

80例冀东非小细胞肺癌患者中 *EGFR* 基因突变研究

Study on Mutation of *EGFR* in 80 Patients with Non-small Cell Lung Cancer in Jidong Area // JIA Rui, XUE Lei, DU Hai-rong, et al.

贾 瑞¹, 薛 雷¹, 杜海荣¹, 杨宏伟², 高 鲲¹, 梁华刚¹

(1. 秦皇岛市第一医院, 河北 秦皇岛 066000;

2. 秦皇岛市卢龙县人民医院, 河北 秦皇岛 066400)

摘要: [目的] 探讨冀东非小细胞肺癌患者中表皮生长因子受体(*EGFR*)的突变情况及其与临床特征间的关系。[方法] 收集80例非小细胞肺癌患者采用 Real-time PCR 扩增法检测 *EGFR* 的突变情况。[结果] 80例非小细胞肺癌样本中, 女性 *EGFR* 突变率明显高于男性 ($P<0.05$); 腺癌患者 *EGFR* 突变率明显高于其他两种非小细胞肺癌患者 ($P<0.05$); 无吸烟史患者 *EGFR* 突变率明显高于有吸烟史患者 ($P<0.05$); 满族患者 *EGFR* 突变率明显高于汉族患者 ($P<0.05$)。[结论] 在非小细胞肺癌中, 女性 *EGFR* 基因的突变率高于男性; 不吸烟患者突变率高于吸烟患者; 较鳞癌和大细胞癌, 腺癌最容易发生突变; 满族突变率高于汉族。而且无论是满族还是汉族, 没有发现 *EGFR* 基因外显子 19 缺失突变和 *EGFR* 外显子 21 的 L858R 错义突变间差异。

关键词: 癌, 非小细胞肺; *EGFR*; 突变

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** B

文章编号: 1671-170X(2015)04-0343-03

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2015.04.B018

目前, 肺癌已成为各种癌症死亡的首要原因, 发病率和死亡率呈上升趋势, 全球每年有将近 140 万患者死于肺癌^[1]。世界卫生组织肺癌分类中, 肺癌的病理类型主要包括非小细胞肺癌和小细胞肺癌两大类, 其中非小细胞肺癌占肺癌总数的 80%~85%, 包括腺癌、鳞癌和大细胞癌^[2]。近几年在肺癌相关基因水平、转录水平等方面的研究上已取得显著进展。研究发现, 包括 *EGFR*、*KRAS*、*C-MET*、*EML4-ALK*、*ROS1* 在内的 9 种基因的突变常常引起非小细胞肺癌。而且, 目前分子靶向治疗逐渐成为临床上重要而有效的治疗手段。因此, 研究以上突变基因的表达情况将有力地促进非小细胞肺癌早期诊断并提供有效的靶向治疗方法。

表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, *EGFR*) 基因表达一种跨细胞膜糖蛋白, 属酪氨酸激酶受体。*EGFR* 基因在多种肿瘤中存在突变, 并通过其介导 *EGFR* 信号通路调控肿瘤的生长增殖、侵袭迁移及血管新生^[3,4]。在非小细胞肺癌中, 通过检测患者 *EGFR* 基因是否突变, 进而决定是否可以选择相应的酪氨酸激酶抑制剂 (TKIs *EGFR*) 进行治疗。其中, 在治疗 *EGFR* 基因突变的晚期非小细胞肺癌患者的过程中, 吉非替尼、埃罗替尼和厄罗替尼等分子靶向治疗药物已取得了良好的效果, 然而, 该类药物的治疗效果在

不同个体间存在很大差异^[5]。现在一些报道认为, TKIs *EGFR* 类药物在不同个体间治疗效果差异的主要原因是由于 *EGFR* 基因外显子 18-21 突变导致的, 其中 *EGFR* 基因外显子 19 缺失突变和 *EGFR* 外显子 21 的 L858R 错义突变约占所有 *EGFR* 基因突变的 90%^[6]。因此, *EGFR* 基因突变检测有助于选择合适的治疗对象, 从而达到提高患者治疗效果、延长患者生存期的目的。但是目前已有的报道中还没有针对满族非小细胞肺癌患者 *EGFR* 基因突变率的研究。本研究检测了 48 例满族和 32 例汉族非小细胞肺癌患者的 *EGFR* 基因突变情况, 首次报道了满族非小细胞肺癌 *EGFR* 基因突变率, 对满族和汉族 *EGFR* 基因突变率进行比较的同时还比较了满族非小细胞肺癌患者中 *EGFR* 基因外显子 19 缺失突变和 *EGFR* 外显子 21 的 L858R 错义突变的差异。因此, 满族患者选择分子靶向药物治疗时, 此研究可能为筛选最合适的方案, 避免不合理用药提供一定的理论依据。

1 资料与方法

1.1 临床资料

随机选择河北医科大学附属秦皇岛市第一医院 2010 年 9 月至 2013 年 9 月 80 例经手术的非小细胞肺癌患者。其中, 女性患者 38 例, 男性患者 42 例; 年龄 ≥ 63 岁 38 例, <63 岁 42 例; 满族 48 例, 汉族 32 例; 鳞癌 18 例, 腺癌 44 例, 大细胞癌 18 例。无吸烟史 38 例, 有吸烟史 42 例。

1.2 实验方法

1.2.1 标本采集和 DNA 提取

手术切除后的肿瘤组织及其癌旁组织 (与病灶距离约 5cm) 迅速冻存于液氮中, 置于 -80°C 低温冰箱中保存。提取采用 TIANamp Genomic DNA Kit 提取组织样本中的 DNA, 具体方法如下:

(1) 组织或细胞的裂解: 取 50mg 的组织于 Ep 管中, 用剪刀尽可能地剪成碎块。加入 200 μl 的缓冲液 GA, 振荡至彻底悬浮, 再加入 20 μl 的 Proteinase K 和 10 μl 的 RNase A (10mg/ml), 于 56°C 水浴温浴至组织完全裂解。向裂解液中加入 200 μl 缓冲液 GB, 充分颠倒混匀, 70°C 放置 10min。(2) 加入 200 μl 无水乙醇, 充分振荡混匀 15s, 此时可能会出现絮状沉淀。(3) 将上一步所得溶液和絮状沉淀都加入一个吸附柱 CB3 中 (吸附柱

通讯作者: 梁华刚, 主任医师, 博士; 秦皇岛市第一医院, 河北省秦皇岛市海港区文化路 258 号 (066000); Email: 13903356153@163.com
收稿日期: 2014-09-25; **修回日期:** 2014-11-20

放入收集管中),12 000rpm 离心 30s, 倒掉废液,将吸附柱CB3 放回收集管中。(4) 将 500μl 的缓冲液 GD 加入至吸附柱 CB3 中,12 000rpm 离心 30s,弃滤液。(5) 将 600μl 的漂洗液 PW 加入至吸附柱 CB3 中,12 000rpm 离心 30s,弃滤液。(6)重复操作步骤 5。(7) 将吸附柱安置于收集管上,12 000rpm 离心 2min。倒掉废液,将吸附柱 CB3 置于室温放置数分钟,以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。(8) 将吸附柱 CB3 安置于新的 1.5ml 离心管上,在吸附膜的中央处加入 50~200μl 的灭菌水或 Elution Buffer, 室温静置 5min。(9)12 000rpm 离心 2min 洗脱 DNA。(10)重复步骤(8)、(9)进行二次洗脱。(11)紫外吸光度测定进行鉴定及定量分析浓度及纯度。调整 DNA 浓度至 25μg/ml。

1.2.2 Real-time PCR 扩增

采用 ARMS(amplification refractory mutation system,ARMS)方法进行 PCR 扩增,使用人类 EGFR 基因 21 种突变检测试剂盒(厦门艾德生物医药科技公司)检测 EGFR 基因外显子 19 和 21 突变。具体步骤参照试剂盒说明书。采用 Real-time PCR 仪(StrataGene MX3000P)扩增目的基因,包括 1 个阳性质控品(PC)。如果 Ct 值为 0 或 Ct 值>30,判为野生型。Real-time PCR 的反应条件为 95℃ 5min,1 cycle;95℃ 25s,64℃ 20s,72℃ 20s,15 cycles;93℃ 25s,60℃ 35s,72℃ 20s,31 cycles。

1.3 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析,采用 χ^2 和 Fisher 精确检验分析突变差异, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

80 例非小细胞肺癌样本中,共检测出 26 例突变,总突变率为 32.5%。38 例女性患者共检测出 18 例 EGFR 突变,42 例男性患者共检测出 8 例 EGFR 突变,女性非小细胞肺癌患者 EGFR 突变率明显高于男性患者($P<0.05$)。满族患者中共检测出 18 例 EGFR 突变,汉族患者中共检测出 8 例 EGFR 突变,满族患者 EGFR 突变率明显高于汉族患者($P<0.05$)。80 例非小细胞肺癌样本中,腺癌、鳞癌、大细胞癌患者中分别有 16 例、5 例、5 例 EGFR 突变,腺癌患者 EGFR 突变率明显高于其他两种非小细胞肺癌患者($P<0.05$)。无吸烟史患者共检测出 18 例 EGFR 突变,有吸烟史患者共检测出 8 例 EGFR 突变,无吸烟史患者 EGFR 突变率明显高于有吸烟史患者($P<0.05$)(Table 1)。

在检测 80 例非小细胞肺癌患者 EGFR 基因突变中,突变点检测包括 EGFR 外显子 19 缺失突变和外显子 21 的 L858R 错义突变(Figure 1,2)。其中满族 EGFR 外显子 19 缺失突变为 5 例,占满族突变总数的 62.5%;满族 EGFR 外显子 21 的 L858R 错义突变为 3 例,占满族突变数的 37.5%。汉族 EGFR 外显子 19 缺失突变为 10 例,占汉族突变总数的 55.6%;汉族 EGFR 外显子 21 的 L858R 错义突变为 8 例,占

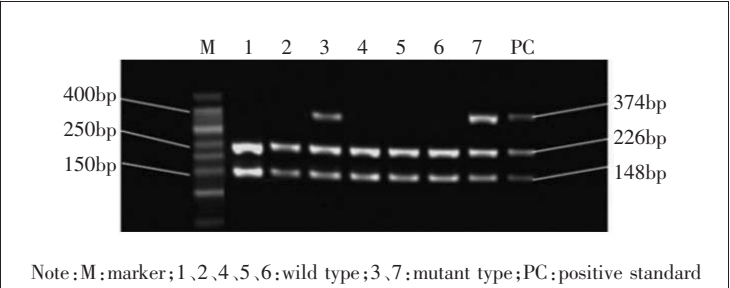


Figure 1 Agarose gel electrophoresis of PCR of EGFR exon-21

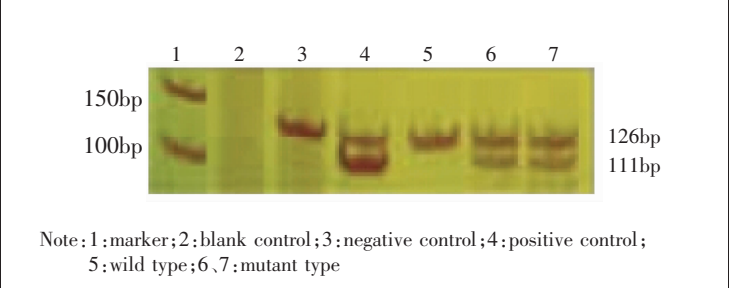


Figure 2 Agarose gel electrophoresis of PCR of EGFR exon-19

Table 1 The relationship between EGFR mutation and clinical factors in NSCLC patients [n(%)]

Variables		EGFR wild type	EGFR mutation type	P
Gender	Female	20(52.6)	18(47.4)	<0.05
	Male	34(80.9)	8(29.1)	
Age(years)	≥63	24(73.2)	14(36.8)	0.53
	<63	30(71.4)	12(28.6)	
Pathological types	AC	28(63.6)	16(36.4)	<0.05
	SCC	13(72.2)	5(27.8)	
	LCC	13(72.2)	5(27.8)	
Clinical stage	I	13(72.2)	5(27.8)	<0.05
	II	13(72.2)	5(27.8)	
	III	28(63.6)	16(36.4)	
Metastastic	Yes	24(73.2)	14(36.8)	0.53
	No	30(71.4)	12(28.6)	
Minority	Han	24(75.0)	8(25.0)	<0.05
	Man	30(62.5)	18(37.5)	
Smoke	No	20(52.6)	18(47.4)	<0.05
	Yes	34(80.9)	8(19.0)	

汉族突变数的 44.4%。满族 EGFR 外显子 19 和外显子 21 (L858R) 的突变率无明显差异($P=0.67$)(Table 2)。

3 讨论

EGFR 基因位于染色体 7q11, 编码 HER 蛋白家族的一种跨膜蛋白:酪氨酸蛋白激酶受体。当它和特异性的配体结合后,结构域中特定的酪氨酸残基便发生自动磷酸化,引发细胞内信号级联反应,产生一系列效应^[7]。在多种肿瘤中,EGFR 细胞信号通路与肿瘤细胞的增殖、转移及血管生成相

Table 2 The analysis of *EGFR* mutation in Exon 19 and Exon 21 between Man and Han patients with NSCLC [n(%)]

<i>EGFR</i> mutation	Han	Man	<i>P</i>
Deletion in exon 19	5(62.5)	10(55.6)	0.75
L858R substitution in exon 21	3(37.5)	8(44.4)	
Total	8(30.8)	18(69.2)	

关^[4]。因此,小分子酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKIs)能够与ATP竞争性地结合其结构域中的结合位点,从而抑制EGFR的磷酸化和下游信号的传导,抑制肿瘤发展。有研究发现,在EGFR基因突变的非小细胞肺癌中,EGFR-TKIs类药物对超过70%的患者具治疗效果,在非EGFR基因突变的非小细胞肺癌患者中,EGFR-TKIs类药物的有效率仅为10%^[8]。其中,导致EGFR-TKIs类药物的疗效在EGFR基因突变的非小细胞肺癌患者存在差异的主要原因是EGFR基因突变类型不同,即主要为EGFR基因外显子19缺失突变和EGFR外显子21的L858R错义突变。有研究证明,较EGFR基因外显子18突变,EGFR外显子19缺失突变与EGFR外显子21的L858R错义突变的NSCLC患者常常对吉非替尼耐药^[9]。综上所述,对于NSCLC患者进行EGFR基因突变检测以及区分其突变类型对于NSCLC患者靶向治疗具有重要意义。

根据之前的报道,在非小细胞肺癌中,较男性而言,女性更容易发生EGFR基因突变;较吸烟患者,不吸烟患者EGFR基因突变更常见;较鳞癌和大细胞癌,腺癌更容易发生EGFR基因的突变^[8,10]。我们对于80例非小细胞肺癌患者EGFR基因的突变检测也发现了相同的结果。共检测80例非小细胞肺癌样本中,女性患者共检测出18例EGFR突变,男性患者共检测出8例EGFR突变,女性非小细胞肺癌患者EGFR突变率明显高于男性患者($P<0.05$);腺癌、鳞癌、大细胞癌患者中分别有16例、5例、5例EGFR突变,腺癌患者EGFR突变率明显高于其他两种非小细胞肺癌患者($P<0.05$);无吸烟史患者共检测出18例EGFR突变,有吸烟史患者共检测出8例EGFR突变,无吸烟史患者EGFR突变率明显高于吸烟史患者($P<0.05$)。值得注意的是,我们发现,满族患者中共检测出18例EGFR突变,汉族患者中共检测出8例EGFR突变,满族患者EGFR突变率明显高于汉族患者($P<0.05$),这也与之前EGFR突变存在明显的民族差异的报道相似^[11]。此外,本次研究也证实了EGFR基因的突变与年龄无关。

EGFR-TKI类药物对不同NSCLC患者的治疗效果的差异主要是由于EGFR外显子的突变状态不同。EGFR外显子19缺失突变和外显子21的L858R错义突变将导致EGFR结合ATP的能力增加,从而加强了EGFR-TKI的疗效^[10]。但是,这两种突变也存在一定的差异。L858R单核苷酸的替换突变靠近保守的Asp-Phe-Gly序列,突变使A-loop的稳定性增加。而外显子19的缺失突变靠近alpha-C-helix,而后者控制着与ATP结合囊的角度,突变使ATP结合囊变窄^[11]。在同时使用EGFR-TKIs类药物(厄洛替尼或吉非替尼)治疗的

NSCLC患者中,较EGFR外显子21的L858R错义突变患者,EGFR基因外显子19缺失突变生存期更长^[11]。我们在检测80例非小细胞肺癌患者EGFR基因突变中,满族EGFR外显子19缺失突变为5例,占满族突变总数的62.5%;满族EGFR外显子21的L858R错义突变为3例,占满族突变数的37.5%。汉族满族EGFR外显子19缺失突变为10例,占汉族突变总数的55.6%;汉族EGFR外显子21的L858R错义突变为8例,占汉族突变数的44.4%。即满族和汉族中EGFR外显子19和外显子21(L858R)的突变率无明显差异。

总之,在当今非小细胞肺癌的临床治疗中,个性化选择性治疗的时代已经来临,分子靶向药物也已经成为非小细胞肺癌治疗的一种有效手段。对于满族非小细胞患者较汉族患者EGFR基因突变率更高的客观情况,我们推测,满族患者对EGFR-TKIs类药物可能更敏感,因此,可以考虑在满族患者中EGFR-TKIs类药物作为推荐药物。本研究首次提供满族非小细胞肺癌EGFR突变率,可以为临床医生提供理论基础,使广大非小细胞肺癌患者受益。

参考文献:

[1] Murer H,Forster I,Biber J. The sodium phosphate co-transporter family SLC34 [J]. Pflugers Arch,2014,447(5): 763-767.

[2] Feild JA,Zhang L,Brun KA,et al. Cloning and functional characterization of a sodium-dependent phosphate transporter expressed in human lung and small intestine [J]. Biochem Biophys Res Commun,2011,258(3):578-582.

[3] Jorissen RN,Walker F,Pouliot N,et al. Epidermal growth factor receptor;mechanisms of activation and signalling[J]. Exp Cell Res,2013,284(1):31-53.

[4] Pao W,Chmielecki J. Rational,biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer [J]. Nat Rev Cancer,2010,10(11):760-774.

[5] Rosell R,Carcerey E,Gervais R,et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EVERTAC):a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial [J]. Lancet Oncol, 2010,13(3):239-246.

[6] Petrelli F,Borgonovo K,Cabiddu M,et al. Efficacy of EGFR tyrosine kinase inhibitors in patients with EGFR-mutated non-small cell lung cancer;a meta-analysis of 13 randomised trials [J]. Clin Lung Cancer,2012,13 (2):107-114.

[7] Uramoto H,Mitsudomi T. Which biomarker predicts benefit from EGFR-TKI treatment for patients with lung cancer [J]. Br Cancer,2007,96(6):857-863.

[8] Jackman DM,Ycep BY,Sequist LV,et al. Exon 19 deletion mutations of epidermal growth treated with gefitinib or erlotinib[J]. Clin Cancer Res,2006,12(13):3908-3914.

[9] Riely GJ,Pan W,Pham D,et al. Clinical study of patients with non-small cell lung cancer and epidermal growth factor receptor exon 19 and exon 21 mutations treated with gefitinib or erlotinib[J]. Clin Cancer Res,2006,12(1):839-844.

[10] Rosell R,Moran T,Queralt C,et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer [J]. N Engl J Med,2012,361(13):958-967.

[11] Kosaka T,Yatabe Y,Endoh H,et al. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer and its biological and clinical implications [J]. Cancer Res,2004, 64(24):8919-8923.