前尚没有系统性的研究证实。因此, 对于不适用穿刺活检、血管脆弱、病情进展的中晚期肺癌患者, 可视情况选择无创性的 BALF 标本做筛选检测, 能使一部分患者免于创伤性检测, 有效减少患者的痛苦; BALF 标本也可作为组织活检的补充标本, 检测速度优于组织分子病理, 能更早给临床提供一定的信息来选择或调整治疗方案。

本研究存在一定的局限性, 入组病例数偏少, 只能提示 BALF 可以作为晚期肺癌患者基因突变检测的补充标本, 后续需扩大样本量进行进一步验证, 并通过进一步随访, 评价 BALF 基因检测在治疗监测中的作用。此外, 将 BALF 标本用于基因检测对标本量、标本运输和保存的条件, 以及标本前处理的要求和合格标准也需要通过试验进一步规范和明确。

BALF 可作为肺癌晚期基因突变检测补充标本, 采用 ddPCR 检测 BALF 中 EGFR 基因突变情况能为临床上不易取得肿瘤组织的病例提供一定的信息, 并有助于动态监测, 是一种有价值的补充诊断手段。

参考文献

- [1] SIEGEL R L, GIAQUINTO A N, JEMAL A. Cancer statistics, 2024[J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(1): 12-49.
- [2] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [3] THAI A A, SOLOMON B J, SEQUIST L V, et al. Lung cancer[J]. 2021, 398(10299): 535-554.
- [4] RAMALINGAM S S, VANSTEENKISTE J, PLANCHARD D, et al. Overall survival with osimertinib in untreated, EGFR-mutated advanced NSCLC[J]. N Engl J Med, 2020, 382(1): 41-50.
- [5] ETTINGER D S, WOOD D E, AISNER D L, et al. NCCN guidelines insights: non-small cell lung cancer, version 2. 2021[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2021, 19(3): 254-266.
- [6] ZHANG H, DENG D, LI S, et al. Bronchoalveolar lavage fluid assessment facilitates precision medicine for lung cancer[J]. Cancer Biol Med, 2023, 21(3): 230-251.
- [7] NAIR V S, HUI A B, CHABON J J, et al. Genomic profiling of bronchoalveolar lavage fluid in lung cancer[J]. Cancer Res, 2022, 82(16): 2838-2847.
- [8] CRUCITTA S, RUGLIONI M, NOVI C, et al. Compari-

son of digital PCR systems for the analysis of liquid biopsy samples of patients affected by lung and colorectal cancer[J]. Clin Chim Acta, 2023, 541: 117239.

- [9] OLMEDILLAS-LÓPEZ S, OLIVERA-SALAZAR R, GARCÍA-ARRANZ M, et al. Current and emerging applications of droplet digital PCR in oncology: an updated review[J]. Mol Diagn Ther, 2022, 26(1): 61-87.
- [10] GOLDSTRAW P, CHANSKY K, CROWLEY J, et al. The IASLC lung cancer staging project: proposals for revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (Eighth) edition of the TNM classification for lung cancer[J]. J Thorac Oncol, 2016, 11(1): 39-51.
- [11] KEITH C M, GANESH R, ROBERT P B, et al. An official American Thoracic Society clinical practice guideline: the clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2012, 185(9): 1004-14.
- [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] 李海霞, 涂建成, 任丽, 等. 液体活检在临床肿瘤诊疗中的应用及挑战[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(20): 2433-2438.
- [14] MILLER R J, CASAL R F, LAZARUS D R, et al. Flexible bronchoscopy[J]. Clin Chest Med, 2018, 39: 1-16.
- [15] IN A K, JAE Y H, HEE J K, et al. A prospective phase 2 study of expeditious EGFR genotyping and immediate therapeutic initiation through extracellular vesicles (EV)-based bronchoalveolar lavage fluid (BALF) liquid biopsy in advanced NSCLC patients[J]. Transl Lung Cancer Res, 2023, 12(7): 1425-1435.
- [16] HUR J Y, KIM H J, LEE J S, et al. Extracellular vesicle-derived DNA for performing EGFR genotyping of NSCLC patients[J]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 15.
- [17] KIM I A, HUR J Y, KIM H J, et al. Extracellular vesicle-based bronchoalveolar lavage fluid liquid biopsy for EGFR mutation testing in advanced non-squamous NSCLC[J]. Cancers (Basel), 2022, 14(11): 2744.
- [18] PIERRY C, CAUMONT C, BLANCHARD E, et al. Assessment of BRAFV600E mutation in pulmonary Langerhans cell histiocytosis in tissue biopsies and bronchoalveolar lavages by droplet digital polymerase chain reaction[J]. Virchows Arch, 2018, 472(2): 247-258.
- [19] 李肃, 万理萍, 谢国刚, 等. 支气管肺泡灌洗液病原体检测在异基因造血干细胞移植后肺部并发症中的诊断价值[J]. 中华血液学杂志, 2019, 40(10): 822-826.