

组织样本保存状态及时间对 EGFR 基因突变检测结果的影响

100053 北京 首都医科大学肺癌诊疗中心 首都医科大学宣武医院胸外科 钱 坤, 张 毅¹

【摘要】 目的 探讨不同组织保存状态(原始样本或基因组 DNA)及保存时间对非小细胞肺癌(NSCLC)中表皮生长因子受体(EGFR)基因突变检测结果的影响。方法 收集 EGFR 基因突变阳性 NSCLC 患者的新鲜冰冻组织和石蜡包埋(FFPE)组织各 10 例,每保存 1 个月提取 1 次 DNA(共 12 次),设为冰冻新提取组和 FFPE 新提取组;同时分别选取初检后剩余基因组 DNA 作对照,设为冰冻预留组和 FFPE 预留组。分别采用检测试剂盒定性和定量检测上述 4 组 EGFR 基因的突变情况,同时采用荧光定量 PCR 技术检测内参基因的 Ct 值。比较 4 组不同保存时间的内参基因 Ct 值和 EGFR 基因突变频度情况。结果 20 例原始组织样本均可以检出 EGFR 基因突变,与临床信息相符。新鲜冰冻组织、FFPE 组织的 DNA 浓度均 > 50ng/ μ l,且 A_{260}/A_{280} 为 1.8 ± 0.2 。新鲜冰冻组织保存 10 个月后,冰冻预留组的内参基因 Ct 值高于冰冻新提取组,差异有统计学意义($P < 0.05$);FFPE 保存 12 个月内,FFPE 新提取组和 FFPE 预留组内参基因 Ct 值的差异均无统计学意义($P > 0.05$)。冰冻新提取组保存 6 个月后和 FFPE 新提取组保存 4 个月后的 EGFR 基因突变频度高于对应预留组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 原始样本相对于预留基因组 DNA 更适合用于回顾性研究的材料。

【关键词】 组织样本; 保存状态; 保存时间; EGFR 突变检测

中图分类号:R734.2 文献标识码:A 文章编号:1009-0460(2014)02-0132-04

Influences of storage status and time on the mutations of EGFR gene

QIAN Kun, ZHANG Yi. Department of Thoracic Surgery, Xuanwu Hospital, Diagnostic and Treatment Centers of Lung Cancer, Capital Medical University, Beijing 100053, China

Corresponding author: ZHANG Yi, E-mail: steven9130@sina.com

【Abstract】 Objective To explore the influences of storage status (original sample or genomic DNA) and time on the mutations of EGFR gene in non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** Ten fresh frozen tissues and 10 formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues of NSCLC harboring EGFR mutations were collected. During the twelve months after the first detection, DNA was drawn from fresh frozen tissues (new frozen extraction group) and FFPE tissues (new FFPE extraction group) at an interval of one month. The remaining genomic DNA from fresh frozen tissues (reserved frozen group) and FFPE tissues (reserved FFPE group) were chosen as control after the first detection. The detection kits were used to qualitatively and quantitatively measure the mutations of EGFR gene in four groups, and real time PCR was performed to quantify the Ct value of reference gene to reflect the contents of genomic DNA. The mutation frequencies of EGFR gene and Ct values of reference gene were compared among 4 groups. **Results** The mutation of EGFR gene could be detected in 20 tissues of original samples, which were consisting with the clinical data. The concentrations of DNA drawn from fresh frozen tissues and FFPE tissues were above 50ng/ μ l with A_{260}/A_{280} around 1.8 ± 0.2 . The Ct values were high in the reserved frozen group versus the new frozen extraction group after 10 months ($P < 0.05$). No significant difference of Ct value was observed between the new FFPE extraction group and the reserved FFPE group ($P > 0.05$). The mutation frequencies of EGFR gene in the new frozen extraction group after 6 months and the new FFPE extraction group after 4 months were significant higher than those in the corresponding reserved group ($P < 0.05$). **Conclusion** Original samples are better resources than reserved genomic DNA in retrospective studies.

【Key Words】 Tissue samples; Storage status; Storage time; Mutation of EGFR gene

肿瘤 DNA 样本、新鲜冰冻组织和石蜡包埋 (formaldehyde-fixed paraffin-embedded, FFPE) 组织

能够保存多年,近年来已广泛用于肿瘤相关突变基因筛选、基因诊疗、恶性肿瘤流行特征及动态分析

1 通讯作者, E-mail: steven9130@sina.com

等工作,因而逐渐成为分子生物学研究的重要材料来源^[1]。肿瘤相关基因突变的检测需要 DNA 样本,虽然目前可长期保持组织和基因组 DNA 样本,且 DNA 质量在一定时间内不受影响,但对于将其用于基因突变检测是否影响结果鲜有报道。本研究通过提取不同保存时间的原始样本(新鲜冰冻组织和 FFPE 组织)DNA,与不同保存时间的预留基因组 DNA 比较表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)基因突变定量检测情况,为今后回顾性研究优选研究样本提供参考。

1 材料与方法

1.1 组织样本的收集、混匀及分装 收集首都医科大学肺癌诊疗中心 1 年内的新鲜冰冻组织及石蜡包埋样本各 10 例,均经病理学诊断为非小细胞肺癌(NSCLC),且携带 EGFR 基因突变。取新鲜冰冻组织,在液氮下于研钵中磨碎、混匀后按 30mg/管分装于 12 个冻存管中,于 -80℃ 保存。取石蜡包埋样本连续切片,于研钵中磨碎、混匀后按 100mg/管分装于 12 个 EP 管中,室温保存。

1.2 主要试剂与仪器 DNeasy Blood & Tissue Kit、QIAamp DNA FFPE Tissue Kit 均购自 QIAGEN 公司,人 EGFR 基因突变检测试剂盒(荧光 PCR 法)、人 EGFR 基因突变定量检测试剂盒(荧光 PCR 法)均购自北京雅康博生物科技有限公司, NanoDrop ND-2000 购自 Thermo 公司, Mx3000P 型荧光定量 PCR 仪购自 Aligent 公司。

1.3 DNA 提取 分别使用 DNeasy Blood & Tissue Kit、QIAamp DNA FFPE Tissue Kit 提取不同保存时间的的新鲜冰冻组织、FFPE 组织的基因组 DNA,具体操作参照按试剂盒说明书。每保存 1 个月提取 1 次新鲜冰冻组织及 FFPE 组织的基因组 DNA(共 12 次),设为冰冻新提取组和 FFPE 新提取组;同时分别选取初检后预留基因组 DNA 作对照,设为冰冻预留组和 FFPE 预留组。

1.4 DNA 浓度和质量检测 使用 NanoDrop ND-2000 检测上述 4 组 DNA 浓度及 A_{260}/A_{280} 比值。将 4 组所有待检测基因组 DNA 稀释至 20ng/ μ l。冰冻预留组和 FFPE 预留组的 DNA 按照 20ng/ μ l 分装保存于 -20℃。

1.5 EGFR 基因突变定性检测 使用人 EGFR 基因突变检测试剂盒[国药药监械(准)字 2012 第 3401300 号]对上述 4 组的 EGFR 基因突变进行筛

选。由于此试剂盒已获国家药监局批准且其在说明书中标示的灵敏度(1%)相对于 Sanger 测序法(10%~20%)高,因此未对阳性结果进行测序验证。

1.6 EGFR 基因突变定量检测 内参基因含量可反映基因组 DNA 含量,故利用荧光定量 PCR 技术检测内参基因,其 Ct 值可以表示内参基因含量^[1-2]。采用人 EGFR 基因突变定量检测试剂盒定量检测 4 组 DNA 中 EGFR 基因 18~21 号外显子共 45 种突变情况,具体操作参照试剂盒说明书。利用标准曲线计算突变型、野生型基因拷贝数,并计算突变频度,突变频度=突变型/(突变型+野生型) \times 100%。

1.7 统计学分析 采用 SPSS 16.0 版软件处理。数据以均数 \pm 标准差表示,采用 *t* 检验比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EGFR 基因突变的初检结果 20 例原始组织样本均可检出 EGFR 基因突变,与临床信息相符。新鲜冰冻组织、FFPE 组织的 DNA 浓度均 $>50\text{ng}/\mu\text{l}$,且 A_{260}/A_{280} 为 1.8 ± 0.2 ,可满足后续实验要求。见表 1。

表 1 20 例原始组织样本的 EGFR 基因突变情况

编号	基因突变	突变频度(%)
新鲜冰冻组织		
1	21 号外显子 L858R	46.3
2	19 号外显子缺失	11.7
3	21 号外显子 L858R	83.8
4	21 号外显子 L858R	63.8
5	18 号外显子 G719X	16.1
6	19 号外显子缺失	21.6
7	19 号外显子缺失	13.7
8	21 号外显子 L858R	2.6
9	19 号外显子缺失	11.6
10	21 号外显子 L858R	36.5
石蜡包埋样本		
11	19 号外显子缺失	37.0
12	19 号外显子缺失	22.1
13	21 号外显子 L858R	24.4
14	21 号外显子 L858R	6.2
15	21 号外显子 L858R	3.6
16	19 号外显子缺失	8.5
17	21 号外显子 L858R	92.5
18	19 号外显子缺失	24.0
19	19 号外显子缺失	83.1
20	21 号外显子 L858R	18.3

2.2 内参基因的检测结果 冰冻新提取组与 FFPE 新提取组的内参基因 Ct 值随保存时间延长,无明显变化趋势;冰冻预留组和 FFPE 预留组的内参基因 Ct 值随保存时间延长,略有增加趋势。新鲜冰冻组织保存 10 个月后,冰冻预留组的内参基因 Ct 值高于冰冻新提取组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$); FFPE 保存 12 个月内,FFPE 新提取组和 FFPE 预留组内参基因 Ct 值的差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 1。

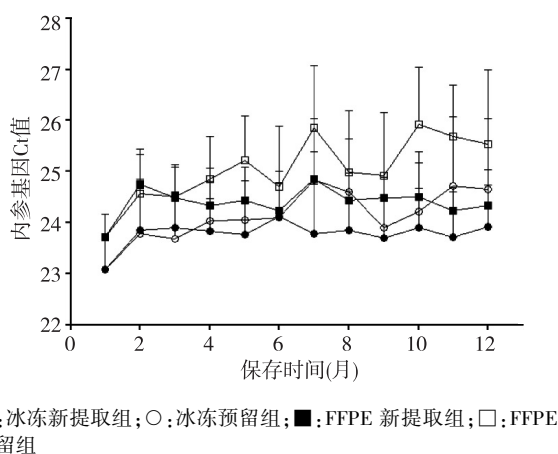


图 1 内参基因检测 Ct 值随保存时间的变化情况

2.3 EGFR 基因突变定量的检测结果 冰冻新提取组保存 12 个月均为阳性结果,但冰冻预留组,4 号、8 号自第 5 个月起、7 号自第 8 个月起为阴性结果;FFPE 新提取组,14 号、15 号第 12 个月检测为阴性结果,其余均为阳性结果,而 FFPE 预留组中,15 号自第 4 个月起、14 号自第 7 个月起、16 号自第 9 个月起、20 号第 12 个月均为阴性。冰冻预留组和 FFPE 预留组随保存时间延长,EGFR 基因突变频率呈明显下降趋势。冰冻新提取组保存 6 个月后的 EGFR 基因突变频率均高于冰冻预留组,FFPE 新提取组保存 4 个月后的均高于 FFPE 预留组,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2。

3 讨论

医院建立的生物样本库,保存有大量的新鲜冰冻组织、FFPE 组织等原始样本。若原始样本有限,也会将此前提取的基因组 DNA 留存。这些样本将在回顾性研究中发挥重要作用,如 EGFR 基因突变与酪氨酸激酶抑制剂疗效关系的回顾性分析等。通过类似的回顾性分析,越来越多的基因突变检测

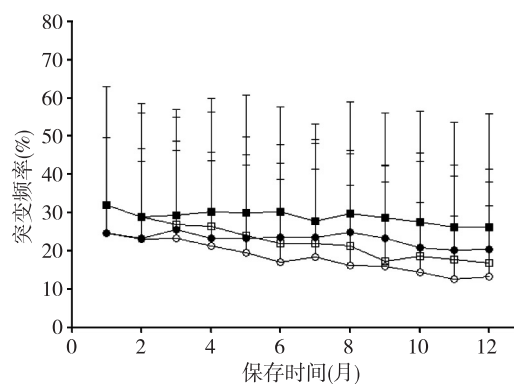


图 2 EGFR 基因突变频率随保存时间的变化情况

可用于药物疗效的预测,以指导临床治疗,并最终实现“个体化”治疗,使更多患者获益。然而这些样本的长时间保存,是否会影响癌症相关基因突变的检测结果,进而影响回顾性研究结果,国内外对此鲜有报道。

本研究首先将新鲜冰冻组织用液氮快速冷冻后,均匀研磨成粉状,分装后再进行 DNA 提取,这尽可能保证后续每次提取 DNA 的用量保持稳定。FFPE 因在制作过程中经梯度酒精脱水等操作,组织体积有一定程度缩小,5 μ m 厚的切片所包含的细胞数量可能较冰冻样本稍多,但数值无法估算,且在样本保存、提取等过程中有较多影响因素,因而未分析两者的 DNA 产量。对提取 DNA 的质量检测显示 DNA 质量较好, A_{260}/A_{280} 为 1.8 ± 0.2 ,均能够满足后续实验的要求。

本研究选取 EGFR 基因突变检测来考察样本保存时间长短是否能真实反映突变情况。EGFR 是与 NSCLC 发生发展有密切相关的基因。研究表明,东亚地区 NSCLC 患者的 EGFR 基因突变率为 18.4%~36.8%,远高于欧美地区,而吉非替尼治疗有效者的 EGFR 基因突变发生率明显高于无效者^[3-5]。对 EGFR 基因突变的数据分析表明,89% 的突变集中在 19 号外显子缺失和 21 号外显子 L858R 点突变^[3],因此通过检测 NSCLC 患者的 EGFR 基因常见突变,旨在了解 EGFR 基因突变状况及其与酪氨酸激酶抑制剂疗效及预后的相关性,因此对肺癌个体化治疗中有很大的临床应用价值。

本研究中对已知 EGFR 基因突变的 20 例 NSCLC 组织原始样本(冰冻组织和石蜡包埋组织)和初检后剩余 DNA 样本同时进行 1~12 个月保存,

每个月对原始样本进行 DNA 提取,并与剩余 DNA 一同进行内参基因和 EGFR 基因突变的定量检测。对内参基因的检测结果表明无论是原始样本还是剩余 DNA 样本(除个别时间点外),随保存时间的延长对检测结果并未造成明显影响,表明原始样本或剩余 DNA 样本在长期保存后,并不影响一般基因的检测,与一些文献报道相符^[6]。

在检测 EGFR 基因突变频度时发现,剩余 DNA 样本中,个别预留 FFPE 样本在保存 4 个月出现了无法检出基因突变情况,并且检出的突变频度较初检时明显降低;而冰冻预留组织则保存于 6 个月后出现上述情况。原始样本的整体检出结果良好,突变频度虽有所降低但并不明显。原始样本的突变频度保持效果优于预留 DNA,如冰冻新提取组保存 6 个月后和 FFPE 新提取组保存 4 个月后的 EGFR 基因突变频度均高于对应预留组。与初检时的突变频度相比,未检出 EGFR 突变或检出突变频度明显降低的样本的突变频度均较低(<20%),这就可能造成了随着保存时间的延长,突变型基因降解,导致了“假阴性”的结果。

综上所述,建议在今后使用生物样本库进行肿

瘤相关基因突变的回顾性研究或对比不同检测技术时,优选原始样本作为研究样本,以尽可能减少“假阴性”的检测结果。

参考文献

- [1] Sam SS, Lebel KA, Bissaillon CL, et al. Automation of genomic DNA isolation from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues [J]. *Pathol Res Pract*, 2012, 208(12): 705-707.
- [2] Wang G, Maher E, Brennan C, et al. DNA amplification method tolerant to sample degradation[J]. *Genome Res*, 2004, 14(11): 2357-2366.
- [3] Chan SK, Gullick WJ, Hill ME. Mutations of the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer-search and destroy[J]. *Eur J Cancer*, 2006, 42(1): 1723.
- [4] 王玉丽,刘红雨,陈 军,等.非小细胞肺癌中 EGFR 基因状态的检测对 EGFR-TKIs 疗效的预测价值[J]. *中国肺癌杂志*, 2010, 13(4): 375-379.
- [5] 黄韵坚,黄 诚,柯耀明,等.老年非小细胞肺癌患者 EGFR 基因的突变研究[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2012, 17(3): 207-210.
- [6] 张佳年,于颖彦,计 骏,等.低温冻存时间对肿瘤组织生物大分子的影响[J]. *诊断学理论与实践*, 2009, 8(1): 38-42.

收稿日期:2013-08-12; 修回日期:2013-11-04