

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.10.004

宁夏某医院 225 例非小细胞肺癌患者 EGFR 基因突变检测结果分析*

师志云^{1,2}, 郭雅琪¹, 江海峰³, 张玉英¹, 赵 玥¹, 赵倩颖¹, 何学虎¹, 梁小燕¹, 董 洁¹, 贾 伟^{1,2△}

1. 宁夏医科大学总医院医学实验中心, 宁夏银川 750004; 2. 宁夏临床病原微生物重点实验室, 宁夏银川 750004; 3. 宁夏医科大学总医院病理科, 宁夏银川 750004

摘要:目的 分析宁夏某医院非小细胞肺癌(NSCLC)患者表皮生长因子受体(EGFR)基因突变检测结果。方法 选择 2014 年 1 月至 2017 年 12 月在宁夏医科大学总医院住院的 NSCLC 患者 225 例进行回顾性分析, 用扩增阻滞突变系统-聚合酶链反应(ARMS-PCR)检测 EGFR 基因突变情况。结果 EGFR 基因总突变率 50.22%(113/225), 最常见突变位点为 19 外显子 19-del 及 21 外显子 L858R, 突变率分别为 21.33% 及 17.78%, 20 外显子 T790M 耐药突变率及 20-Ins 插入突变(非敏感突变)的突变率分别为 3.56% 及 1.33%; EGFR 各外显子双突变共 10 例; EGFR 基因突变率在性别、年龄、民族、季节、标本类型之间差异无统计学意义($P>0.05$), 在年份、病理类型之间差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 ARMS-PCR 可有效应用于临床病理石蜡标本基因突变检测, EGFR 基因在 19 和 21 外显子存在较高的突变率, 其突变亚型能指导小分子表皮生长因子酪氨酸酶抑制剂(EGFR-TKI)的肿瘤靶向治疗。

关键词:非小细胞肺癌; 表皮生长因子受体; 基因突变; 扩增阻滞突变系统
中图分类号:R734.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2020)10-1324-04

Analysis on detection results of EGFR gene mutation in 225 cases of non-small cell lung cancer in a hospital of Ningxia*

SHI Zhiyun^{1,2}, GUO Yaqi¹, JIANG Haifeng³, ZHANG Yuying¹, ZHAO Yue¹,
ZHAO Qianying¹, HE Xuehu¹, LIANG Xiaoyan¹, DONG Jie¹, JIA Wei^{1,2△}

1. Clinical Laboratory Center, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China; 2. Ningxia Key Laboratory of Clinical and Pathogenic Microbiology, Yinchuan, Ningxia 750004, China; 3. Department of Pathology, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China

Abstract: **Objective** To analyze the detection results of epidermal growth factor receptor (EGFR) gene mutation in the patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) in a hospital of Ningxia. **Methods** A total of 225 inpatients with NSCLC in the General Hospital of Ningxia Medical University from 2014 to 2017 were collected and retrospectively analyzed. The EGFR gene mutation was detected by ARMS-PCR. **Results** The total mutation rate of EGFR gene was 50.22% (113/225). The most common mutation sites were 19 exon 19-del and 21 exon L858R. The mutation rates were 21.33% and 17.78%, respectively. The mutation rates of exon 20 T790M drug resistance and 20-Ins insertion mutation (non-sensitive mutation) were 3.56% and 1.33%, respectively. There were 10 cases of double mutations in each EGFR exon. There was no statistically significant difference in the mutation rate of EGFR gene among the sex, age, ethnicity, season and specimen types ($P>0.05$). There was the statistically significant difference between the year and pathological type ($P<0.05$). **Conclusion** The ARMS-PCR method can be effectively applied to the gene mutation detection of clinical pathological paraffin sample. EGFR gene has high mutation rate in 19 and 21 exons, and its mutation subtype can direct tumor-targeted therapy of micromolecular EGFR-TKI.

Key words: non-small cell lung cancer; epidermal growth factor receptor; gene mutation; amplification refractory mutation system

* 基金项目: 宁夏医科大学校级课题一般项目(XM2018090); 宁夏医科大学教育教学改革研究项目(NYJY1861); 宁夏高等学校一流学科建设(宁夏医科大学国内一流建设学科临床医学)资助项目(NXYLXK2017A05)。

作者简介: 师志云, 女, 副主任医师, 主要从事临床分子诊断方面的研究。 △ 通信作者, E-mail: jiawei6365@126.com。

肺癌是全球范围内发病率和病死率最高的恶性肿瘤之一,《2018 年美国癌症统计》报告中指出 2018 年美国将出现 173.5 万例癌症新发病例和 60.9 万例癌症死亡病例,其中肺癌发病人数为 12.1 万例(14%),死亡人数为 11.2 万例(13%)^[1]。《A Cancer Journal for Clinicians》公布了 2015 年中国有 429.2 万新发肿瘤病例和 281.4 万肿瘤死亡病例^[2],肺癌是癌症死因之首。非小细胞肺癌(NSCLC)约占原发性肺癌的 85%^[3],临床上大部分患者确诊时已为晚期^[4],失去了最佳手术治疗时机。

随着肿瘤分子生物学的发展,分子靶向治疗药物如小分子表皮生长因子酪氨酸酶抑制剂(EGFR-TKI)的出现^[5-6],为 NSCLC 患者带来曙光。研究报道,EGFR 基因突变是 EGFR-TKI 敏感的重要预测因子^[7]。本试验采用的扩增阻滞突变系统(ARMS)法是目前检测 EGFR 基因突变最为敏感的方法,对 2014 年 1 月至 2017 年 12 月在宁夏医科大学总医院就诊的 225 例 NSCLC 患者进行 EGFR 基因突变检测,并对其不同性别、年龄、民族、年份、季节、标本类型及病理类型进行比较分析,为判断疾病发展过程、预后及 EGFR-TKI 靶向治疗提供分子病理学依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2014 年 1 月至 2017 年 12 月在宁夏医科大学总医院住院的首次确诊或术后复发的晚期 NSCLC 患者 225 例为研究对象,其中男 117 例,女 108 例;年龄 23~85 岁,平均(58.9±11.0)岁;225 例标本中组织石蜡切片 201 例,胸腔积液细胞蜡块 24 例;病理类型中腺癌 204 例,鳞癌 12 例,腺鳞癌 6 例,大细胞癌 3 例。纳入标准:(1)组织学或细胞学确诊为 NSCLC;(2)在 2014 年 1 月 1 日至 2017 年 12 月 31 日首次确诊或术后复发的晚期 NSCLC 住院患者。排除标准:(1)没有病理确诊的 NSCLC 患者;(2)不符合纳入标准的其他情况的患者。

1.2 试剂与仪器 FFPE DNA 提取试剂盒(中国厦门艾德生物医药科技股份有限公司)、人类 EGFR 基因 29 种突变荧光 PCR 检测试剂盒(中国厦门艾德生物医药科技股份有限公司);7500 型荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司),DS-11 微量核酸蛋白浓度测定仪(美国 DeNovix 公司)。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 手术石蜡切片及细胞石蜡标本均经有经验的病理科医生进行质量评估,切取 5~8 张白片,装于 EP 管内,立即进行 DNA 提取。

1.3.2 DNA 提取 严格按照试剂说明书进行操作。

1.3.3 DNA 纯度及水平测定 A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.0,DNA 水平调整至 2 ng/ μ L。

1.3.4 ARMS-PCR 检测 ARMS-PCR 对 EGFR 基因编码区的 4 个外显子 29 种突变位点进行检测,所有试验均设阴、阳性对照。

1.3.5 结果判读 严格按照试剂盒说明书提供的检验结果的解释进行判读。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计学软件对所得数据进行统计学处理,计数资料以例数或百分率表示,组间比较用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EGFR 基因突变率及突变类型 225 例患者中,EGFR 基因共突变 113 例,总突变率为 50.22%(113/225)。其中,最常见突变为 19、21 外显子,突变亚型最多的为 19-del,共 48 例(21.33%),其次为 21-L858R,共 40 例(17.78%)。EGFR 基因各种突变类型突变率相比,差异有统计学意义($\chi^2=148.209,P<0.05$),见表 1。在 113 例突变中,共发现 10 例双位点突变,包括 3 例 L858R 和 T790M 双突变,2 例 G719X 和 S768I 双突变,其余双突变(19-del 和 S768I,L858R 和 S768I,19-del 和 T790M,G719X 和 L861Q,G719X 和 T790M)各 1 例。

表 1 EGFR 基因突变率及突变类型

基因突变类型	突变例数	突变率(%)
19-del	48	21.33
21-L858R	40	17.78
20-T790M	8	3.56
18-G719X	6	2.67
20-S768I	4	1.78
21-L861Q	4	1.78
20-Ins	3	1.33
合计	113	50.22

注:EGFR 基因各种突变类型突变率相比, $\chi^2=148.209,P<0.05$ 。

2.2 EGFR 基因突变与临床特征的关系 225 例患者中,男、女突变率分别为 41.03%(48/117)和 50.93%(55/108),两者相比差异无统计学意义($P>0.05$); <60 岁与 ≥ 60 岁、汉族与回族突变率相比差异无统计学意义($P>0.05$);2014 年(63.89%)至 2017 年(30.19%)EGFR 基因突变率有明显下降趋势,差异有统计学意义($P<0.05$)。不同季节中,春季突变率最高(53.57%),冬季突变率最低(34.55%),四季突变率相比差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

2.3 EGFR 基因突变与病理特征的关系 225 例患者中,组织石蜡切片 EGFR 基因突变率 46.27%(93/201),胸腔积液细胞蜡块突变率 41.67%(10/24),两

者相比差异无统计学意义($P>0.05$)。病理类型中,腺癌标本占 90.67%(204/225),EGFR 基因突变率最高,占 49.02%(100/204),各种病理类型突变率相比差异有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

表 2 EGFR 基因突变与临床特征的关系

项目	<i>n</i>	突变型 (<i>n</i>)	野生型 (<i>n</i>)	突变率 (%)	χ^2	<i>P</i>
性别						
男	117	48	69	41.03	2.218	0.136
女	108	55	53	50.93		
年龄(岁)						
<60	107	42	65	39.25	3.500	0.061
≥60	118	61	57	51.69		
民族						
汉	191	86	105	45.03	0.288	0.592
回	34	17	17	50.00		
年份						
2014 年	36	23	13	63.89	10.051	0.018
2015 年	73	34	39	46.58		
2016 年	63	30	33	47.62		
2017 年	53	16	37	30.19		
季节						
3—5 月(春季)	56	30	26	53.57	3.724	0.293
6—8 月(夏季)	48	23	25	47.92		
9—11 月(秋季)	66	31	35	46.97		
12—2 月(冬季)	55	19	36	34.55		

表 3 EGFR 基因突变与病理特征的关系

项目	<i>n</i>	突变型(<i>n</i>)	野生型(<i>n</i>)	突变率(%)
标本类型				
组织石蜡切片	201	93	108	46.27
胸腔积液细胞蜡块	24	10	14	41.67
病理类型				
腺癌	204	100	104	49.02
鳞癌	12	1	11	8.33
腺鳞癌	6	2	4	33.33
大细胞癌	3	0	3	0.00

注:4 种病理类型突变率相比, $\chi^2=13.578,P<0.05$ 。

3 讨 论

近年来,随着分子信号传导通路在 NSCLC 发生、发展机制中研究的深入,相应靶向药物的驱动基因包括 EGFR 基因、间变性大细胞淋巴瘤激酶(ALK)融合基因、酪胺酸蛋白激酶(ROS1)基因重排逐渐成为热点,使 NSCLC 的治疗进入分子靶向治疗时代,且逐步实现个体化治疗。

EGFR 是一种跨细胞膜糖蛋白受体,具有酪氨酸激酶活性,是原癌基因,其突变及过表达与肿瘤细胞的增殖、活动性、粘连性、侵袭性、凋亡抑制和血管生成相关^[8]。2017 年美国国立综合癌症网络(NCCN)指南^[9]中建议对中晚期 NSCLC 患者进行 EGFR 基因常规检测,对于敏感突变患者推荐靶向药物作为一线治疗药物。目前 EGFR-TKI 已通过美国食品药品监督管理局(FDA)批准的药物有一代吉非替尼(gefitinib)和厄洛替尼(erlotinib)等,二代阿法替尼(afatinib)和三代奥西替尼(osimertinib)等^[10]。

既往研究表明,NSCLC 患者的 EGFR 基因突变率在不同国家、地区存在一定差异,亚洲人种 EGFR 基因突变率(51.4%)高于北美或欧洲(10%左右),且以女性、非吸烟、腺癌患者为主,达 70%~80%^[11-12]。本研究 225 例患者均采用 ARMS-PCR 进行 EGFR 基因突变检测,EGFR 基因总突变率达 50.22%(113/225),其中包括男性患者发生突变 48 例,突变率 41.03%(48/117);女性患者发生突变 55 例,突变率 50.93%(55/108),二者差异无统计学意义($P>0.05$),考虑可能与样本量不大有关。<60 岁突变率 39.25%(42/107)与≥60 岁突变率 51.69%(61/118)相比,汉族突变率 45.03%(86/191)与回族突变率 50.00%(17/34)相比,差异均无统计学意义($P>0.05$);春季(3—5 月)突变率最高(53.57%),冬季(12—2 月)突变率最低(34.55%),差异无统计学意义($P>0.05$);2014—2017 年 EGFR 基因突变率有明显下降趋势,从 63.89%下降到 30.19%,差异有统计学意义($P<0.05$)。

董强刚等^[13]将 176 例 NSCLC 患者行 EGFR 基因检测,其中腺癌组患者中 EGFR 基因突变率为 44.8%(30/67),腺鳞癌组患者 EGFR 基因突变率为 33.3%(10/30),鳞癌组患者突变率为 20.3%(13/64),差异有统计学意义($P<0.05$)。EGFR 基因突变在腺癌(或腺鳞癌)中突变率更高。本研究中,腺癌 204 例,突变 100 例,突变率 49.02%;腺鳞癌 6 例,突变 2 例,突变率 33.33%;鳞癌 12 例,突变 1 例,突变率 8.33%,3 种病理类型突变率差异有统计学意义($P<0.05$)。本研究 EGFR 基因突变在腺癌的 NSCLC 中更为常见,腺癌、腺鳞癌 EGFR 突变率与国内其他报道相符^[13-14]。

既往研究报道,EGFR 基因不同突变位点的生物学功能各有不同,外显子 18、19 及 21 发生突变的 NSCLC 对 EGFR-TKI 具有良好疗效,外显子 20 中 T790M 突变是形成 EGFR-TKI 继发性耐药的重要机制之一^[15],且最常见突变为 19 号外显子的缺失突变 19-del 和 21 号外显子的 L858R 点突变^[16]。WEI

等^[17]分析广西 NSCLC 患者 EGFR 基因突变率为 35.7%(537/1 506),且最常见的突变亚型为 19-del (293/1 506,19.5%)和 L858R(227/1 506,15.1%),并分析这两个突变位点在性别、吸烟情况、病理类型方面差异无统计学意义($P>0.05$)。在 HSIEH 等^[18]的研究中,21 号外显子突变所占比例更大(13/17,76.47%)。本研究中,19-del 缺失突变率为 21.33%(48/225),L858R 点突变率为 17.78%(40/225),20 外显子 T790M 耐药突变率为 3.56%(8/225),20 外显子 20-Ins 插入突变(非敏感突变)突变率为 1.33%(3/225),同时发现 10 例 EGFR 基因双位点突变。EGFR 基因总突变率与文献报道一致,只是突变类型比例稍有不同,考虑与样本量及人群选择有关。

因此,NSCLC 患者中 EGFR 基因存在较高的突变率,其基因突变分型有助于筛选出适合 EGFR-TKI 肿瘤靶向治疗的人群,指导临床个体化用药及减轻患者的经济负担。

参考文献

[1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2018[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1): 7-30.

[2] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.

[3] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.

[4] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2016[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(1): 7-30.

[5] KRIS M G, JOHNSON B E, BERRY L D, et al. Using multiplexed assays of oncogenic drivers in lung cancers to select targeted drugs[J]. JAMA, 2014, 311(19): 1998-2006.

[6] LEE C K, BROWN C, GRALA R J, et al. Impact of EGFR inhibitor in non-small cell lung cancer on progression-free and overall survival: a meta-analysis[J]. J Natl Cancer Inst, 2013, 105(9): 595-605.

[7] RECK M, HEIGENER DF, MOK T, et al. Management of non-small-cell lung cancer: recent developments[J]. Lancet, 2013, 382(9893): 709-719.

[8] ZANDI R, LARSEN A B, ANDERSEN P, et al. Mecha-

nisms for oncogenic activation of the epidermal growth factor receptor[J]. Cell Signal, 2007, 19(10): 2013-2023.

[9] MESA R, JAMIESON C, BHATIA R, et al. Myeloproliferative neoplasms, version 2. 2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2016, 14(12): 1572-1611.

[10] KE E E, WU Y L. EGFR as a pharmacological target in EGFR-mutant non-small-cell lung cancer: where do we stand now? [J]. Trends Pharmacol Sci, 2016, 37(11): 887-903.

[11] SHI Y, AU J S, THONGPRASERT S, et al. A Prospective, molecular epidemiology study of EGFR mutations in Asian patients with advanced non-small cell lung cancer of adenocarcinoma histology (PIONEER) [J]. J Thorac Oncol, 2014, 9(2): 154-162.

[12] MOLBERG N, SURATI M, DEMCHUK C, et al. Mind-mapping for lung cancer: towards a personalized therapeutics approach[J]. Adv Ther, 2011, 28(3): 173-194.

[13] 董强刚, 韩宝惠, 黄进肃, 等. 176 例非小细胞肺癌的 EGFR 基因突变分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2006, 28(9): 686-690.

[14] WANG S, WANG Z. EGFR mutations in patients with non-small cell lung cancer from mainland China and their relationships with clinicopathological features: a meta-analysis[J]. Int J Clin Exp Med, 2014, 7(8): 1967-1978.

[15] SIEGELIN M D, BORCZUK A C. Epidermal growth factor receptor mutations in lung adenocarcinoma[J]. Lab Invest, 2014, 94(2): 129-137.

[16] MITSUDOMI T, YATABE Y. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene and related genes as determinants of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors sensitivity in lung cancer[J]. Cancer Science, 2007, 98(12): 1817-1824.

[17] WEI W E, MAO N Q, NING S F, et al. An analysis of EGFR mutations among 1506 cases of non-small cell lung cancer patients in Guangxi, China[J]. PLoS One, 2016, 11(12): e018795.

[18] HSIEH R K, LIM K H, KUO T H, et al. Female sex and bronchioloalveolar pathologic subtype predict EGFR mutations in non-small cell lung cancer[J]. Chest, 2005, 128(1): 317-321.

(收稿日期:2019-10-25 修回日期:2020-03-10)

(上接第 1323 页)

[11] 吕毅, 郝宝岚, 王艳, 等. 手工分离血小板与单采血小板质量及输注疗效的对比研究[J]. 中国输血杂志, 2008, 21(9): 690-692.

[12] 赵敬红. 去白混合浓缩血小板与单采血小板输注临床效果观察[J]. 河南医学研究, 2017, 26(17): 3154-3155.

[13] 金泉, 武培彪. 混合浓缩血小板与单采血小板质量比较分

析[J]. 中国输血杂志, 2016, 29(1): 90-91.

[14] 林栋, 陈宝婵, 叶柱江. 去白混合浓缩血小板与单采血小板输注临床效果分析[J]. 血栓与止血学, 2015, 5(3): 176-178.

(收稿日期:2019-08-13 修回日期:2020-02-10)