

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.09.029

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.09.029>

非小细胞肺癌EGFR突变检测技术的研究进展

郭婷, 王磊 综述 李小飞 审校

(第四军医大学唐都医院胸腔外科, 西安 710038)

[摘要] 针对表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)突变基因的检测是肺癌靶向治疗的重要基石。目前临床中主要针对肺癌组织、脱落细胞以及液态活检标本开展检测工作, 此外尿液标本近期也展现出良好的检测效率。针对上述标本, 临床中开展多种检测技术, 如以特定靶点为目的的技术, 包括数字PCR、楔形探针扩增阻滞突变系统等; 以筛查为目的的检测技术, 包括二代测序(next generation sequencing, NGS)、Sanger测序等, 这些技术在特定的标本类型和检测目的中具有独特的优势。一些新兴的技术, 如拉曼光谱, 也在临床检测中展现出良好的应用前景。

[关键词] 肺癌; 表皮生长因子受体突变; 检测

Research progress in the detection technology of EGFR mutations in non-small cell lung cancer

GUO Ting, WANG Lei, LI Xiaofei

(Department of Thoracic Surgery, Tangdu Hospital Affiliated Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

Abstract The detection of epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation gene is an important cornerstone of lung cancer treatment. At present, lung cancer tissue, exfoliative cells and liquid biopsy specimens are used in clinic practice for the detection of EGFR. Even more, the detection of urine specimens also shows potential application prospect. There are many detecting techniques for above specimens, the one of specific targets technology, such as Beaming dPCR, sARMS, and the other one of screening tests technology, such as next generation sequencing (NGS) and Sanger sequencing. The different specific specimen types and the testing purpose for different detecting techniques according to individual advantage. With the development of emerging technology, surface-enhanced Raman scattering shows the great application in clinical practice as the novel detecting technique.

Keywords lung cancer; epidermal growth factor receptor mutation; detection

收稿日期 (Date of reception): 2017-06-01

通信作者 (Corresponding author): 李小飞, Email: lxfchest@fmmu.edu.cn

基金项目 (Foundation item): 第四军医大学唐都医院基础研究创新基金和苗子人才基金。This work was supported by the Basic Research Innovation Fund and Young Talent Fund of Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, China.

肺癌是全球发病率和病死率最高的肿瘤之一, 大多数肺癌患者就诊时病程已进入晚期(IIIB或IV期), 其5年生存率仅为15.6%^[1]。肺癌主要病理学分型包括鳞癌、腺癌、小细胞癌、大细胞癌等。亚裔人群中约45%的腺癌存在表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)突变, 尤其E19del和L858R为最常见突变类型, 约占85%~90%^[2]。2008年IPASS试验正式确立针对EGFR突变基因的靶向治疗策略, 一系列研究证实酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitors, TKIs; 吉非替尼或厄洛替尼)能够显著延长患者的无进展生存期^[1]。但是在EGFR-TKIs治疗过程中, 一些突变耐药基因(如T790M)的出现可能对治疗效果产生重大影响^[3]。因此, 在治疗前准确了解EGFR突变状态, 在治疗中持续监测耐药基因突变情况, 对肺癌的个体化靶向治疗有着重要的意义。现将肺癌EGFR突变基因的检测现状总结如下。

1 肺癌 EGFR 突变基因的检测现状

1.1 肺癌组织学标本

肺癌的组织学标本是最早应用于驱动基因检测的标本类型, 其检测敏感度和特异度也比其他标本类型高, 常作为其他标本对比结果的金标准。目前肺癌组织学标本主要依靠手术切除、支气管镜下活检或者肺穿刺活检等有创方式获得。然而, 实际临床中只有不到30%的患者能够通过手术获得足够的组织标本, 即使前瞻性临床研究中组织标本的有效利用率也仅为30%~40%^[1,4]。约70%的患者主要依靠小块组织或细胞学标本进行基因检测。目前临床利用的肺癌组织标本主要包括新鲜组织和石蜡包埋标本。从现有的检测结果来看, 新鲜标本的检测敏感度和特异度要显著高于石蜡包埋标本^[5], 因此在临床上更推荐开展新鲜标本的检测。同时, 组织学标本的离体时间对目的基因的检出率影响较大, 尤其是石蜡包埋标本, 通常在离体30 min内提取DNA或使用4%多聚甲醛进行固定, >30 min后, 很多标志物或DNA会出现不同程度溶解、断裂等, 从而影响检出率^[6]。另外, 肿瘤异质性也是必须要充分考虑的因素, 第四军医大学唐都医院胸腔外科截至2017年6月前, 共开展肺癌组织学标本EGFR突变检测4 517例, 其中存在大批混合型肿瘤, 常见的如腺鳞癌、腺癌大细胞混合癌等^[7]。大块手术切除标本容易准确诊断上述病理和基因类型, 但是小块组织学标本常常难以准确诊断, 因此在有条件的情况下,

尽量在手术后进行大块标本组织学标本的基因检测, 减少肿瘤异质性造成的影响, 从而更加准确地获悉肺癌基因突变情况, 为后续的治疗奠定基础。在一些开展肺癌组织基因检测的研究中, 甚至要求标本诊断的光镜视野下至少包括50%的肿瘤细胞^[8]。

1.2 细胞学标本

由于肺癌的高度隐匿性, 约10%~50%的患者确诊肺癌需要依赖恶性胸腔积液或支气管镜下灌洗液^[4]。Ellison等^[5]总结近33项开展肺癌细胞学EGFR突变检测研究, 标本类型包括细针抽吸标本、胸腔积液或心包积液脱落细胞等, 检测技术包括基于PCR和测序的多种方法, 总体检测敏感度20%~70%。Billah等^[9]收集209例肺癌患者的细胞学样本, 样本类型包括超声引导下经气管镜细针抽吸、胸水或心包积液以及肺泡、气管灌洗液, 总体而言6.2%的标本量不足, 其中灌洗液的标本不足率明显高于其他的取材方式。影响胸腔积液标本检出率的因素较多, 包括标本类型、离体时间、标本量、检测技术等。而且在实际的临床操作中, 获得足够量的胸腔积液常常与肿瘤的位置、胸腔粘连情况以及穿刺医生的操作水准等相关。针对恶性胸腔积液, 目前尚未建立统一的样品用量标准。

1.3 液态活检标本

肿瘤患者的外周血中含有循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)及游离的循环肿瘤DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)、RNA、蛋白、外泌体等, 在一定程度上能够反映肿瘤生物学特征, 同时取材方便、易获得, 因而成为具有前景的肿瘤组织替代品, 被称为“液态活检”标本^[10]。其中外周血ctDNA主要来源于肿瘤细胞, 包括原发肿瘤细胞、血液中的游离肿瘤细胞坏死溶解及癌细胞增殖活跃时自身合成释放的DNA^[10]。

Maheswaran等^[11]2008年首先使用探针扩增阻滞突变系统(ARMS法)检测CTCs的EGFR突变状态, 其检出率(92%)明显高于ctDNA(33%)。Marchetti等^[12]近期结合Cell Search系统和二代测序(next generation sequencing, NGS)技术检测CTC的EGFR突变, 与肿瘤组织检测结果相比, 该方法相对敏感度达84%。近期*Proceedings of the National Academy of Sciences*中研究^[13]报道肺癌患者行外周血CTCs单细胞全基因组学研究, 结果显示CTCs全基因组序列测定具有良好的可重复性, 不同患

者CTCs内DNA拷贝变异值仅与肺癌的病理类型相关, 与其他影响因素无关, 提示CTC中的完整DNA比ctDNA具有更加全面的遗传学信息。但是较低的捕获率和较大的肿瘤异质性一直是CTCs面临的技术难题。一方面, 目前常用的Cell Search捕获法基于癌细胞上皮细胞黏附因子(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)的表达, 但CTCs在外周血中可能发生上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT), 从而导致一部分癌细胞漏检。另外, 在样品处理和分离过程中也存在一部分CTCs的破坏和丢失。另一方面, 由于CTCs在循环血流中存在时间约24 h, 并不是每个时间段或时间点都可以有效采集CTCs, 因而标定采集时间是高效收集面临的一个问题。另外, 由于肿瘤存在较大的异质性, 有限个数的CTCs能否代表整个肿瘤的遗传学特征是其面临的主要争议点。因此, 目前临床中针对外周血CTCs进行EGFR突变检测的研究还比较少, 尚缺乏大量的临床数据支持。

相对CTCs, ctDNA的匀质性更好, 受肿瘤异质性影响较小。同时获取操作简单、无创, 且价格低, 因而更受到临床医生青睐。近期一项荟萃分析^[14]总结迄今27项研究中3 110例肺癌患者外周血EGFR突变的检测数据, 检测方法包括直接测序法, PNA-PCR, qPCR, 高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)、探针扩增阻滞突变系统(amplification refractory mutation system, ARMS)、ME-PCR等, 结果显示外周血ctDNA的检测敏感度和特异度分别为62.0%(51.3%~71.6%)和95.9%(92.9%~97.7%)。同时, ctDNA还是良好的随访样品, 方便实时监测耐药基因表达等情况。但ctDNA也存在自身的缺点。由于外周血中ctDNA含量很低, 且存在大量的正常细胞游离DNA, 极易造成污染和稀释, 因此血浆比血清更适合用于ctDNA的检测。检测敏感度低是ctDNA目前面临的主要问题。另外, 由于ctDNA大多是一些片段DNA分子, 其所能提供的遗传学信息有限。

1.4 其他体液标本

除上述常见的检测标本外, 现在一些研究^[15-16]试图利用尿液等标本进行肺癌EGFR突变检测。相比其他标本, 尿液标本能最大程度地实现无创化。由于小片段的外周血ctDNA能够通过肾小球滤过膜进入尿液, 因此理论上尿液中也含有ctDNA。Reckamp等^[17]近期首次使用NGS技术检

测60例肺癌患者血浆和尿液标本中的EGFR突变基因, 尿液标本的检测敏感度达到70%, 血浆标本的检测敏感度则达到约90%。Chen等^[18]近期也利用微滴式数字PCR(droplet digital polymerase chain reaction, ddPCR)开展尿液标本的EGFR突变检测工作, 在150例患者的组织学和尿液标本检测中, EGFR突变检测的一致率达到88%。这些研究结果显示尿液标本非常好的应用前景, 有必要对尿液标本开展深入研究。但是由于尿液标本中的DNA片段多为碎片状DNA, 其检测的灵敏度和特异度还需要更多研究进行验证。

2 常用技术研究现状及对比

目前临床上有多种EGFR突变基因的检测技术, 主要包括: 1)以特定靶点为目的的检测技术, 如ddPCR, 数字PCR流式技术(Beaming dPCR), 楔形探针扩增阻滞突变系统(scorpions ARMS, sARMS)及RT-qPCR等; 2)以筛查为目的的检测技术, 如NGS, Sanger测序等; 3)其他种类, 如免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)、变性高效液相色谱法(DHPLC)等。以PCR为基础的靶点检测技术能够达到比较高的检测灵敏度, 在临床中的应用更加广泛; 以测序为基础的技术在检测多种突变类型和发现未知突变方面优势明显, 但是其检测灵敏度较低。sARMS法目前临床中应用最广的检测技术, 尤其在组织学标本的检测中敏感度和特异度均达到比较理想的水准。ddPCR和NGS是目前新兴的检测技术, 尤其ddPCR达到单拷贝检测的水准, 非常适用于血液、尿液标本的检测; NGS更适用于多种突变的检测。随着技术水准的不断提高, 上述的很多方法已经不常用, 现将最常用的检测技术总结如下。

2.1 sARMS 法

ARMS名为探针扩增阻滞突变系统, 又名等位基因特异PCR, 其检测原理为: 由于Taq DNA聚合酶缺少3'-5'外切酶活性, PCR引物的3'末端位碱基必须与其模板DNA互补才能实现扩增, 因而便可以针对不同的已知突变设计不同的引物, 从而检测出突变基因。该方法在引物的3'端加入1个错配碱基, 使之仅能与目的基因互补, 从而实现特定靶基因的扩增。随后对扩增产物进行凝胶电泳或者RT-PCR测定分析。目前临床中应用RT-PCR更多一些, 其检测灵敏度和特异度更高, 信号可重复性好, 自动化程度更高, 避免凝胶电泳中的有毒

操作。

在ARMS检测的基础上, Thelwell等^[19]进一步改进了检测技术, 加入1个Scorpion探针。Scorpion探针是在分子信标探针的基础上进行改进, 由1条茎环状探针、1个荧光基团和淬灭基团以及1条突变特异性引物构成。茎环内的序列能够与模板链中的一段序列互补配对, 发生核酸杂交反应。在Scorpion探针的5'端和3'端分别链接1个荧光分子和淬灭基团, 由于荧光能量共振转移的原理, 此时的探针处于荧光淬灭状态。当3'端的突变引物与模板DNA发生退火和延伸过程后, 茎环内的序列再与模板DNA发生核酸杂交, 从而使荧光基团远离淬灭基团, 产生荧光信号。由于引入Scorpion探针, 所以该方法命名为sARMS。该方法目前已成为临床中应用最为广泛的EGFR突变基因检测技术。

Liu等^[4]在肺癌组织、胸腔积液及血浆标本中比较ARMS, Sanger测序和IHC等3种检测技术, 结果显示ARMS法的检测灵敏度显著高于其他两种检测方法。Kimura等^[20]用sARMS和测序技术检测血清EGFR突变基因, 显示sARMS法检出率显著高于测序法(48% vs 38%)。而后, Kimura等^[21]进一步完成42例肿瘤组织和血清配对的标本检测, sARMS法检测血清样本EGFR突变率为16.7%, 一致率92.9%。IPASS研究^[22]中使用sARMS法检测血清ctDNA的检出率达到23.7%, 一致率43%。唐都医院胸腔外科^[23]前期使用sARMS法检测198例组织和血浆配对样本的EGFR突变情况, 检测敏感度达到17.2%。相比其他的检测技术, sARMS法检测敏感度高, 可检测至少1%的突变DNA, 在已知突变的检测中具有很大的优势, 因此是目前临床中应用最广的检测技术。

2.2 ddPCR法

ddPCR是近些年发展起来的一种高敏的核酸定量检测方法, 最低可确定单拷贝待检靶分子的绝对数目, 通常包括PCR扩增和荧光信号分析两部分, DNA模板被稀释后进行PCR扩增, 而后通过分子信标直接测得样品中等位基因的数目和比值。Diehl等^[24]发展Beaming dPCR技术, 进一步提高了系统的检测灵敏度。该技术通过将引物连接在磁珠表面, 再将磁珠与目标分子包裹在微乳液滴中进行PCR扩增, 之后使用流式细胞技术进行荧光计数。

Yung等^[25]使用ddPCR检测肺癌血液ctDNA的EGFR突变情况, 敏感度和特异度分别达到92%

和100%。Thress等^[26]近期对比研究了几种检测方法(ddPCR, BEAMing dPCR和ARMS)在肺癌ctDNA的EGFR突变检测中的敏感性和特异性, 结果显示ddPCR和Beaming dPCR具有更高的敏感度, 但是特异性(83%和67%)却明显低于ARMS等方法(100%)。尤其对于敏感和耐药基因相对明确的肺癌而言, 通过更加灵敏的方法实现基因突变的动态定量检测对临床治疗更有意义。例如, 最近Oxnard等^[27]使用ddPCR动态定量监测血液ctDNA的EGFR敏感和耐药基因, 检测敏感度达到了80%~90%, 特异度100%, 同时发现敏感基因含量与肿瘤负荷及药物疗效相关, 耐药基因的出现可能早于影像学改变。

ddPCR和Beaming dPCR在液态活检标本检测中具有明显的优势, 很好地解决了组织样本不足和肿瘤异质性的问题, 并且能够动态检测肺癌驱动基因。其在针对已知突变类型的检测中逐渐超越sARMS技术的普及程度。但是目前上述ddPCR对操作平台要求较高, 尚未能在国内普遍推广, 且其检测费用高昂, 是限制其临床应用的重要因素。因此在目前的临床治疗中, ddPCR更多用于液态活检标本的检测。

2.3 NGS法

高通量的NGS技术给生命科学领域带来巨大的变化, 能够对肺癌驱动基因进行全基因组范围内的基因突变分析, 包括基因突变、重排及拷贝数变异, 并可以发现未知的突变类型^[28]。NGS技术的基本流程为将待测基因打断成300 bp的DNA片段, 而后通过核酸杂交与接头引物序列发生链接, PCR扩增后再对其进行测序, 从而实现高通量检测。目前有多种NGS平台, 主要包括Roche/454, Illumina和ABI/Solid三家公司开发的测序系统, 不同的平台会采用桥式PCR或乳液PCR进行后续测序工作。罗氏公司2005年首先发布第一款焦磷酸测序方法, 随后Illumina和Solid公司也先后推出自己的NGS平台^[29-31]。NGS平台能够对多种基因标本, 如DNA, RNA, mRNA, 转录子, 染色体以及甲基化的DNA等进行检测, 检测范围包括点突变、单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP), 蓝藻抗病毒蛋白N(Cyanovirin-N, CVN)及融合基因等, 且只需0.1~0.3 μg即能完成工作。NGS最大的优势在覆盖度广, 当测序深度达到100层时, 平均每个碱基就可以被检测100次以上, 从而可以达到0.2%~1%的

低频基因检测^[32-33]。因此在肿瘤的基因检测中, NGS技术正在发挥越来越大的作用。

Couraud等^[28]使用NGS法检测107例血浆标本的基因突变情况, 目的基因包括EGFR, HER2, KRAS, BRAF和PIK3CA等, 相比组织学标本, 检测敏感度达到了58%, 特异度87%。Malapelle等^[34]最近利用NGS法检测79例肺癌患者的血浆基因突变情况, 与组织学标本相比, 其检测敏感度达到了79%, 特异度100%。Pécuchet等^[35]近期使用NGS技术定量检测肺癌患者的外周血ctDNA, 并且发现ctDNA含量与预后情况显著相关, 动态监测ctDNA的含量能够有效反映疾病的进展情况。类似的研究^[36]近期大量出现, 利用NGS技术检测液态活检标本的EGFR突变情况, 检测敏感度在70%~80%。

近年来NGS技术被用来筛查肿瘤的突变基因, 但该技术仍然存在一些亟待解决的问题。首先, 对高通量目的基因的解读以及数据分析是目前较为突出的问题。对于大多数临床医生而言, NGS给出的大量基因信息犹如一本“天书”, 如何解释这些基因发生的改变并给出详尽的诊疗策略是目前需要解决的关键问题。同时, 对于肺癌而言, 目前存在的靶向基因相对有限, 能够在临床使用的靶向药物种类也很有限。虽然已知大量的基因改变情况, 但临床上却面临无药可用的窘境。尤其一些低频基因, 其临床意义很难界定。同时, 相比ddPCR, sARMS等检测技术, 检测敏感性低和费用高昂也是制约NGS技术临床应用的重要因素。

2.4 其他检测技术 (Sanger 测序法, IHC, HPLC 和 SERS)

Sanger测序和直接测序技术是早期的EGFR突变基因检测手段, 但目前仍被视为DNA序列分析的金标准。但是该方法检测敏感度较低, 只有突变量>20%才能被检测到。因而, 该方法主要用于肺癌组织标本的基因检测, 对于小块组织标本、细胞学标本以及液态活检标本的检出率较低。

2009年, Cell Signaling Technologies公司开发出针对E746-A750del和L858R两种突变的单克隆抗体, 这为IHC法和FISH法检测EGFR突变提供了基础。Yu等^[37]首次使用IHC法检测了肺癌组织标本的EGFR突变, 与直接测序法相比, 检测敏感度92%, 特异度99%。Kato等^[38]随后重复该组实验, 其检测敏感度达到75%~81.8%, 特异度

96.6%~100%。唐都医院胸腔外科课题组^[39]也应用IHC法检测胸腔积液脱落细胞的EGFR突变状态, 以sARMS检测为标准, IHC法检测组织学标本的敏感度89.5%~93.3%, 特异度100%, 检测胸腔积液脱落细胞的敏感度66.7%~83.3%, 特异度100%。IHC法检测能够获得很好的检测特异度, 但是其检测敏感度较低, 同时受到抗体种类的限制, 能够检测的突变类型也比较有限。

HPLC技术也是早期用于EGFR突变检测的技术, 其检测方法简单、快速、敏感性较高。该技术最小可以检测到1%~6.25%突变量的DNA, 比直接测序法便宜、快捷^[40]。但是HPLC只能检测出是否存在突变, 而无法区分突变类型。因而, 在众多检测技术快速发展的今天, HPLC检测技术已经很少在临床中应用。

唐都医院胸腔外科课题组^[41]首次在国际上使用表面增强拉曼光谱检测肺癌组织和胸腔积液的EGFR突变情况。我们首先使用拉曼光谱阐明肺癌发生L858R和E19del突变前后的生物大分子变化特点, 研究发现野生型肺腺癌组织中细胞色素C的拉曼峰位显著强于突变组织, L858R突变的肺腺癌组织中亮氨酸特异的光谱峰位明显减弱, 精氨酸特异的光谱峰位明显增强, E19del突变的肺癌组织平均光谱强度下降, 上述变化均与腺癌特殊的突变状态相关。另外, 我们再次构建PCA/SVM的EGFR基因突变状态诊断系统, 对30例肺癌患者组织学标本进行检测, 该系统诊断EGFR突变状态的准确率达到87.8%, 与传统的IHC和PCR方式比较, 该法具有高效、快速、廉价诊断的优点^[41]。随后, 我们利用金纳米颗粒、EGFR突变特异性抗体构建金纳米探针, 该探针检测35例肺癌患者胸腔积液脱落细胞的EGFR突变状态, 检测敏感度88.3%, 特异度94.6%^[8]。

3 结语

不论组织学标本、细胞学检测标本还是液态活检标本是目前临床常用的检测标本。而尿液、痰液则被认为是目前非常有前景的检测方式, 但是大多数还仅限于研究层面, 其检出率和检测结果波动较大, 有待进一步提高检测技术。近些年sARMS, ddPCR及NGS技术在临床中的应用不断增加, 针对不同类型标本的检测技术也朝着高通量、高灵敏度、快速、廉价等方向发展。随着拉

曼光谱等新的临床检测技术不断发展, 肺癌的治疗向个性化、精准化发展, 从而最大程度提高患者的治疗效果和生存期。

参考文献

1. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(10): 947-957.
2. Buttitta F, Felicioni L, Del Grammastro M, et al. Effective assessment of egfr mutation status in bronchoalveolar lavage and pleural fluids by next-generation sequencing[J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(3): 691-698.
3. Mok TS, Wu YL, Ahn MJ, et al. Osimertinib or platinum-pemetrexed in EGFR T790M-positive lung cancer[J]. *N Engl J Med*, 2017, 376(7): 629-640.
4. 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.
5. Ellison G, Zhu G, Moulis A, et al. EGFR mutation testing in lung cancer: a review of available methods and their use for analysis of tumour tissue and cytology samples[J]. *J Clin Pathol*, 2013, 66(2): 79-89.
6. Albarello L, Pecciarini L, Dogliani C. HER2 testing in gastric cancer[J]. *Adv Anat Pathol*, 2011, 18(1): 53-59.
7. Lai Y, Zhang Z, Li J, et al. EGFR mutations in surgically resected fresh specimens from 697 consecutive Chinese patients with non-small cell lung cancer and their relationships with clinical features[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(12): 24549-24559.
8. Wang L, Zhang Z, Huang L, et al. Evaluation of Raman spectroscopy for diagnosing EGFR mutation status in lung adenocarcinoma[J]. *Analyst*, 2014, 139(2): 455-463.
9. Billah S, Stewart J, Staerckel G, et al. EGFR and KRAS mutations in lung carcinoma: molecular testing by using cytology specimens[J]. *Cancer Cytopathol*, 2011, 119(2): 111-117.
10. Qiu M, Wang J, Xu Y, et al. Circulating tumor DNA is effective for the detection of EGFR mutation in non-small cell lung cancer: a meta-analysis[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2015, 24(1): 206-212.
11. Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells[J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(4): 366-377.
12. Marchetti A, Del Grammastro M, Felicioni L, et al. Assessment of EGFR mutations in circulating tumor cell preparations from NSCLC patients by next generation sequencing: toward a real-time liquid biopsy for treatment[J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e103883.
13. Ni X, Zhuo M, Su Z, et al. Reproducible copy number variation patterns among single circulating tumor cells of lung cancer patients[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(52): 21083-21088.
14. Luo J, Shen L, Zheng D. Diagnostic value of circulating free DNA for the detection of EGFR mutation status in NSCLC: a systematic review and meta-analysis[J]. *Sci Rep*, 2014, 4(4): 6269.
15. Su YH, Wang M, Aiamkitsumrit B, et al. Detection of a K-ras mutation in urine of patients with colorectal cancer[J]. *Cancer Biomark*, 2005, 1(2-3): 177-182.
16. Su YH, Wang M, Brenner DE, et al. Human urine contains small, 150 to 250 nucleotide-sized, soluble DNA derived from the circulation and may be useful in the detection of colorectal cancer[J]. *J Mol Diagn*, 2004, 6(2): 101-107.
17. Reckamp KL, Melnikova VO, Karlovich C, et al. A highly sensitive and quantitative test platform for detection of NSCLC EGFR mutations in urine and plasma[J]. *J Thorac Oncol*, 2016, 11(10): 1690-1700.
18. Chen S, Zhao J, Cui L, et al. Urinary circulating DNA detection for dynamic tracking of EGFR mutations for NSCLC patients treated with EGFR-TKIs[J]. *Clin Transl Oncol*, 2017, 19(3): 332-340.
19. Thelwell N, Millington S, Solinas A, et al. Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection[J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(19): 3752-3761.
20. Kimura H, Kasahara K, Kawaiishi 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.
21. Kimura H, Suminoe M, Kasahara K, et al. Evaluation of epidermal growth factor receptor mutation status in serum DNA as a predictor of response to gefitinib (IRESSA)[J]. *Br J Cancer*, 2007, 97(6): 778-784.
22. Goto K, Ichinose Y, Ohe Y, et al. Epidermal growth factor receptor mutation status in circulating free DNA in serum: from IPASS, a phase III study of gefitinib or carboplatin/paclitaxel in non-small cell lung cancer[J]. *J Thorac Oncol*, 2012, 7(1): 115-121.
23. Guo K, Zhang Z, Han L, et al. Detection of epidermal growth factor receptor mutation in plasma as a biomarker in Chinese patients with early-stage non-small cell lung cancer[J]. *Onco Targets Ther*, 2015, 8: 3289-3296.
24. Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(45): 16368-16373.
25. Yung TK, Chan KC, Mok TS, et al. Single-molecule detection of epidermal growth factor receptor mutations in plasma by microfluidic digital PCR in non-small cell lung cancer patients[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(6): 2076-2084.

26. Thress KS, Brant R, Carr TH, et al. EGFR mutation detection in ctDNA from NSCLC patient plasma: A cross-platform comparison of leading technologies to support the clinical development of AZD9291[J]. *Lung Cancer*, 2015, 90(3): 509-515.
27. Oxnard GR, Paweletz CP, Kuang Y, et al. Noninvasive detection of response and resistance in EGFR-mutant lung cancer using quantitative next-generation genotyping of cell-free plasma DNA[J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(6): 1698-1705.
28. Couraud S, Vaca-Paniagua F, Villar S, et al. Noninvasive diagnosis of actionable mutations by deep sequencing of circulating free DNA in lung cancer from never-smokers: a proof-of-concept study from BioCAST/IFCT-1002[J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(17): 4613-4624.
29. Margulies M, Egholm M, Altman WE, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors[J]. *Nature*, 2005, 437(7057): 376-380.
30. Scally A, Dutheil JY, Hillier LW, et al. Insights into hominid evolution from the gorilla genome sequence[J]. *Nature*, 2012, 483(7388): 169-175.
31. Valouev A, Ichikawa J, Tonthat T, et al. A high-resolution, nucleosome position map of *C. elegans* reveals a lack of universal sequence-dictated positioning[J]. *Genome Res*, 2008, 18(7): 1051-1063.
32. Roychowdhury S, Iyer MK, Robinson DR, et al. Personalized oncology through integrative high-throughput sequencing: a pilot study[J]. *Sci Transl Med*, 2011, 3(111): 111ra121.
33. van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, et al. Ten years of next-generation sequencing technology[J]. *Trends Genet*, 2014, 30(9): 418-426.
34. Malapelle U, Mayo de-Las-Casas C, Rocco D, et al. Development of a gene panel for next-generation sequencing of clinically relevant mutations in cell-free DNA from cancer patients[J]. *Br J Cancer*, 2017, 116(6): 802-810.
35. Pécuchet N, Zonta E, Didelot A, et al. Base-position error rate analysis of next-generation sequencing applied to circulating tumor DNA in non-small cell lung cancer: a prospective study[J]. *PLoS Med*, 2016, 13(12): e1002199.
36. Thompson JC, Yee SS, Troxel AB, et al. Detection of therapeutically targetable driver and resistance mutations in lung cancer patients by next-generation sequencing of cell-free circulating tumor DNA[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(23): 5772-5782.
37. Yu J, Kane S, Wu J, et al. Mutation-specific antibodies for the detection of EGFR mutations in non-small-cell lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(9): 3023-3028.
38. Kato Y, Peled N, Wynes MW, et al. Novel epidermal growth factor receptor mutation-specific antibodies for non-small cell lung cancer: immunohistochemistry as a possible screening method for epidermal growth factor receptor mutations[J]. *J Thorac Oncol*, 2010, 5(10): 1551-1558.
39. 郭海华, 郭婷, 黄立军, 等. 免疫组化法检测恶性胸腔积液脱落细胞EGFR突变状态[J]. *临床与病理杂志*, 2015, 35(7): 1313-1317. GUO Haihua, GUO Ting, HUANG Lijun, et al. Detecting the EGFR mutation status of malignant pleural effusion by immunohistochemistry[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2015, 35(7): 1313-1317.
40. Chin TM, Anuar D, Soo R, et al. Detection of epidermal growth factor receptor variations by partially denaturing HPLC[J]. *Clin Chem*, 2007, 53(1): 62-70.
41. Wang L, Guo T, Lu Q, et al. Sea-Urchin-Like Au Nanocluster with Surface-Enhanced Raman Scattering in Detecting Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Mutation Status of Malignant Pleural Effusion[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7(1): 359-369.

本文引用: 郭婷, 王磊, 李小飞. 非小细胞肺癌EGFR突变检测技术的研究进展[J]. *临床与病理杂志*, 2017, 37(9): 1936-1942. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.09.029

Cite this article as: GUO Ting, WANG Lei, LI Xiaofei. Research progress in the detection technology of EGFR mutations in non-small cell lung cancer[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2017, 37(9): 1936-1942. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.09.029