

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.03.017

· 短篇论著 ·

人卵巢癌组织 *EGFR* 基因突变的分析

Analysis of *EGFR* gene mutations in human ovarian carcinoma

赵璐¹, 傅芬², 蔡勇³ (1. 南昌大学研究生院医学部, 江西 南昌 330006; 2. 南昌大学第二附属医院妇产科, 江西 南昌 330006; 3. 江西省肿瘤医院病理科, 江西 南昌 330029)

[摘要] 目的: 研究卵巢癌组织中表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, *EGFR*) 基因突变的情况, 为卵巢癌的靶向治疗提供实验依据。方法: 收集南昌大学第二附属医院与江西省肿瘤医院 70 例卵巢癌组织标本, 采用多聚酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 及多聚酶链式反应-限制性内切酶片段长度多态性 (PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 分别检测卵巢癌组织 *EGFR* 基因是否有第 19 外显子的缺失及第 21 外显子的 L858R 点突变。结果: 在 70 例卵巢癌组织中, PCR 未检测到 *EGFR* 基因第 19 外显子缺失突变, PCR-RFLP 未检测到第 21 外显子的 L858R 点突变。结论: 卵巢癌组织 *EGFR* 基因中未检测到第 19 外显子缺失突变和第 21 外显子的 L858R 点突变。

[关键词] 卵巢癌; 基因突变; 表皮生长因子受体基因

[中图分类号] R737.31; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)03-0333-03

卵巢癌是女性生殖系统常见恶性肿瘤, 迄今尚无成熟的早期诊断方法, 约 70% 患者确诊时已属晚期。经过各种治疗, 70% ~ 80% 的卵巢癌患者能获得临床缓解, 但仍有 55% ~ 75% 的患者在治疗后 3 年内复发, 而且化疗药物对其的有效率仅为 20% 左右^[1]。药物耐受是卵巢癌化疗失败的重要原因, 如何克服卵巢癌化疗耐药是当今研究的热点及难点。

表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, *EGFR*) 是原癌基因 *ErbB1* 的表达产物, 在多种上皮来源的恶性肿瘤中过表达, 与肿瘤的发生、发展密切相关^[2]。以 *EGFR* 为靶点的药物, 如 *EGFR* 酪氨酸激酶抑制剂 (tyrosine kinase inhibitor, TKI), 在非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 的治疗中已显现出非常好的抗肿瘤疗效^[3]。NSCLC 中 TKI 的效果与 *EGFR* 基因的突变直接相关, *EGFR* 基因突变的 90% 表现为第 19 外显子的缺失突变和第 21 外显子的 L858R 点突变 (第 2573 位的 G 被 T 置换, 致 *EGFR* 中第 858 位亮氨酸被精氨酸替代)^[4]。但卵巢癌中 TKI 的有效性是否与 *EGFR* 基因突变有关, 目前尚无研究证实。本实验通过 PCR 及 PCR-RFLP (PCR-restriction fragment length polymorphism) 检测卵巢癌组织中 *EGFR* 基因第 19 外显子的缺失突变和第 21 外显子的点突变, 为卵巢癌的靶向治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 标本来源

取 2002 年 1 月至 2009 年 3 月南昌大学第二附

属医院与江西省肿瘤医院手术切除并经病理证实的 70 例卵巢癌组织作为研究样本。患者年龄 15 ~ 71 岁, 中位年龄 53 岁。其中上皮性卵巢癌 61 例 (包括 46 例浆液性卵巢癌、11 例黏液性卵巢癌、1 例移行细胞癌、2 例透明细胞癌和 1 例子宫内膜样癌), 生殖细胞癌 5 例 (包括 4 例无性细胞癌和 1 例未成熟畸胎瘤), 转移性卵巢癌 4 例。患者术前均未进行任何化疗或放疗。厦门大学提供的 2 例 NSCLC 的 DNA 模板为阳性对照, 其 *EGFR* 基因有第 19 外显子 E746 - A750 缺失突变 (即第 746 - 752 位密码子的碱基缺失) 及第 21 外显子 L858R 点突变。

1.2 引物合成

根据 Gene bank 公开发表的人 *EGFR* 基因序列 (编号 NG_007726), 利用 Oligo 6.0 软件针对 *EGFR* 的第 19 和第 21 外显子设计引物, 引物由上海生工生物工程公司合成。引物序列见表 1。

1.3 酚-氯仿法抽提卵巢癌组织中 DNA

切除肿瘤石蜡组织周围多余石蜡后, 将 3 ~ 4 片约 5 mm 厚的组织切片放入 1.5 ml 的离心管中, 加入二甲苯脱蜡, 微微摇动, 换液 3 次。用无水乙醇水化脱二甲苯, 换液 3 次, 晾干。于离心管中加入消化液, 37 °C 消化过夜, 然后用酚-氯仿法抽提消化后肿

[基金项目] 江西省教育厅科学技术研究项目 (No. GJJ09120)。Project supported by the Science and Technology Foundation from Department of Education of Jiangxi Province (No. GJJ09120)

[作者简介] 赵璐 (1985 -), 女, 江西省九江市人, 硕士生, 主要从事妇科肿瘤临床与基础研究。E-mail: zhaoluchchl2007@sina.com

[通信作者] 傅芬 (Fu Fen, corresponding author), E-mail: fu_fen@163.com

瘤组织中的 DNA。于抽提出的 DNA 中加入抗-DNA 磁珠和裂解液,震荡混匀,并静置 10 min,置管于磁性台架使磁珠聚集,然后去除上清液。再于管内加入洗涤液洗涤,置管于磁性台架洗去非特异性结合

物质,重复此操作 1 次。最后加入洗脱液洗脱吸附在磁珠上的 DNA,将含有 DNA 的上清液回收至新的 1.5 ml 离心管中,放置 -80 °C 冻存备用。

表 1 EGFR 基因第 19、第 21 外显子的引物序列

外显子	正向引物	反向引物	产物
19	5'-GTGCATCGCTGGTAACATCC-3'	5'-GGCCTGAGGTTTCAGAGCCAT-3'	243 bp
21	5'-TTCCCATGATGATCTGTCCCT-3'	5-AAGCCACCTCCTTACTTTGC-3'	217 bp

1.4 PCR 扩增 EGFR 基因第 19 外显子和第 21 外显子

PCR 反应体系:在 20 μl PCR 反应体系中,加入 DNA 模板 2 μl,10 × PCR 缓冲液 2 μl,MgCl₂ 1.4 μl (25 mmol/L),4 种 dNTP 0.4 μl(10 mmol/L),上下游引物混合物 0.2 μl(25 mmol/L),Taq DNA 聚合酶 1 U,用双蒸水补足反应体积至 20 μl。PCR 循环参数:预变性 95 °C,4 min,95 °C,30 s,56 °C,30 s,72 °C,1 min,共 35 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。EGFR 基因第 19 外显子与阳性对照(NSCLC 组织 DNA)PCR 扩增产物行 2% 琼脂糖电泳。EGFR 基因第 19 外显子突变为缺失突变,缺失片段长 12 ~ 20 bp。EGFR 基因第 21 外显子扩增产物进行后续检测。

1.5 PCR-RFLP 检测 EGFR 基因第 21 外显子点突变

将上述 EGFR 基因第 21 外显子扩增产物和阳性对照(NSCLC 组织 DNA)的扩增产物用 Msc I 酶切。酶切体系包括:Msc I 酶 0.5 μl(5 U/μl),10 × 缓冲液 1 μl,PCR 产物 4 μl,双蒸水补全至 10 μl。经 37 °C 水浴 1 h,酶切产物经 2% 琼脂糖电泳。野生型 EGFR 基因第 21 外显子存在 Msc I 酶切位点,点突变的第 21 外显子该酶切位点消失。野生型 EGFR 扩增片段经 Msc I 酶切后产生 2 条小片段;突变型 EGFR 基因因其有一条链含第 21 外显子 L858R 突变(T→G,CGG),不能被 Msc I 酶切消化,另一条链仍然为未突变片段,能被 Msc I 酶切消化,故经 Msc I 酶切消化后产生 3 条小片段。

2 结果

2.1 EGFR 基因第 19 外显子未发现缺失突变

70 例卵巢癌组织 EGFR 基因第 19 外显子的 PCR 扩增产物经电泳检测均显示为 243 bp 的单一一条带,未见低于 243 bp 的条带(图 1)。而阳性对照的 NSCLC 组织 EGFR 基因第 19 外显子的 PCR 扩增产物的电泳显示为 2 条带,一条和卵巢癌的条带一致,为 243 bp,一条长度为 228 bp。因此,卵巢癌组

织的 EGFR 基因第 19 外显子未发现缺失突变。

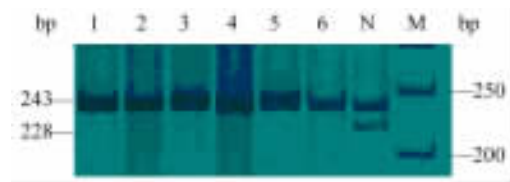


图 1 PCR 检测卵巢癌组织中 EGFR 基因第 19 外显子的突变情况

1 ~ 6: 卵巢癌组织; N: NSCLC 组织; M: Marker

2.2 EGFR 基因第 21 外显子未发现点突变

将卵巢癌组织 EGFR 基因第 21 外显子扩增产物经 Msc I 酶切后,2% 琼脂糖电泳检测,L858R 点突变的阳性对照 NSCLC 有 3 条条带,长度约 217 bp、151 bp 和 66 bp(图 2),卵巢癌组织则为 2 条条带,长度为 151 bp 和 66 bp,提示所检测卵巢癌中 EGFR 基因第 21 外显子没有 L858R 位点突变。



图 2 PCR-RFLP 分析卵巢癌组织 EGFR 基因第 21 外显子的突变情况

1 ~ 6: 卵巢癌组织; N: NSCLC 组织; M: Marker

3 讨论

卵巢癌是实体肿瘤中对化疗中度敏感的肿瘤之一,其对铂类药物为基础的联合化疗有 70% ~ 80% 的反应率^[5]。然而,绝大多数开始对化疗有效的患者最终仍会复发,复发的卵巢癌患者对之前使用过

的化疗药物多产生耐药,甚至对从未使用过的化疗药物也会产生耐药,极大地影响了卵巢癌患者的生存率,因此,如何克服卵巢癌化疗耐药,寻找新的化疗方案是当今研究的热点及难点。

EGFR 为原癌基因 *C-ERBB-1* 的表达产物,为膜型酪氨酸蛋白激酶,其胞内区为酪氨酸激酶区,可自身磷酸化。*EGFR* 在许多肿瘤组织包括卵巢癌中高表达,与肿瘤患者预后不良、无瘤生存期缩短及耐药相关^[6]。肿瘤细胞过表达 *EGFR* 时耐药性增加^[7],化疗后复发或效果不佳的肿瘤患者 *EGFR* 水平也显著增高。作用于 DNA 的化疗药物如顺铂、多柔比星等在抑制细胞生长的同时,可使细胞的 *EGFR* 表达增加^[8]。

近年来,以 *EGFR* 为治疗靶标的靶向治疗受到了国内外肿瘤界的普遍关注,治疗靶点主要集中在酪氨酸激酶编码区域,治疗药物主要以 *EGFR* 酪氨酸激酶抑制剂为主。据文献报道^[9],吉非替尼能使 NSCLC 患者的症状缓解、病灶缩小、生活质量提高、生存期延长。但 TKI 的这些疗效主要决定于 *EGFR* 酪氨酸激酶编码区域是否有对 TKI 敏感的突变位点^[10-11]。Lynch 等^[12] 和 Paez 等^[13] 报道了位于 *EGFR* 酪氨酸激酶编码区第 19 外显子和第 21 外显子的突变与吉非替尼的有效率明显相关。NSCLC 中 *EGFR* 基因突变 90% 集中在第 19 外显子及第 21 外显子上,以第 19 外显子的缺失突变(如 E746-A750 缺失)及第 21 外显子上 L858R 点突变为为主。这两种突变可引起 *EGFR* 持续地自发磷酸化,并引起其下游的信号分子磷酸化,如 PI3K/Akt 和 STAT,从而促进肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移。但与此同时,由于该两种基因突变的存在,改变了 *EGFR* 受体 ATP 结合囊的角度和 A-loop 的稳定性,使肿瘤细胞对 TKI 较敏感^[14-15]。

TKI 对卵巢癌有较好的治疗作用,那么卵巢癌中是否具有对 TKI 敏感的基因突变位点? 它的敏感性突变位点是否和 NSCLC 一样? 本实验发现,卵巢癌组织 *EGFR* 基因中未出现第 19 外显子缺失及第 21 外显子的 L858R 点突变。这可能是由于第 19 外显子和第 21 外显子在卵巢癌有其他不同的突变类型,或者在 *EGFR* 其他编码区域存在突变。为了解决这些问题,本课题组将在后续研究中对卵巢癌组织 *EGFR* 基因酪氨酸激酶编码区进行直接测序,以期发现新的突变类型,为耐药性及复发性卵巢癌患者的治疗提供实验基础。

[参 考 文 献]

[1] Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 1997, 47(1): 5-27.

- [2] Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TPJ, Ward CW, Burgess AW. Epidermal growth factor receptor: Mechanisms of activation and signaling [J]. Exp Cell Res, 2003, 284(1): 31-53.
- [3] Perez Soler R, Chachoua A, Hammond LA, Rowinsky EK, Huberman M, Karp D, et al. Determinants of tumor response and survival with erlotinib in patients with non-small cell lung cancer [J]. J Clin Oncol, 2004, 22(16): 3238-3247.
- [4] Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(3): 169-181.
- [5] 颜笑健, 梁立治, 曾宗渊, 刘继红, 袁颂华, 魏梅. 铂类化疗敏感型卵巢上皮癌复发的影响因素 [J]. 癌症, 2005, 24(6): 751-754.
- [6] Gross ME, Shazer RL, Agus DB. Targeting the HER-kinase axis in cancer [J]. Semin Oncol, 2004, 31(1): 9-20.
- [7] Park SJ, Armstrong S, Kim CH, Yu M, Robertson K, Kelley MR, et al. Lack of EGF receptor contributes to drug sensitivity of human germline cells [J]. Br J Cancer, 2005, 92(2): 334-341.
- [8] Coley HM, Shotton CF, Ajoose-Adeogun A, Modjtahedi H, Thomas H. Receptor tyrosine kinase (RTK) inhibition is effective in chemosensitizing *EGFR*-expressing drug resistant human ovarian cancer cell lines when used in combination with cytotoxic agents [J]. Biochem Pharmacol, 2006, 72(8): 941-948.
- [9] Goffin J, Lacchetti C, Ellis PM, Ung YC, Evans WK. First-line systemic chemotherapy in the treatment of advanced non-small cell lung cancer a systematic [J]. J Thoracic Oncol, 2010, 5(2): 260-274.
- [10] 张新勇, 徐丽艳, 汪惠, 朱允中, 刘喆, 岳文涛, 等. *EGFR* 基因突变与酪氨酸激酶抑制剂疗效及预后之间的关系 [J]. 中国肺癌杂志, 2008, 11(2): 206-213.
- [11] Yoshida K, Yatabe Y, Park J, Ogawa S, Park JY, Shimizu J, et al. Clinical outcomes of advanced non-small cell lung cancer patients screened for epidermal growth factor receptor gene mutations [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2010, 136(4): 527-535.
- [12] Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small cell lung cancer to gefitinib [J]. N Engl J Med, 2004, 350(21): 2929-2239.
- [13] Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, et al. *EGFR* mutations in lung cancer: Correlation with clinical response to gefitinib therapy [J]. Science, 2004, 304(4): 1497-1500.
- [14] Kosaka T, Yatabe Y, Endo H, Kuwano H, Takahashi T, Mitsudomi T, et al. Mutations of the epidermal growth factor receptor or gene in lung cancer: Biological and clinical implications [J]. Cancer Res, 2004, 64(24): 8919-8923.
- [15] Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, Nomura M, Suzuki M, Wistuba II, et al. Clinical and biological feature associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers [J]. J Natl Cancer Inst, 2005, 97(5): 339-346.

[收稿日期] 2010-03-10

[修回日期] 2010-04-18

[本文编辑] 徐红梅