

· 论 著 ·

非小细胞肺癌患者表皮生长因子受体基因突变及其抑制剂治疗的意义

曹文荣¹, 王雪利¹, 闫文修¹, 马德东²

1. 青岛市第八人民医院病理科, 山东 青岛 266100; 2. 山东大学齐鲁医院呼吸内科, 山东 济南 250012

摘要: **目的** 探讨非小细胞肺癌(NSCLC)表皮生长因子受体(EGFR)基因突变的临床意义,及EGFR抑制剂治疗的意义。**方法** 回顾性分析274例NSCLC患者的临床资料。提取肺癌组织DNA,通过PCR扩增及基因克隆进行基因检测,将测得序列与基因库中EFGR序列(NM005228.3)进行比较,分析EGFR基因突变类型及分布,并对EGFR抑制剂—小分子酪氨酸激酶抑制剂(TKI)治疗效果进行观察。**结果** 274例非小细胞肺癌患者的癌组织中共检出EGFR基因突变52例,基因突变率为18.98%,EGFR基因突变与性别及癌症分期相关,突变主要发生在女性、晚期患者。NSCLC患者EGFR基因突变主要发生于外显子18、19、20、21位点,其中发生EGFR-21 L858R替代突变占23.08%,EGFR-19缺失突变占21.15%。21例接受吉非替尼(TKI)治疗8例得到病情控制的患者中7例出现EGFR基因突变,余13例患者未发生EGFR基因突变。**结论** EGFR基因突变对于NSCLC患者具有重要临床意义,NSCLC患者的EGFR基因检测对指导临床治疗有重要价值。

关键词: 非小细胞肺癌; 表皮生长因子受体; 表皮生长因子受体抑制剂; 酪氨酸激酶抑制剂; 基因突变

中图分类号: R 734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2016)09-1153-04

EGFR gene mutations and EGFR inhibitor treatment in NSCLC patients

CAO Wen-rong*, WANG Xue-li, YAN Wen-xiu, MA De-dong

* Department of Pathology, Qingdao Eighth People's Hospital, Qingdao, Shandong 266100, China

Abstract: **Objective** To investigate the clinical significance of gene mutations of epidermal growth factor receptor (EGFR) and the efficacy of tyrosine kinase inhibitor (TKI), a EGFR inhibitor, in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** A retrospective analysis was performed on the clinical data of 274 patients with NSCLC. After extracting the DNA of lung cancer tissue, the gene sequencing was made by polymerase chain reaction (PCR) amplification and gene cloning, and the measured sequence was compared the EGFR sequence of gene bank (NM005228.3) to analyze the gene mutation types and its distribution. The effect of TKI therapy and its association with EGFR gene mutations were observed and analyzed. **Results** EGFR gene mutations mainly occurred in women and advanced NSCLC patients ($P < 0.05$, $P < 0.01$), namely, the mutations were associated with patients' sex and NSCLC clinical stages. Out of 274 cancer tissue samples, gene mutations were detected in 52 sample (gene mutation rate was 18.98%). Gene mutations mainly occurred in loci 18, 19, 20 and 21 of exon, in which EGFR-21 L858R gene mutation accounted for 23.08%; EGFR-19 deletion mutation accounted for 21.15%. Twenty-one patients received gefitinib (a kind of TKIs) therapy, and the disease was effectively controlled in 8 patients in whom the gene mutations were found in 7 cases (87.5%), and the gene mutations were not found in the remaining 13 patients. **Conclusion** EGFR gene mutations have an important clinical significance for NSCLC patients. EGFR gene mutations were associated with therapeutic effect of TKI, and it might become a target for treatment of NSCLC.

Key words: Non-small cell lung cancer; Epidermal growth factor receptor; Epidermal growth factor receptor inhibitor; Tyrosine kinase inhibitor; Gene mutation

非小细胞肺癌(NSCLC)约占肺癌发病的80%^[1-2]。NSCLC的相关分子标记物的研究越来越广泛,尤其是表皮生长因子受体(EGFR)基因突变被

报道为NSCLC靶向治疗的一个必要条件,EGFR酪氨酸激酶编码区基因突变已经被作为NSCLC一个预测及预后指标。EGFR抑制剂主要为小分子酪氨酸激酶抑制剂(TKI)及单克隆抗体。EGFR的两个主要突变是在外显子19处的缺失突变及外显子21处的L858R替代突变,发生两个外显子突变的患者85%

都对 EGFR 抑制剂-TKI (EGFR-TKI) 敏感。除此之外, EGFR 基因突变也与性别、吸烟、种群等相关^[3-5]。EGFR 的基因突变在外显子 18~21 中均被发现, 但其他外显子处突变报道较少, 与 EGFR-TKI 关系也不明确^[6-9]。本文对 NSCLC 患者 EGFR 基因的单一及联合突变进行研究, 并探讨其在 EGFR-TKI 治疗中的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取青岛市第八人民医院 2010 年 1 月至 2014 年 12 月期间 NSCLC 手术切除标本及穿刺活检标本 274 例, 男 156 例, 女 118 例; 年龄 32~85 (60.15 ± 7.73) 岁。根据 WHO 肺癌组织分类标准: 鳞癌 152 例、腺癌 103 例、大细胞癌 19 例; 根据 ICC 肺癌 TNM 分期标准: I 期 64 例、II 期 57 例、III 期 121 例、IV 期 32 例; 有淋巴结及远处转移者 124 例、无转移者 150 例。所有标本均经病理学检查确诊, 且未接受过放疗及 EGFR-TKI 等治疗。对所有肺癌组织行 10% 甲醛固定, 制作石蜡包块。本研究经医院医学伦理委员会讨论通过, 所有患者及家属知情。

1.2 方法 肺癌组织 DNA 提取参照北京康为世纪生物科技公司基因组 DNA 提取试剂盒提取, 通过琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量, 并使用 Germany Beckman 公司 DU7500 分光光度计检测 DNA 纯度。参照 Genbank 提供的人 EGFR 基因序列 (AY588246) 使用 iPLEX GOLD (Sequenom MassARRAY®) 对目的基因进行分析、设定引物。见表 1。

表 1 EGFR 基因序列引物设计

SNP	引物	序列	退火温度
EGFR-18	上游	CAAATGAGCTGGCAAGTCCCGTGTG	58 °C
	下游	GAGTTTCCCAAACACTCACTGAAAC	58 °C
EGFR-19	上游	GCAATATCAGCCTTAGGTGCGGCTC	58 °C
	下游	CATAGAAAGTGAACATTTAGGATGTG	58 °C
EGFR-20	上游	CCATGAGTACGTATTTTGAAACTC	58 °C
	下游	CATATCCCCATGGCAAACCTTTC	58 °C
EGFR-21	上游	CTAACGTTCCGACGCATAAGTCC	58 °C
	下游	GCTGCGAGCTACCCAGAATGTCTGG	58 °C

使用 Applied Biosystems 生产的 7900HT 全自动同步定量 PCR 扩增仪进行 PCR 扩增, 反应体系 5 μl: MgCl₂ 0.5 μl; 底物混合物 0.1 μl, 2 mM; 引物混合物 1.0 μl, 100 nM; 反应酶 0.2 μl, 1.0 U/rxn; 水 1.8 μl。循环参数: 94 °C, 900 s; 94 °C, 20 s; 56 °C, 30 s; 72 °C, 60 s; 72 °C, 180 s; 4 °C 存放, 其中第 2~4 步骤循环 45 次。通过 SAP 酶消化掉反应体系中剩余的 dBTP, 按照 iPLEX GOLD 建议进行单碱基延伸。PCR 产物在单碱基延伸后将纯化的 DNA 采用北京博迈德

基因技术有限公司生产的基因克隆试剂盒进行基因克隆, 参照说明书筛选获得阳性表达质粒并进行基因测序, 将测得的序列与基因库中 EGFR 序列 (NM005228.3) 进行比较, 分析 EGFR 基因突变类型及突变位点。

1.3 EGFR-TKI 治疗 21 例患者接受口服吉非替尼 (商品名: 易瑞沙, 生产单位: 英国阿斯利康制药有限公司, 批号: 20100112) 靶向化疗, 每日 250 mg, 4 周为 1 个疗程, 持续口服至肿瘤进展或发生不可耐受的毒副作用。

1.4 统计学方法 数据采用 SPSS 22.0 统计学软件进行分析, EGFR 各位点的突变与临床病理特征关系采用单因素分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EGFR 基因突变与临床病理特征的关系 274 例 NSCLC 患者癌组织中共检出 EGFR 基因突变 52 例, 基因突变率为 18.98%。EGFR 基因突变与临床病理特征的分析显示, EGFR 的基因突变多发生在女性、晚期肺癌患者 (P < 0.05, P < 0.01)。见表 2。

2.2 EGFR 基因突变分布及少见联合突变 52 例发生 EGFR 基因突变的 NSCLC 患者中 EGFR-18 位点突变 13 例, EGFR-19 位点突变 11 例, EGFR-20 位点突变 13 例, EGFR-21 位点突变 15 例。较为少见的突变类型为 G719 (G719A、G719S) 4 例、S720F 2 例、F723L 1 例发生于 EGFR-18; S768I 1 例、G796S 1 例、插入突变 3 例发生于 EGFR-20; L861 (L861Q、L861R) 3 例发生于 EGFR-21。因此, 52 例中发生 EGFR-21 L858R 替代突变类型最多 (12 例) 占 23.08%, 其次为 EGFR-19 的缺失突变 (11 例) 占 21.15%, 该两种类型为

表 2 EGFR 基因突变与临床病理特征 (例)

因素	例数	突变	χ ² 值	P 值
年龄				
<60 岁	131	24	0.07	>0.05
≥60 岁	143	28		
性别				
男	156	18	13.04	<0.01
女	118	34		
组织类型				
鳞癌	152	25	1.68	>0.05
腺癌	103	22		
大细胞癌	19	5		
分期				
I、II 期	121	15	0.10	<0.05
III、IV 期	153	37		
转移				
有	124	21	0.61	>0.05
无	150	31		

表 3 EGFR 基因突变类型及分布

位点	突变类型	例数
EGFR-18		13
	18 E709A	4
	18 E709K	2
	18 G719A	2
	18 G719S	2
	18 S720F	2
	18 F723L	1
EGFR-19		11
	Del-19	11
EGFR-20		13
	20 S768I	1
	20 V769L	2
	20 R776H	3
	20 T790M	3
	20 G796S	1
	插入突变	3
EGFR-21		15
	21 L858R	12
	21 L861Q	1
	21 L861R	2

NSCLC 患者 EGFR 基因突变的主要类型。见表 3。

2.3 EGFR-TKI 治疗效果 本组共有 21 例患者接受了 EGFR-TKI 治疗, 8 例 (38.10%) 患者的病情得到有效控制。8 例患者中有 7 例 (28.57%) 患者发生 EGFR 基因突变, 其中 3 例患者为 EGFR-19 缺失突变类型, 3 例患者为 EGFR-21 L858R 突变类型, 1 例为单一少见突变类型 (EGFR-20 插入突变), 6 例患者为联合突变, 皆为 EGFR-19 缺失突变或 EGFR-21 L858R 替代突变联合其他突变类型。余 13 例患者未发生 EGFR 基因突变。因此, EGFR-TKI 疗效的发挥可能与 EGFR 基因突变相关。

3 讨论

EGFR 为一种跨膜受体, 在 80% ~ 85% 的 NSCLC 患者中可以被检测到, EGFR 基因位于人 7 号染色体上, 酪氨酸激酶功能区由外显子 18 ~ 24 编码, 其突变类型主要包括 EGFR-19 缺失突变、EGFR-18 ~ 21 的单核苷酸替换突变以及 EGFR-20 的复制突变^[10-11]。但据既往研究发现, EGFR 的基因突变主要发生在 18 ~ 21 外显子上, 多被认为其为活化性突变, EGFR-19 基因突变的发生率可达到 50% 以上。EGFR-19 的缺失突变靠近能够控制 ATP 结合囊使其变窄的 alpha-C-helix 序列, 而 EGFR-21 L858R 突变靠近能使 A-loop 稳定型增加的 Asp-Phe-Gly 序列^[12]。本研究发现 52 例 EGFR 基因突变的 NSCLC 患者中发生 EGFR-21 L858R 突变类型最多 (23.08%), 其次为 EGFR-19 的缺失突变 (21.15%), 该两种类型为 NSCLC 患者 EGFR 基因突变的主要类型。联合突变类型多数以外

显子 19 的缺失突变或外显子 21 L858R 的替换突变联合其他类型的突变, 这与相关的报道一致。既往报道少见突变及联合突变的发生率为 2.6% ~ 14.0%, 另一项回顾性分析显示 61.1% 的患者存在 EGFR 少见及联合的基因突变类型^[13-14]。

本研究发现 EGFR 的基因突变与与性别、肿瘤分期相关。女性群体发生 EGFR 基因突变的几率更高, 这可能与女性雌性激素分泌有关。既往研究发现, 绝经前 NSCLC 女性患者的肿瘤更具有侵袭性^[15-17]。Stabile 等^[18]报道 EGFR 通路雌激素受体间具有相互作用, 但具体雌激素的作用机制尚需进一步研究。另一种解释是女性多为不吸烟人群, 而在相关报道中发现 EGFR 的突变率在吸烟、既往吸烟及不吸烟患者中分别为 3%、8% 及 20%, 这说明吸烟并不是导致 EGFR 发生基因突变的诱因, 而 EGFR 突变可能是不吸烟者早期的分子改变。本研究发现 EGFR 基因突变与肺癌类型并无相关性, 但在肺腺癌中 EGFR 的突变率要高于其他癌症类型。Paez 等^[19]发现 EGFR 突变发生率在肺腺癌中较高, 且女性高于男性。本研究还发现 EGFR 突变与肿瘤转移无相关性, 有研究通过对肺癌组织及正常组织的对比, 发现 EGFR 突变与拷贝数的增加在原发肿瘤及转移灶中均被发现, 并不存在差异, 但在正常组织中则未被发现。Lynch 等^[20]也报道了 EGFR 突变在 NSCLC 患者中仅发生于肿瘤组织, 而正常组织中未见。

目前, 众多研究均证实了 EGFR-TKI 在 NSCLC 治疗中的良好效果。EGFR-TKI 在国内主要为吉非替尼及厄洛替尼, 众多研究报道了 EGFR-TKI 的疗效与 EGFR 的基因突变相关, NSCLC 患者中 10% 的白种人群及 50% 的亚裔人群发生 EGFR 基因突变, 均对上述药物表现出敏感性^[21]。Hata 等^[22]报道 Del-19 或 L858R-21 联合突变类型的患者接受 EGFR-TKI 治疗后的中位生存期可达 16.5 个月, RR 值为 86%。Keam 等^[23]也报道了 Del-19 或 L858R-21 联合突变类型的患者接受 EGFR-TKI 治疗后可以达到较长的生存期。对于较为少见的突变类型, 有研究也显示其对 EGFR-TKI 的治疗有利, Wu 等^[8]报道 EGFR-18 G719 单一或联合突变患者经 EGFR-TKI 治疗后中位生存期为 8.1 个月, RR 值为 53.3%。国内相关研究也证实 EGFR 突变与 TKI 的疗效相关, 约 1/3 的 NSCLC 在使用 EGFR-TKI 治疗后病情得到控制。这可能与 EGFR 基因突变致其结合 ATP 能力增强, 从而增强了 EGFR-TKI 的治疗效果有关^[24]。本研究也显示 EGFR 的基因突变与 EGFR-TKI 的疗效相关联, 这为 NSCLC 患者提供了一个有效地靶向治疗措施, 对不能耐受放

化疗的患者提供了更丰富的治疗手段。

因此,EGFR 基因突变对 NSCLC 患者的临床治疗具有重要意义,NSCLC 患者的 EGFR 基因检测具有重要价值,其可能成为治疗 NSCLC 有效的靶点。本研究因病例数较少,检测得到突变例数较少,对于 EGFR-TKI 的标准化用药及预后关系还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Yang JJ,Zhang XC,Su J, et al. Lung cancers with concomitant EGFR mutations and ALK rearrangements; diverse responses to EGFR-TKI and crizotinib in relation to diverse receptors phosphorylation [J]. *Clin Cancer Res*,2014,20(5):1383-1392.
- [2] Parkin DM,Ferlay J,Curado MP, et al. Fifty years of cancer incidence: CI5 I-IX [J]. *Int J Cancer*,2010,127(12):2918-2927.
- [3] Douillard JY,Ostros G,Cobo M, et al. First-line gefitinib in Caucasian EGFR mutation-positive NSCLC patients: a phase-IV, open-label, single-arm study [J]. *Brit J Cancer*,2014,110(1):55-62.
- [4] Zhou C,Wu YL,Chen G, et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study [J]. *Lancet Oncol*, 2011,12(8):735-742.
- [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 (EUR-TAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial [J]. *Lancet Oncol*,2012,13(3):239-246.
- [6] Pao W,Miller V,Zakowski M, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2004,101(36):13306-13311.
- [7] 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]. *Scientific Reports*,2014,4(1):116-120.
- [8] Wu JY,Yu CJ,Chang YC, et al. Effectiveness of tyrosine kinase inhibitors "uncommon" epidermal growth factor receptor mutations of unknown clinical significance in non-small cell lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*,2011,17(11):3812-3821.
- [9] Wu JY,Wu SG,Yang CH, et al. Lung cancer with epidermal growth factor receptor exon 20 mutations is associated with poor gefitinib treatment response [J]. *Clin Cancer Res*,2008,14(15):4877.
- [10] Herbst RS,Heymach JV,Lippman SM. Lung cancer [J]. *N Engl J Med*,2008,359(13):1367-1380.
- [11] Farina Sarasqueta A,Moerland E,de Bruyne H, et al. SNaPshot and StripAssay as valuable alternatives to direct sequencing for KRAS

mutation detection in colon cancer routine diagnostics [J]. *J Mol Diagn*,2011,13(2):199-205.

- [12] Shigematsu H,Gazdar AF. Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers [J]. *Int J Cancer*, 2006,118(2):257-262.
- [13] De Pas T,Toffalorio F,Manzotti M, et al. Activity of epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors in patients with non-small cell lung cancer harboring rare epidermal growth factor receptor mutations [J]. *J Thorac Oncol*,2011,6(11):1895-1901.
- [14] Zhang GC,Lin JY,Wang Z, et al. Epidermal growth factor receptor double activating mutations involving both exons 19 and 21 exist in Chinese non-small cell lung cancer patients [J]. *Clin Oncol*,2007, 19(7):499-506.
- [15] Kobayashi S,Canepa HM,Bailey AS, et al. Compound EGFR mutations and response to EGFR tyrosine kinase inhibitors [J]. *J Thorac Oncol*,2013,8(1):45-51.
- [16] Grassadonia A,Nicola MD,Grossi S, et al. Long-term outcome of neoadjuvant endocrine therapy with aromatase inhibitors in elderly women with hormone receptor-positive breast cancer [J]. *Ann Surg Oncol*,2014,21(5):1575-1582.
- [17] Siegfried JM. Women and lung cancer: does oestrogen play a role [J]. *Lancet Oncol*,2001,2(8):506-513.
- [18] Stabile LP,Lyker JS,Gubish CT, et al. Combined targeting of the estrogen receptor and the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer shows enhanced antiproliferative effects [J]. *Cancer Res*,2005,65(4):1459-1470.
- [19] Paez JG,Jänne PA,Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy [J]. *Science*, 2004,304(5676):1497-1500.
- [20] 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.
- [21] Hirsch FR,Bunn PA Jr. EGFR testing in lung cancer is ready for prime time [J]. *Lancet Oncol*,2009,10(5):432-433.
- [22] Hata A,Yoshioka H,Fujita S, et al. Complex mutations in the epidermal growth factor receptor gene in non-small cell lung cancer [J]. *J Thorac Oncol*,2010,5(10):1524-1528.
- [23] Keam B,Kim DW,Park JH, et al. Rare and complex mutations of epidermal growth factor receptor, and efficacy of tyrosine kinase inhibitor in patients with non-small cell lung cancer [J]. *Int J Clin Oncol*, 2013,19(4):594-600.
- [24] 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 randomized trials [J]. *Clin Lung Cancer*,2012,13(2):107-114.

收稿日期:2016-04-16 修回日期:2016-05-28 编辑:王国品