

非小细胞肺癌 EGFR 基因突变的临床意义研究*

郑军^{①②} 谢贵元^③ 李姣^① 罗佳娣^① 文秋元^① 范松青^①

摘要 目的:探讨非小细胞肺癌 EGFR 基因外显子突变与其临床病理特征的关系。**方法:**利用 ADx-ARMS[®] EGFR 基因突变检测试剂盒,检测 214 例未接受过 Gefitinib 治疗的非小细胞肺癌患者组织中 EGFR 基因外显子 18、19、20 和 21 突变。**结果:**非小细胞肺癌组织中 EGFR 基因总突变率为 45.8%(98/214),外显子 18、19、20 和 21 的突变率分别为 0.93%(2/214)、22.0%(47/214)、2.3%(5/214)和 20.6%(44/214)。另有 2 例 19 和 21 外显子双重突变。EGFR 基因在肺腺癌组织中的总突变率为 50.3%(93/185)明显高于肺鳞状细胞癌 17.2%(5/29)($P=0.001$)。EGFR 基因在女性患者中的突变率 57.0%(57/100)高于男性 36.0%(41/114)($P=0.002$)。EGFR 基因在 NSCLC 淋巴结转移患者中的突变率(66.7%)显著高于无淋巴结转移患者(39.5%)($P<0.05$)。但 EGFR 基因突变率与肺癌患者的年龄、肿瘤分级和临床分期均无显著性差异($P>0.05$)。**结论:**中国肺癌尤其是肺腺癌患者存在 EGFR 基因的较高突变率,EGFR 外显子 19、21 突变结合肺癌的临床病理特征有望成为评估 TKI 治疗非小细胞肺癌疗效的分子标志。

关键词 非小细胞肺癌 表皮生长因子 突变

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.20140495

Clinical significance of EGFR mutations in non-small cell lung cancer

Jun ZHENG^{1,2}, Guiyuan XIE³, Jiao LI¹, Jiadi LUO¹, Qiuyuan WEN¹, Songqing FAN¹

Correspondence to: Songqing FAN; E-mail: songqingfan2000@yahoo.com

¹Department of Pathology, The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, China; ²Department of Biochemistry, Changzhi Medical College, Changzhi, Shanxi, 046000, China; ³Department of Oncology, the Second XiangYa Hospital of Central South University, Changsha, 410011, China

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81272566)

Abstract Objective: To investigate the mutations of the epidermal growth factor receptor (EGFR) gene and its clinical significance in non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods:** The EGFR gene mutations of exons 18 to 21 in NSCLC were detected by using the ADx-ARMS[®] detection kit method. **Results:** The total mutation percentage in exons 18 to 21 of the EGFR gene was 45.8% (98/214) in NSCLC. These mutations predominantly occur in exons 19 and 21. EGFR gene mutation percentages were found in exons 18 (0.93%, 2/214), 19 (22.0%, 47/214), 20 (2.3%, 5/214), and exon 21 (20.6%, 44/214) in the NSCLC. Two NSCLC cases were identified to have double EGFR gene mutations of exons 19 and 21. EGFR gene mutations were more frequently observed with adenocarcinoma histology (50.3%, 93/185) than with squamous cell carcinoma (17.2%, 5/29) ($P=0.001$). EGFR gene mutations occur more frequently in NSCLC cases in women than in men ($P=0.002$). EGFR gene mutations were significantly higher in NSCLC with lymphatic metastasis (66.7%) than in NSCLC without lymphatic metastasis (39.5%) ($P<0.05$). However, no evident association was found between EGFR gene mutations and age, as well as tumor grade and clinical stage of NSCLC ($P>0.05$). **Conclusion:** NSCLC, especially lung adenocarcinomas, has exhibits frequent EGFR gene mutations in China. EGFR gene mutations in exons 19 and 21, combined with the clinical pathological features of lung cancer, can serve as the molecular marker to evaluate the efficacy of EGFR TKI for NSCLC patients.

Keywords: NSCLC, EGFR, mutation

肺癌是导致癌症患者死亡的主要恶性肿瘤之一,非小细胞肺癌占肺癌 80%~85%。尽管手术和化疗技术不断提高,但非小细胞肺癌患者的 5 生存率仍低于 20%^[1-3]。近年来以表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)为靶点的分子靶向治疗已成为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)一种新的治疗方案,然而只有部分患者

对表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKI)Gefitinib 和 Erlotinib 药物敏感。研究证实:EGFR 体细胞突变对 Gefitinib 和 Erlotinib 药物治疗后的潜在临床反应起决定作用,EGFR TKI 结构域的前 4 个外显子(外显子 18~21)发生突变的患者对 Gefitinib 和 Erlotinib 药物的反应性更好^[4-6]。本研究检测 NSCLC 患者 EGFR 基因突变情况,旨在探讨 EGFR

作者单位:①中南大学湘雅二医院病理科(长沙市 410011);②长治医学院生物化学教研室;③肿瘤科

*本文课题受国家自然科学基金(编号:81272566)资助

通信作者:范松青 songqingfan2000@yahoo.com

突变与非小细胞肺癌临床病理特征的关系,为后续临床的个体化靶向治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 标本收集

标本来源于湘雅二医院病理科2010年1月至2012年12月期间经肺穿刺(146例)和外科手术切除(68例)的214例非小细胞肺癌患者,全部病例术前未经放化疗。其中男性114例、女性100例,年龄≥60岁为96例、<60岁为118例,WHO病理组织学分型:肺腺癌185例,鳞状细胞癌29例。本研究经医院伦理委员会审查批准,取得患者同意,符合伦理标准。

1.2 方法

1.2.1 DNA提取 每一标本从石蜡包埋的肿瘤组织中切取5~6 μm厚的切片,5~10片放入1.5 mL Eppendorf管中,加适量二甲苯进行脱蜡,然后加入适量乙醇洗脱二甲苯,室温或37℃晾干,直到乙醇完全蒸干;加入180 μL Buffer ATL,再加入20 μL蛋白酶K,震荡混匀;56℃消化过夜,直至样品完全裂解;用OIAamp DNA FFPE Tissue试剂盒提取DNA。

1.2.2 基因突变检测 利用ADx-ARMS®试剂盒(厦门艾德)进行EGFR基因突变检测。

1.3 统计学分析

EGFR基因位点的阳性突变率与肺癌临床病理特征的相关性,利用SPSS 12.0统计软件进行χ²检验或Fisher精确检验,以双侧检验水准P<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 非小细胞肺癌EGFR基因突变分析

突变扩增阻滞系统(amplification refractory muta-

tion system, ARMS)检测非小细胞肺癌EGFR基因突变。214例非小细胞肺癌EGFR基因总突变率为45.8%(97/214)。其中外显子18突变率为0.93%(2/214)、外显子19突变为22.0%(47/214)、均为缺失突变;外显子20突变率为2.3%(5/214),其中4例为缺失突变,1例EGFR基因T790M突变;外显子21突变率为20.6%(44/214),均为EGFR基因L858R突变;另有2例患者为EGFR基因外显子19和21双重突变(表1)。

2.2 EGFR基因突变情况与患者临床病理特征的关系

EGFR基因在肺腺癌组织中的突变率为50.3%(93/185)明显高于肺鳞状细胞癌17.2%(5/29)(P=0.001);EGFR基因在女性患者中的突变率57.0%(57/100)高于男性36.0%(41/114)(P=0.002);EGFR基因突变率与患者的年龄无显著性差异(表2)。

本研究进一步分析68例手术切除的NSCLC的EGFR基因突变与淋巴结转移、肿瘤分化程度和肺癌临床分期的关系。EGFR基因在NSCLC淋巴结转移患者中的突变率(66.7%)显著高于无淋巴结转移患者(39.5%)(P<0.05),但EGFR基因突变率与NSCLC患者肿瘤分化程度及临床分期均差异无统计学意义(P>0.05,表3)。

表1 214例非小细胞肺癌患者EGFR基因突变分析

Table 1 Analysis of EGFR gene mutations in 214 cases of NSCLC

EGFR mutation	n(%)
Exon 18	2(0.93)
Exon 19	47(22.0)
Exon 20	5(2.3)
Exon 21	44(20.6)
Total	98(45.8)

表2 EGFR基因突变与非小细胞肺癌患者临床病理特征的关系

Table 2 Association between the EGFR gene mutations and clinicopathological features of NSCLC

Clinicopathologic feature	EGFR mutation(+)				Total%	EGFR mutation (-)	P
	18(%)	19(%)	20(%)	21(%)			
Age(years)							
≥60(n=96)	1(2.2)	20(43.5)	1(2.2)	24(52.1)	46(47.9)	50(52.1)	0.574
<60(n=118)	1(1.9)	27(51.9)	4(7.7)	20(38.5)	52(44.1)	66(55.9)	
Gender							
Female(n=100)	2(3.5)	27(47.4)	3(5.3)	25(43.6)	57(57.0)	43(43.0)	0.002*
Male(n=114)	0(0)	20(48.8)	2(4.9)	19(46.3)	41(36.0)	73(64.0)	
Histopathological type							
AD(n=185)	2(2.2)	46(49.5)	4(4.3)	41(44.1)	93(50.3)	92(49.7)	0.001**
SCC(n=29)	0(0)	1(20.0)	1(20)	3(60.0)	5(17.2)	24(82.8)	

AD: Adenocarcinoma, SCC: Squamous cell carcinoma; For the chi square test, *P=0.002 and **P=0.001 are considered statistically significant

表3 EGFR基因突变与68例手术切除非小细胞肺癌患者临床病理特征的关系

Table 3 Association between the EGFR gene mutations and clinicopathological features in 68 cases of surgically resected NSCLC

Clinicopathologic feature	EGFR mutations (+)				Total(%)	EGFR mutations (-)	P
	18(%)	19(%)	20(%)	21(%)			
Lymphatic permeation							
Positive(n=30)	2(10.0)	7(35.0)	2(10.0)	9(45.0)	20(66.7)	10(33.3)	0.026*
Negative(n=38)	0(0)	8(53.3)	1(6.7)	6(40.0)	15(39.5)	23(60.5)	
Differentiated degree							
Poorly differentiated(n=12)	0(0)	2(33.3)	1(16.7)	3(50.0)	6(50.0)	6(50.0)	0.720
Moderately differentiated(n=28)	2(12.5)	7(43.8)	1(6.2)	6(37.5)	16(57.1)	12(42.9)	
Well differentiated(n=28)	0(0)	6(46.2)	1(7.7)	6(46.2)	13(46.4)	15(53.6)	
Clinical stages							
T1(n=11)	0(0)	4(57.1)	0(0)	3(42.9)	7(63.6)	4(36.4)	0.545
T2(n=28)	1(7.1)	6(42.9)	2(14.3)	5(35.7)	14(50.0)	14(50.0)	
T3(n=29)	1(7.1)	5(35.7)	1(7.7)	7(50.0)	14(48.3)	15(51.7)	

For the Chi square test, * $P < 0.05$ is considered statistically significant

3 讨论

EGFR是一种跨膜受体酪氨酸激酶,在NSCLC中存在过表达和(或)发生突变。靶向EGFR的酪氨酸激酶抑制剂Gefitinib为进展期NSCLC的临床一线用药,肺癌患者EGFR酪氨酸激酶编码区基因突变是EGFR酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKI)靶向治疗的一个必要前提条件^[4-5]。目前,突变扩增阻滞系统(ARMS)已成为国际上肿瘤个体化分子检测最重要、最先进的技术之一,其在临床应用中的优势已被业内专家广泛认可。ARMS技术利用特异引物对突变靶序列进行高精度PCR扩增放大,与此同时,利用探针对扩增产物进行检测,在实时荧光定量PCR平台上实现对样品DNA中稀有突变的检测,以达到对基因突变检测的高特异性和高灵敏度。ARMS方法检测灵敏度明显高于直接测序法等其他方法。

EGFR基因突变主要在亚洲、腺癌、女性、非吸烟者占优势,与Gefitinib靶向治疗NSCLC患者的临床疗效分布相似^[4]。本研究结果显示,国内NSCLC患者EGFR基因的总突变率(45.8%)与日本、中国台湾及印度地区相接近,明显高于西方人群^[6-8]。腺癌是NSCLC最常见的组织类型,本研究中肺腺癌EGFR基因突变率为50.3%($P=0.001$),高于韩国^[9](36.4%)和对中国大陆1195例患者评估中肺腺癌EGFR基因突变的检出率(38.1%)^[10]。这可能与ARMS方法检测灵敏度高,而且可以对原来未能检测出阳性结果的小样本增加检出率有关。性别是NSCLC中EGFR基因突变的临床预测因素之一,本研究结果与亚洲和西方国家的研究报告相一致,女性同样有较高的突变率^[6-10]。本研究进一步证实亚洲腺癌患者和女性非小细胞肺癌EGFR的突变率总体较高,是EGFR-TKI

靶向治疗的优先人群。

EGFR基因共28个外显子,其中编码酪氨酸激酶区的是第18~21外显子。研究表明EGFR基因突变部位分散在整个酪氨酸激酶区,19外显子的缺失突变和21外显子的L858R突变是最常见的突变类型^[4-6]。本研究结果显示这2个外显子的突变率累计为42.6%。提示19外显子和21外显子易受环境致癌物的攻击,突变后可能进一步激活EGFR信号转导通路,在NSCLC的发生、发展中可能起重要的作用。此外,研究中还观察到2例19外显子的缺失突变和21外显子的L858R突变的双重突变,这一现象提示肺癌患者中也存在EGFR基因联合突变的发生。同时观察到5例罕见的20外显子突变,突变后可能改变了酪氨酸激酶区ATP结合囊的构象,从而增强了ATP与EGFR的亲中性,使肿瘤细胞对EGFR-TKIs产生抵抗性,这一突变主要见于EGFR-TKIs治疗后复发者^[9-13]。

药物疗效与肿瘤的淋巴结转移、临床分期及肿瘤病理分级密切相关。多数研究报告显示,EGFR基因在NSCLC淋巴结转移患者中的突变率高于无淋巴结转移患者,而与肿瘤临床分期及病理分级无显著性相关^[14-16]。本研究同样发现EGFR基因在NSCLC淋巴结转移患者中的突变率显著高于无淋巴结转移患者,但EGFR基因突变率与NSCLC患者的肿瘤分化程度及临床分期均无统计学意义。这一结果提示Gefitinib可能对EGFR基因突变的不同分化程度和不同临床分期的肺癌患者有同样的药物疗效,本结果需要扩大样本量进一步研究证实。

总之,中国非小细胞肺癌患者EGFR基因突变率较高,肺腺癌是主要的突变类型。检测EGFR外显子

19和21突变并结合临床病理特征有望成为评估TKI治疗NSCLC患者疗效的分子标志。

参考文献

- 1 Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2009, 59(4):225-249.
- 2 Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008[J]. Int J Cancer, 2010, 127(12):2893-2917.
- 3 Song SY, DAS AK, Minna JD, et al. Comparison between concurrent and sequential chemoradiation for non-small cell lung cancer in vitro[J]. Oncol Lett, 2014, 7(2):307-310.
- 4 Yoshida T, Ishii G, Goto K, et al. Solid predominant histology predicts EGFR tyrosine kinase inhibitor response in patients with EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma[J]. Cancer Res Clin Oncol, 2013, 139(10):1691-1700.
- 5 Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, 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):2129-2139.
- 6 Siegelin MD, Borczuk AC. Epidermal growth factor receptor mutations in lung adenocarcinoma[J]. Lab Invest, 2014, 94(2):129-137.
- 7 Wu JY, Shih JY, Chen KY, et al. Gefitinib therapy in patients with advanced non-small cell lung cancer with or without testing for epidermal growth factor receptor(EGFR) mutations[J]. Medicine, 2011, 90(3):159-167.
- 8 Sahoo R, Harini VV, Babu VC, et al. Screening for EGFR mutations in lung cancer, a report from India[J]. Lung Cancer, 2011, 73(3):316-319.
- 9 Bae NC, Chae MH, Lee MH, et al. EGFR, ERBB2, and KRAS mutations in Korean non-small cell lung cancer patients[J]. Cancer Genet Cytogenet, 2007, 173(2):107-113.
- 10 Huang YS, Yang JJ, Zhang XC, et al. Impact of smoking status and

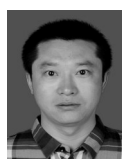
pathologic type on epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer[J]. Chin Med J, 2011, 124(16):2457-2460.

- 11 Kim HR, Lee JC, Kim YC, et al. Clinical characteristics of non-small cell lung cancer patients who experienced acquired resistance during gefitinib treatment[J]. Lung Cancer, 2014, 83(2):252-258.
- 12 Westwood M, Joore M, Whiting P, et al. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase (EGFR-TK) mutation testing in adults with locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer: a systematic review and cost-effectiveness analysis[J]. Health Technol Assess, 2014, 18(32):1-166.
- 13 Kuiper JL, Heideman DA, Thunnissen E, et al. Incidence of T790M mutation in (sequential) rebiopsies in EGFR-mutated NSCLC-patients[J]. Lung Cancer, 2014, 85(1):19-24.
- 14 Shiozawa T, Ishii G, Goto K, et al. Clinicopathological characteristics of EGFR mutated adenosquamous carcinoma of the lung[J]. Pathol Int, 2013, 63(2):77-84.
- 15 Song J, Zhong R, Huang H, et al. Combined Treatment with Epimedium koreanum Nakai Extract and Gefitinib Overcomes Drug Resistance Caused by T790M Mutation in Non-Small Cell Lung Cancer Cells[J]. Nutr Cancer, 2014, 66(4):682-689.
- 16 de Biase D, Visani M, Malapelle U, et al. Next-generation sequencing of lung cancer EGFR exons 18-21 allows effective molecular diagnosis of small routine samples (cytology and biopsy) [J]. PLoS One, 2013, 8(12):e83607.

(2014-03-26 收稿)

(2014-05-30 修回)

(本文编辑:杨红欣)



作者简介

郑军 硕士,讲师。研究方向为cIF4E在头颈部肿瘤和肺癌中的机制研究。

E-mail:zhengjun8983@163.com

· 读者 · 作者 · 编者 ·

第九届全国胃癌学术会议在京召开

为及时总结胃癌诊断、治疗和预防的先进经验和技能,促进我国胃癌诊治水平的整体提升,由中国抗癌协会胃癌专业委员会主办、北京大学肿瘤医院承办的第九届全国胃癌学术会议于2014年6月28-29日在北京国际会议中心隆重召开。

本次大会涵盖了胃癌的基础和转化研究,病理诊断、影像诊断,内科、外科、放射及中西医结合治疗,以及胃癌的围手术期管理和护理等近10个专业学科,设置了中青年医师胃癌手术大赛、胃癌多学科个体化治疗等16个专业分会场,共有1500余位来自全国各地以及英国、日本、巴西等国从事肿瘤防治工作的专业人士共同参与并见证了中国胃癌防治领域这一年度学术盛会。本届会议学科设置齐全,学术内容丰富,体现了我国目前胃癌专业领域的整体学术水平,大会共收到投稿论文及摘要200余篇,最终评选出13篇优秀论文(摘要)进行现场报告交流,50篇进行壁报展示。如今,中国在胃癌领域内开始逐渐“发声”,国际会议上关于胃癌的课题大部分由日本同道作为主流的情况已发生变化,本次大会的胜利闭幕也将开启由中国抗癌协会胃癌专业委员会承办的2017年第12届国际胃癌大会的筹备序幕,更多精彩值得期待。

引自“中国抗癌协会”网站