

## PCR-SSCP检测非小细胞肺癌EGFR基因突变的 筛检试验评价\*

奉水东<sup>①</sup> 谭红专<sup>②</sup> 凌宏艳<sup>③</sup>

**摘要 目的:**评价PCR-SSCP筛检非小细胞肺癌(NSCLC)EGFR基因突变的临床应用潜力。**方法:**分别采用DNA测序法和PCR-SSCP分析对一定数量的NSCLC标本进行EGFR基因突变检测,以DNA测序结果为金标准,计算PCR-SSCP法的灵敏度、假阴性率、特异度、假阳性率、约登指数、粗符合率、预测值和似然比等指标;同时随机抽取20%的样本,重新进行PCR-SSCP分析,计算两次结果的Kappa指数值。**结果:**PCR-SSCP分析的灵敏度为97.2%,假阴性率为2.8%,特异度为94.3%,假阳性率为5.7%,约登指数为0.915,粗符合率为94.8%,阳性预测值为77.8%,阴性预测值为99.4%,阳性似然比为17.1,阴性似然比为0.5,前后两次PCR-SSCP分析的Kappa指数值为0.81( $P < 0.05$ )。**结论:**PCR-SSCP检测NSCLC EGFR基因突变具有较高的真实性、可靠性和实用性。

**关键词** 非小细胞肺癌 EGFR基因 突变 PCR-SSCP 检测

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.05.005

### An Evaluation on the Potential Clinical Application of PCR-SSCP Screening EGFR Mutations in Non-small Cell Lung Cancer

Shuidong FENG<sup>1</sup>, Hongzhuan TAN<sup>2</sup>, Hongyan LING<sup>3</sup>

Correspondence to: Shuidong FENG, E-mail:shuidong\_f@hotmail.com

<sup>1</sup>Department of Epidemiology & Health Statistics, School of Public Health, University of South China, Hengyang 421001, China

<sup>2</sup>Department of Epidemiology & Health Statistics, School of Public Health, Central South University, Changsha 410078, China

<sup>3</sup>Department of Physiology, School of Medicine, University of South China, Hengyang 421001, China

This work was supported by a grant from the Natural Science Foundation of Hunan Province (No.10JJ6046)

**Abstract Objective:** To evaluate the clinical application potentiality of PCR-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) used to screen EGFR mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods:** Certain NSCLC specimens were tested with PCR-SSCP analysis and DNA sequencing respectively, and then some related indices were calculated, such as sensitivity, false negative rate, specificity, false positive rate, Youden index, crude agreement rate, likelihood ratio, and predictive value, taking the results of DNA sequencing as the "gold standard". At the same time, 20% of the tested specimens were randomly sampled for a second PCR-SSCP analysis, and the value of Kappa index was calculated by comparing the results from two PCR-SSCP analyses. **Results:** Of PCR-SSCP analysis, sensitivity was 97.2%, false negative rate was 2.8%, specificity was 94.3%, false positive rate was 5.7%, Youden index was 0.915, crude agreement rate was 94.8%, positive likelihood ratio was 17.1, negative likelihood ratio was 0.5, positive predictive value was 77.8%, negative predictive value was 99.4%, and Kappa index was 0.81 ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** PCR-SSCP analysis has high validity, reliability and practicability in screening EGFR mutations in NSCLC.

**Keywords** NSCLC; EGFR gene; Mutation; PCR-SSCP; Detection

目前肿瘤化疗主要依赖细胞毒性药物,但其对大多数实体瘤的疗效迄今仍然十分有限并还存在明显的毒副反应<sup>[1]</sup>,在肺癌患者中表现得尤为明显。肺癌患者的5年生存率未及15%<sup>[2]</sup>,其原因在于肺癌的早期发现不易,一旦发现往往进入中晚期,此时已错过手术治疗的最佳时机<sup>[3]</sup>,而采用常规药物进行化疗效果有限。吉非替尼对局部晚期或转移性非小细胞

肺癌患者有较好的疗效和安全性,而EGFR基因突变是肺癌对吉非替尼敏感性的一个预测因子<sup>[4-5]</sup>,因此早期检测和了解肺肿瘤组织中EGFR基因的突变,对于指导临床用药和更好地实施肺癌的个体化治疗具有重要的参考价值。聚合酶链式反应-单链构象多态性(PCR-single strand conformation polymorphism, PCR-SSCP)分析是一种定性检测基因突变的方法,

作者单位:①南华大学公共卫生学院流行病与卫生统计学教研室(湖南省衡阳市421001);②中南大学公共卫生学院流行病与卫生统计学教研室;③南华大学医学院生理学教研室

\*本文课题受湖南省自然科学基金(编号:10JJ6046)资助

通信作者:奉水东 shuidong\_f@hotmail.com

因具有快速、简便、灵敏和经济的特点而广泛受到研究者的青睐<sup>[6-7]</sup>。尽管国外已有研究报道PCR-SSCP分析可应用于检测肺癌EGFR基因突变<sup>[8]</sup>,但未涉及对该方法临床应用潜力的全面评价。因此本研究拟对此进行尝试,为其后续临床应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 研究人群的选择 选择2006年6月至2007年6月在湖南省肿瘤医院、中南大学湘雅医院和中南大学湘雅二医院三所大型医院收治住院并通过病理组织学诊断为NSCLC的212例患者作为研究对象。由于目前国内外鲜见对PCR-SSCP分析进行临床应用评价的相关资料可供借鉴,所以假设PCR-SSCP技术预期的灵敏度和特异度分别为90%和80%, $\alpha=0.05$ , $\delta=0.1$ ,分别按照公式 $n=[57.3u_a/\sin^{-1}(\delta/\sqrt{p(1-p)})]^2$ 和公式 $n=u_a p(1-p)/\delta^2$ (前后两个公式中的 $p$ 分别代表灵敏度和特异度)来估计所需的样本量<sup>[9]</sup>。通过计算可知,收集的样本满足筛检评价的要求。

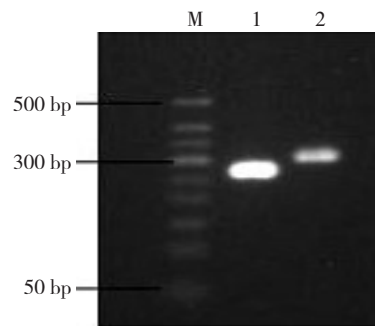
1.1.2 仪器和试剂 仪器主要包括:SDS-PAGE微型电泳仪及电泳槽(BioRad公司)、普通梯度PCR仪(BioRad公司)、低温高速离心机(Eppendorf公司)、紫外分光光度计(Beckman公司)、凝胶成像分析系统(Alpha公司)。试剂主要包括:聚丙烯酰胺、亚甲基双丙烯酰胺、过硫酸胺、TEMED均购自Amresco公司;DNA提取试剂盒、Tris碱、蛋白酶K均购自北京天根生化科技有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 盲法测试 以DNA测序法作为PCR-SSCP技术评价的金标准。所有组织标本通过DNA测序确定有无EGFR基因突变。首先提取组织DNA和进行PCR,再配制2%的琼脂糖凝胶,对EGFR基因exon19、exon21的PCR产物进行电泳,判断PCR产物的大小和预期是否相符(图1),然后进行PCR产物的直

接测序。同时在未知DNA测序结果的情况下,采用PCR-SSCP分析对所有组织标本进行EGFR基因突变的检测和判断。为了检验PCR-SSCP分析的可靠性,随机抽取20%的组织标本,重新进行PCR-SSCP分析,与第1次PCR-SSCP分析结果进行比较。

1.2.2 资料整理 分别将PCR-SSCP分析测定的结果与DNA测序判定的结果以及前后两次PCR-SSCP分析测定的结果进行比较,计算PCR-SSCP分析作为筛检试验的各项评价指标值。相关的指标为灵敏度、假阴性率、特异度、假阳性率、约登指数(Youden-index)、粗符合率、预测值、似然比和Kappa指数。



M:DNA分子量标准;1:外显子19;2:外显子21

图1 EGFR基因exon19、exon21 PCR产物的琼脂糖凝胶电泳

Figure 1 Electrophotogram of the target PCR product of EGFR exon19 and exon21

### 1.3 统计学分析

Kappa指数采用SPSS 16.0软件进行计算。

## 2 结果

计数资料采用例数( $n$ )表示。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

### 2.1 DNA测序分析

所有组织标本经处理(包括PCR和纯化)之后,由上海生物工程服务有限公司进行DNA测序。在212例肺癌标本中,有36例存在EGFR基因突变(表1)。

表1 NSCLC EGFR基因外显子19和21的突变类型分布

Table 1 The distribution of mutation types in EGFR exon 19 and exon 21 in NSCLC

| 病理类型  | 性别 | 外显子 | 核苷酸改变                       | 氨基酸改变        |
|-------|----|-----|-----------------------------|--------------|
| Sq    | M  | 19  | 2235_2249delGGAATTAAGAGAAGC | E746_A750del |
| Ad/Sq | M  | 19  | 2235_2249delGGAATTAAGAGAAGC | E746_A750del |
| Ad    | F  | 19  | 2235_2249delGGAATTAAGAGAAGC | E746_A750del |
| Ad/Sq | F  | 19  | 2235_2249delGGAATTAAGAGAAGC | E746_A750del |
| Sq    | F  | 19  | 2235_2249delGGAATTAAGAGAAGC | E746_A750del |
| Sq    | M  | 19  | 2235_2249delGGAATTAAGAGAAGC | E746_A750del |
| Ad    | M  | 19  | 2235_2249delGGAATTAAGAGAAGC | E746_A750del |
| Ad    | M  | 19  | 2235_2249delGGAATTAAGAGAAGC | E746_A750del |
| Ad/Sq | F  | 19  | 2235_2249delGGAATTAAGAGAAGC | E746_A750del |
| Sq    | F  | 19  | 2235_2249delGGAATTAAGAGAAGC | E746_A750del |

(续表1)

| 病理类型  | 性别 | 外显子 | 核苷酸改变                          | 氨基酸改变            |
|-------|----|-----|--------------------------------|------------------|
| Ad/Sq | M  | 19  | 2235_2249delGGAATTAAGAGAAGC    | E746_A750del     |
| Ad/Sq | M  | 19  | 2235_2249delGGAATTAAGAGAAGC    | E746_A750del     |
| Ad    | F  | 19  | 2236_2250delGAATTAAGAGAAGCA    | E746_A750del     |
| Ad    | M  | 19  | 2236_2250delGAATTAAGAGAAGCA    | E746_A750del     |
| Ad    | M  | 19  | 2236_2250delGAATTAAGAGAAGCA    | E746_A750del     |
| BAC   | F  | 19  | 2236_2250delGAATTAAGAGAAGCA    | E746_A750del     |
| Ad/Sq | F  | 19  | 2236_2250delGAATTAAGAGAAGCA    | E746_A750del     |
| Ad    | F  | 19  | 2240_2257delTAAGAGAAGCAACATCTC | L747_P753delSins |
| Ad    | F  | 19  | 2240_2257delTAAGAGAAGCAACATCTC | L747_P753delSins |
| Ad    | F  | 19  | 2240_2257delTAAGAGAAGCAACATCTC | L747_P753delSins |
| Ad/Sq | M  | 19  | 2240_2251delAAGAGAAGCAAC       | L747_T751delSins |
| Ad    | F  | 19  | 2240-2254delTAAGAGAAGCAACAT    | L747-S752delSins |
| Sq    | M  | 21  | 2573T> G                       | L858R            |
| Sq    | M  | 21  | 2573T> G                       | L858R            |
| Ad    | M  | 21  | 2573 T> G                      | L858R            |
| Ad    | M  | 21  | 2573T> G                       | L858R            |
| Ad    | M  | 21  | 2573T> G                       | L858R            |
| Ad    | M  | 21  | 2573T> G                       | L858R            |
| Ad    | F  | 21  | 2573T> G                       | L858R            |
| Ad    | F  | 21  | 2573 T> G                      | L858R            |
| BAC   | F  | 21  | 2573T> G                       | L858R            |
| Ad    | F  | 21  | 2573T> G                       | L858R            |
| Ad    | F  | 21  | 2573 T> G                      | L858R            |
| Ad    | F  | 21  | 2573T> G                       | L858R            |
| Ad    | F  | 21  | 2573T> G                       | L858R            |
| Ad    | F  | 21  | 2573T> G                       | L858R            |

del: 缺失; ins: 插入; M: 男性; F: 女性; Ad: 腺癌; Sq: 鳞癌; Ad/Sq: 腺鳞癌; BAC: 肺泡细胞癌

## 2.2 PCR-SSCP分析的真实性评价指标

将DNA测序结果作为EGFR基因突变判断的金标准,PCR-SSCP分析的结果见表2并计算评价指标。灵敏度为97.2%,特异度为94.3%,Youden index为0.915,假阴性率为2.8%,假阳性率为5.7%,粗符合率为94.8%,阳性似然比为17.1,阴性似然比为0.5。

表2 PCR-SSCP检测NSCLC EGFR基因突变与DNA测序结果的比较 例

Table 2 The comparison of PCR-SSCP detecting EGFR mutation with DNA sequencing

| PCR-SSCP分析 | DNA测序分析  |           | 合计  |
|------------|----------|-----------|-----|
|            | EGFR基因突变 | 无EGFR基因突变 |     |
| 阳性         | 35       | 10        | 45  |
| 阴性         | 1        | 166       | 167 |
| 合计         | 36       | 176       | 212 |

## 2.3 PCR-SSCP分析的可靠性评价指标

在研究样本中随机抽取了约20%的标本(43

例),按照完全相同的条件进行第2次PCR-SSCP分析,比较前后两次结果的一致性。两次检测均为阳性(EGFR基因突变)的标本9例,两次检测均为阴性(无EGFR基因突变)的标本31例,Kappa指数值为0.81( $P<0.05$ )。

## 2.4 PCR-SSCP分析的实用性评价指标

在筛检试验中,预测值是衡量筛检试验收益(实用性)大小的一项重要指标,其能够预测筛检结果真正发生可能性的大小。本组阳性预测值为77.8%,阴性预测值为99.4%。

## 3 讨论

### 3.1 人群代表性、方法学、质量控制

本研究样本来自中南大学湘雅医院、中南大学湘雅二医院和湖南省肿瘤医院在指定时期住院的所有非小细胞肺癌患者。这三所医院为省内大型医院,住院患者来自全省各地,因此研究样本对总体非小细胞肺癌人群有一定的代表性。检测严格按照操作规程,所有的标本在同一实验室,由相同的实验人

员操作完成。所有肺癌病例的诊断均基于病理组织学或细胞学的检查。上述分析表明研究结果具有较高的可信程度。

### 3.2 真实性指标分析

理想的筛检试验应该同时具有真实性、可靠性和实用性,即应同时符合简便、经济、安全和真实可靠的标准。真实性也称准确性,指检测结果与真实情况相符合的程度,评价的指标主要有灵敏度、特异度,以及一些相关的指标,如 Youden index、粗符合率、假阳性率和假阴性率等。本研究结果显示 PCR-SSCP 分析筛检 EGFR 基因突变的灵敏度为 97.2%,特异度为 94.3%, Youden index 为 0.915,三者均 >90%,表明 PCR-SSCP 分析检测非小细胞肺癌 EGFR 基因突变具有很高的真实性。通过其余派生的指标同样可以得到印证。

### 3.3 可靠性指标分析

可靠性,即重复性或精确性,是科学性的另一个方面。是指在相同条件下,用同样一种检测方法重复检测同一批受试对象或标本,各次结果之间的一致程度。评价的指标较多,其中较常用的有组内相关系数(计量资料)和 Kappa 指数(计数资料)。本研究的结果为计数资料,所以选择 Kappa 指数来评价 PCR-SSCP 分析的可靠性。Kappa 指数因考虑了机遇因素对一致性的影响并加以校正,从而提高了判断的有效性。本研究随机抽取了约 20% 的研究样本重复一次进行 PCR-SSCP 分析,得到的 Kappa 指数值为 0.81 ( $P < 0.05$ ),表明前后两次结果有极高一致性,提示该检测手段具有较高的可靠性。

### 3.4 实用性指标分析

实用性,即方法是否简单,患者与医护人员是否容易接受,取得社会效益、经济效益、成本效益的比值如何等<sup>[10]</sup>。尽管本研究因未收集效益相关的数据而未能对 PCR-SSCP 分析的社会经济学效果得出具体的评价,但是从试剂和仪器需求来说,PCR-SSCP 分析所需成本相对于 DNA 测序要低得多(前者不到后者的 1/3),因此能有效地减少采用标准方法大量盲目测序时带来的人力、物力和时间上的浪费,具有明显的经济效益。预测值,即预告值或诊断价值,是评价在人群中开展筛检试验收益的重要指标。结果显示,PCR-SSCP 分析的阳性预测值为 77.8%,阴性预测值为 99.4%,表明筛检结果的意义较大,具有较高的参考价值,特别是阴性结果。此外,PCR-SSCP 分析原理清楚,操作简单,无需特殊仪器,技术容易常握,分析周期短,整个过程可在 1~2d 内完成(DNA 测序的分析周期至少 1 周以上),提示 PCR-SSCP 分析符合临床筛检应用的原则,即简单实用的特点。

### 3.5 应用前景

PCR-SSCP 分析是一种以 PCR 为基础,基于单链 DNA 构象差别检测基因突变的方法。与其他检测突变的方法相比,PCR-SSCP 分析能够检测所有已知和未知的突变类型,具有高通量的特点;此外,PCR-SSCP 分析特别适用于混合细胞群体中 DNA 变异的检测<sup>[11]</sup>。因为肺肿瘤的异质性较高,当进行测序检测时,首先要保证所选肿瘤组织有较多的肿瘤细胞,而 PCR-SSCP 分析对 DNA 原始材料纯度要求不高,且所需量较少,为该技术在基础研究和临床应用提供了极大方便。

#### 参考文献

- 1 Cohen V, Khuri FR. Chemoprevention of lung cancer: current status and future prospects[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2002, 21(3-4): 349-362.
- 2 Butler CA, Darragh KM, Currie GP, et al. Variation in lung cancer survival rates between countries: do differences in data reporting contribute[J]? *Respir Med*, 2006, 100(9): 1642-1646.
- 3 Kosmidis P. Chemotherapy in NSCLC: historical review[J]. *Lung Cancer*, 2002, 38(Suppl 3): S19-S22.
- 4 Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy[J]. *Science*, 2004, 304(5676): 1497-1500.
- 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 顾真庆,冯志新,王占伟,等.PCR-SSCP 技术在微生物检测中的应用[J]. *生物技术通报*, 2011, 2: 70-74.
- 7 吴兆海,许庆方.PCR-SSCP 技术的研究与应用[J]. *畜牧与饲料科学*, 2010, 31(8): 47-48.
- 8 Marchetti A, Martella C, Felicioni L, et al. EGFR mutations in non-small-cell lung cancer: analysis of a large series of cases and development of a rapid and sensitive method for diagnostic screening with potential implications on pharmacologic treatment[J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(4): 857-865.
- 9 王建华,主编.流行病学[M].第 7 版.北京:人民卫生出版社,2008:96-98.
- 10 谭红专,主编.现代流行病学[M].第 2 版.北京:人民卫生出版社,2008: 299-312.
- 11 薛燕,常洪,常国斌.PCR-SSCP 技术在动物育种中的研究进展[J]. *畜牧兽医杂志*, 2005, 24(3): 21-24.

(2011-09-07 收稿)

(2011-11-08 修回)

(张佺校对)