

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.08.006

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.08.006>

非小细胞肺癌患者胸腔积液中EGFR基因突变的检测及临床意义

毛旭华, 汤俊明, 乔国洪, 陈霞

(江苏大学附属宜兴市人民医院检验科, 江苏 无锡 214200)

[摘要] 目的: 探讨采用非小细胞肺癌患者胸腔积液标本肿瘤细胞进行表皮生长因子(epidermal growth factor receptor, EGFR)基因突变检测的可行性及其临床意义。方法: 采用Sanger测序法检测17例非小细胞肺癌患者胸腔积液及对应的17例手术或肺部穿刺组织标本EGFR基因18~21外显子基因突变, 并进行统计分析。结果: 胸腔积液标本17例共检出5例突变, 检出率29.41%。手术或穿刺组织标本17例共检出7例突变, 检出率41.18%。胸腔积液标本EGFR基因突变检出率略低于手术或穿刺组织标本。结论: 采用Sanger测序法进行非小细胞肺癌患者胸腔积液中EGFR基因突变的检测, 方法可行, 尤其适用于无法获取手术或肺部穿刺组织标本的患者。

[关键词] 非小细胞肺癌; 胸腔积液; EGFR基因

Detection of EGFR mutations and its clinical significance in hydrothorax of patients with non-small cell lung cancer

MAO Xuhua, TANG Junming, QIAO Guohong, CHEN Xia

(Department of Clinical Laboratory, Yixing People's Hospital Affiliated to Jiangsu University, Wuxi Jiangsu 214200, China)

Abstract **Objective:** To explore the clinical significance of detecting epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in hydrothorax of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods:** The mutations of EGFR in exon 18–21 were detected with Sanger sequencing in 17 hydrothorax samples and 17 tumor tissue samples in parallel from patients with NSCLC. **Results:** There were 5 cases (29.41%) with EGFR mutations in 17 hydrothorax samples and 7 cases (41.18%) in 17 tumor tissue samples. The detection rate of EGFR mutations in hydrothorax samples was lower than that in tumor tissue samples. **Conclusion:** The hydrothorax sample can be used to detecting EGFR mutations by Sanger sequencing. And it is helpful to patients with NSCLC who can't obtain tumor tissue.

Keywords non-small cell lung cancer; hydrothorax; epidermal growth factor receptor

肺癌是全球导致死亡的主要恶性肿瘤之一。近年来, 肺癌的发病率和病死率明显上升, 其总体5年生存率为10%~15%^[1], 其中非小细胞肺癌

(non-small cell lung cancer, NSCLC)占肺癌的80%左右。临床上大部分NSCLC患者首诊时已处于中晚期^[2], 大都失去手术治疗的机会。在尚无分子靶

收稿日期 (Date of reception): 2017-05-11

通信作者 (Corresponding author): 陈霞, Email: staff1291@yxph.com

基金项目 (Foundation item): 无锡市卫计委面上项目 (MS201536)。This work was supported by Science and Technology Projects of Wuxi City, China (MS201536).

向治疗的时代, 通常采用传统的放化疗为主的治疗手段, 但治疗效果往往并不理想。

近年来, 分子靶向药物表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, EGFR-TKI)由于其特异性高, 不良反应轻等特点, 在临床逐渐推广使用。EGFR突变是NSCLC患者是否对分子靶向治疗酪氨酸激酶抑制剂敏感的强预测因子^[3-4]。因此, EGFR基因突变的检测能为NSCLC患者接受分子靶向治疗提供重要依据。本文针对非小细胞肺癌患者胸腔积液中EGFR基因突变检测进行研究, 并探讨其临床意义。

1 材料与方法

1.1 标本收集

2014年10月至2016年12月, 江苏大学附属宜兴市人民医院收治的经细胞学或病理学检查确诊为非小细胞肺癌的患者胸腔积液及对应的手术或肺部穿刺组织标本各17例。其中男10例, 女7例, 年龄48~74(中位62)岁。本研究已获得本院医学伦

理委员会批准。

1.2 方法

取30 mL胸腔积液, 2 500 r/min离心10 min, 细胞沉淀于-80 °C保存备用。选用Qiagen试剂盒提取细胞沉淀DNA, 并用微量紫外分光光度计进行DNA纯度及浓度检测。引物设计如表1所示。采用Sanger测序法检测EGFR基因18~21外显子突变。

2 结果

胸腔积液标本17例共检出5例突变, 检出率29.41%, 其中19外显子c.2237_2255delinsT, p.(E746_S752delinsV)缺失突变2例, 21外显子c.2573T>G, p.(L858R)突变3例。手术或穿刺组织标本17例共检出7例突变, 检出率41.18%, 其中19外显子缺失突变2例, 20外显子c.2369C>T, p.(T790M)突变1例, 21外显子c.2573T>G, p.(L858R)突变4例。胸腔积液标本EGFR基因突变检出率略低于手术或穿刺组织标本(表2, 图1~3)。

表1 EGFR基因检测引物

Table 1 Primers of detecting EGFR mutations

外显子	引物名称	引物序列(5'→3')
18	EGFR 18 F	AGCATGGTGAGGGCTGAGGTGAC
	EGFR 18 R	ATATACAGCTTGCAAGGACTCTGG
19	EGFR 19 F	CCAGATCACTGGGCAGCATGTGGCACC
	EGFR 19 R	AGCAGGGTCTAGAGCAGAGCAGCTGCC
20	EGFR 20 F	GATCGCAITCATGCGTCTTCACC
	EGFR 20 R	TTGCTATCCCAGGAGCGCAGACC
21	EGFR 21 F	TCAGAGCCTGGCATGAACATGACCCTG
	EGFR 21 R	GGTCCCTGGTGTGTCAGGAAAATGCTGG

表2 Sanger测序法检测EGFR基因突变结果

Table 2 Results of detecting EGFR mutations by Sanger sequencing

类别	胸腔积液标本	手术或穿刺组织标本
18外显子突变	0	0
19外显子突变	2	2
20外显子突变	0	1
21外显子突变	3	4
突变总例数	5	7
突变总检出率/%	29.41	41.18

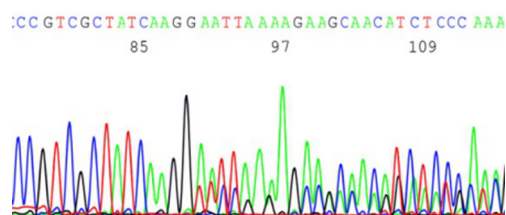


图1 EGFR基因19外显子c.2237_2255delinsT,p.(E746_S752delinsV)缺失突变

Figure 1 EGFR exon 19 c.2237_2255delinsT,p.(E746_S752delinsV)

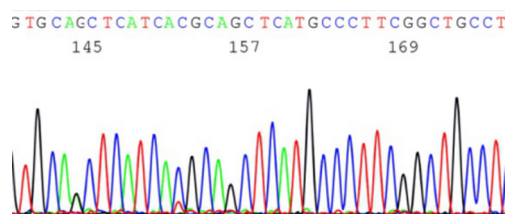


图2 EGFR基因20外显子c.2369C>T,p.(T790M)突变

Figure 2 EGFR exon 20 c.2369C>T,p.(T790M)

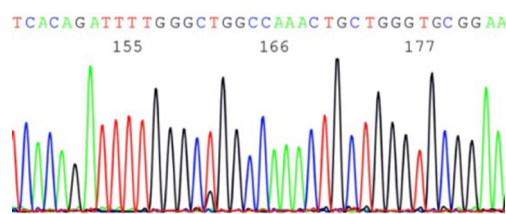


图3 EGFR基因21外显子c.2573T>G,p.(L858R)突变

Figure 3 EGFR exon 21 c.2573T>G,p.(L858R)

3 讨论

研究^[5]表明: EGFR基因是肺癌生长的重要调控基因。EGFR基因突变主要发生在胞内TK区域的18~21外显子上。EGFR基因突变是肿瘤患者是否对TKI敏感的强预测因子^[3-4],因此,EGFR基因突变的检测能为肿瘤尤其是NSCLC患者靶向治疗提供重要依据。EGFR基因19外显子的缺失突变和21外显子c.2573T>G,p.(L858R)突变是对TKI有效的两种最主要的敏感突变,而20外显子c.2369C>T,p.(T790M)突变则是对一代TKI耐药的突变类型,且占获得性耐药机制的一半左右,同时也是对三代TKI敏感的突变类型。

传统上EGFR基因检测的标本通常来自于手术过程中取的组织样本,但这种方式不易重复获取,并且大部分NSCLC患者在确诊时已属于

晚期,无法进行手术治疗,从而无法获取组织样本。EGFR基因检测标本的另一来源是纤维支气管镜检查及经皮肺穿刺等方法获取的组织,这些方式获取的组织标本量一般非常少,且不同程度的混杂了一些外周血细胞和纤维组织,对EGFR基因的检测有一定的限制。因此,寻找适合进行EGFR基因检测的标本类型显得极为重要。有研究^[6-11]表明:胸腔积液和血液中的游离DNA可检出EGFR基因突变。目前临床上对于血液游离DNA进行EGFR基因突变检测还存在技术瓶颈,血液游离DNA含量极低,对提取及检测方法的灵敏度要求极高,不易推广。晚期NSCLC患者常合并有胸腔积液,且胸腔穿刺操作简便易行,病人痛苦小,提取与检测方法较血液游离DNA简单。Sanger测序法为传统的基因检测方法,也被称为“金标准”。

从本研究的结果来看,采用Sanger测序法进行NSCLC患者胸腔积液中EGFR基因突变的检测,方法可行,易于推广。本研究中胸腔积液标本EGFR基因突变检出率略低于手术或穿刺组织标本,可能的原因是胸腔积液中肿瘤细胞含量较低,或者是肿瘤细胞中基因突变的比例太低,低于此检测方法的检测限而无法检出。后续研究可考虑采用检测灵敏度更高的检测方法如高分辨率熔解曲线(High Resolution Melting, HRM)技术、突变扩增阻滞系统(Amplification Refractory Mutation System, ARMS)技术、ddPCR技术等进行研究,提高检出率。

总之,采用Sanger测序法进行非小细胞肺癌患者胸腔积液中EGFR基因突变的检测,方法可行,尤其适用于无法获取手术或肺部穿刺组织标本的患者。

参考文献

1. Ettinger DS, Akerley W, Bepler G, et al. Non-small cell lung cancer[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2010, 8(7): 740-801.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(1): 7-30.
3. 武晓楠. 表皮生长因子受体基因在多种肿瘤中的突变情况及临床意义[J]. 中国全科医学, 2008, 11(7A): 1197-1201. WU Xiaonan. EGFR gene mutations and its clinical significance in tumors[J]. Chinese General Practice, 2008, 11(7A): 1197-1201.
4. Dacic S. Molecular diagnostics of lung carcinomas[J]. Arch Pathol Lab Med, 2011, 135(5): 622-629.
5. Sharma SV, Bell DW, Settleman J, et al. Epidermal growth factor

- receptor mutations in lung cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(3): 169-181.
6. Jing CW, Wang Z, Cao HX, et al. High resolution melting analysis for epidermal growth factor receptor mutations in formalin-fixed paraffin-embedded tissue and plasma free DNA from non-small cell lung cancer patients[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14(11): 6619-6623.
 7. Kimura H, Kasahara K, Kawaishi M, et al. Detection of epidermal growth factor receptor mutations in serum as a predictor of the response to gefitinib in patients with non-small-cell lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(13): 3915-3921.
 8. Huang MJ, Lim KH, Tzen CY, et al. EGFR mutations in malignant pleural effusion of non-small cell lung cancer: a case report[J]. *Lung Cancer*, 2005, 49(3): 413-415.
 9. Guan Y, Wang ZJ, Wang LQ, et al. Comparison of EGFR mutation rates in lung adenocarcinoma tissue and pleural effusion samples[J]. *Genet Mol Res*, 2016, 15(2): gmr7001.
 10. Yeo CD, Kim JW, Kim KH, et al. Detection and comparison of EGFR mutations in matched tumor tissues, cell blocks, pleural effusions, and sera from patients with NSCLC with malignant pleural effusion, by PNA clamping and direct sequencing[J]. *Lung Cancer*, 2013, 81(2): 207-212.
 11. Liu X, Lu Y, Zhu G, et al. The diagnostic accuracy of pleural effusion and plasma samples versus tumour tissue for detection of EGFR mutation in patients with advanced non-small cell lung cancer: comparison of methodologies[J]. *J Clin Pathol*, 2013, 66(12): 1065-1069.

本文引用: 毛旭华, 汤俊明, 乔国洪, 陈霞. 非小细胞肺癌患者胸腔积液中EGFR基因突变的检测及临床意义[J]. 临床与病理杂志, 2017, 37(8): 1583-1586. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.08.006

Cite this article as: MAO Xuhua, TANG Junming, QIAO Guohong, CHEN Xia. Detection of EGFR mutations and its clinical significance in hydrothorax of patients with non-small cell lung cancer[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2017, 37(8): 1583-1586. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.08.006