

• 论 著 •

# 中山市非小细胞肺癌患者 EGFR 基因与 EML4-ALK 融合基因突变的统计分析

赵丽辉<sup>1</sup>, 孙世珺<sup>1</sup>, 陈应智<sup>2</sup>

(中山市人民医院: 1. 分子诊断中心; 2. 病理科, 广东中山 528403)

**摘要:**目的 检测广东省中山市非小细胞肺(NSCLC)癌患者表皮生长因子受体(EGFR)基因和棘皮动物微管相关蛋白样-4 与渐变性淋巴瘤激酶(EML4-ALK)融合基因的突变情况,及与 NSCLC 临床病理特征的关系。方法 通过探针扩增阻滞突变系统(ARMS)荧光定量 PCR 法对到中山市人民医院就诊的 753 例 NSCLC 患者进行 EGFR 基因及 EML4-ALK 融合基因检测,研究其突变率及与临床特征的相关性,探讨 NSCLC 患者 EGFR 基因和 EML4-ALK 融合基因突变的意义。结果 753 例 NSCLC 患者中 EGFR 基因突变率 43.16%(325/753),其中 19 和 21 号外显子突变率最高,分别为 43.08%(140/325)和 47.38%(154/325),21 号外显子主要是 L858R 突变。EGFR 突变率高的 NSCLC 患者以女性、无吸烟史、腺癌、腺鳞癌、腺癌转移者多见( $P < 0.05$ ),与患者年龄无相关性( $P > 0.05$ )。对 EGFR 基因检测中的 110 例病例同时进行了 EML4-ALK 融合基因检测,突变率为 9.09%(10/110),突变体 1 型的突变率(80%)明显高于突变体 2、3 型(各 10%),EML4-ALK 基因突变患者多为年龄偏小者( $P < 0.05$ ),与性别、吸烟史及病理分型差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。并检测到 1 例 EGFR 和 EML4-ALK 共存突变的患者。结论 中山市 NSCLC 患者的 EGFR 突变率与国内外文献报道的结果基本一致,因此,EGFR 基因及 EML4-ALK 融合基因检测是分子靶向治疗 NSCLC 患者的重要依据和必要检测手段。

**关键词:**EGFR 基因; EML4-ALK 融合基因; 非小细胞肺癌; 突变率

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.18.022

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)18-2559-04

## Statistical analysis of EGFR mutation and EML4-ALK gene fusion in non-small cell lung cancer patients of Zhongshan City

ZHAO Lihui<sup>1</sup>, SUN Shijun<sup>1</sup>, CHEN Yingzhi<sup>2</sup>

(Zhongshan People's Hospital: 1. Molecular Diagnosis Center; 2. Department of Pathology, Zhongshan, Guangdong 528403, China)

**Abstract: Objective** To detect the mutation of epidermal growth factor receptor(EGFR) gene, fusion of echinoderms microtubule associated protein sample-4 and gradual change of lymphoma kinase(EML4-ALK) gene, as well as describe their relationship with the clinicopathological features in patients with non-small cell lung cancer(NSCLC) from Zhongshan city of Guangdong province. **Methods** Mutations of EGFR gene and EML4-ALK fusion gene in 753 NSCLC patients from Zhongshan People's hospital were detected by ARMS real-time PCR. To study the relationship between the mutation and clinical features and explore the significance of EGFR gene mutation and EML4-ALK fusion in NSCLC. **Results** The EGFR mutation rate of 753 NSCLC patients is 43.16%(325/753), with highest mutation rate in 19 and 21 exons, 43.08%(140/325) and 47.38%(154/325) respectively, and the main mutation in 21 exon is L858R mutation. EGFR mutation is more common in female/non-smoking patients, or patients with adenocarcinoma/adenosquamous carcinoma/adenocarcinoma metastasis( $P < 0.05$ ), but not relates with the age of patients( $P > 0.05$ ). The EML4-ALK fusion gene of 110 patients whose EGFR mutation were checked were simultaneously detected, showing a 9.09%(10/110) mutation rate, and the mutation rate in type 1(80%) is significantly higher than type 2(10%) and 3(10%). Patients with EML4-ALK gene mutation tend to be younger( $P < 0.05$ ), but the EML4-ALK gene mutation rates show no significant differences in groups classified by gender, smoking history or pathological classification( $P > 0.05$ ). EGFR gene mutation and EML4-ALK fusion were detected in one patient simultaneously. **Conclusion** The EGFR mutation rate of patients with NSCLC in Zhongshan city is consistent with results reported in domestic and foreign literatures. Detections of EGFR gene mutation and EML4-ALK fusion are necessary test items, providing important evidence in molecular targeting therapy in NSCLC.

**Key words:**EGFR gene; EML4-ALK fusion gene; non-small cell lung cancer; mutation rate

肺癌是发病率和病死率最高的恶性肿瘤,中国肺癌的 5 年生存率为 18%,非小细胞肺癌(NSCLC)是肺癌中最常见的组织学类型,占肺癌总发病率的 80%~85%,是全球癌症死亡的首要原因<sup>[1]</sup>。随着对肿瘤发病机制及其生物学行为研究的不断深入,越来越多的研究者将治疗的焦点集中于特异性高、不良反应轻的分子靶向药物,它不仅延长了肿瘤患者的生存期,同时因其副作用小,服用方便等特点,有效改善了患者的生存

质量。目前,表皮生长因子受体(EGFR)基因突变和棘皮动物微管相关蛋白样-4 与渐变性淋巴瘤激酶(EML4-ALK)重排是 NSCLC 最重要的两个驱动基因,EGFR 基因突变和 EML4-ALK 融合基因检测是 NSCLC 进行分子靶向治疗前、中、后必要的预测指标,其突变率在不同人群、种族、地域的分布都不尽相同<sup>[2-7]</sup>。目前已证实其突变的优势人群具有以下临床特征:女性、不吸烟、亚裔以及腺癌<sup>[8]</sup>。截至 2015 年,中山市常住

人口约 320.96 万人,本文收集了中山市人民医院 2014 年 7 月至 2016 年 12 月收治的 NSCLC 患者 753 例,通过具有较高灵敏度和特异度的探针扩增阻滞突变系统 (ARMS)PCR 法对 NSCLC 患者进行 EGFR 基因及 EML4-ALK 融合基因检测,研究其突变率与临床特征的相关性,探讨 NSCLC 患者 EGFR 基因和 EML4-ALK 融合基因突变的意义,以期为患者使用基因靶向治疗提供依据,并为 EGFR 基因及 EML4-ALK 融合基因突变的研究累积基础资料。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2014 年 7 月至 2016 年 11 月中山市人民医院就诊的 NSCLC 患者 753 例,年龄 22~89 岁,≥60 岁 476 例,<60 岁 277 例,男 435 例,女 318 例,腺癌 579 例,鳞癌 112 例,腺鳞癌 5 例,其他 57 例。其中纤支镜活检 202 例,手术切除 267 例,穿刺活检 234 例,胸膜活检 16 例,胸水细胞块 18 例,外周血 16 例,除外周血外所有标本均按常规行中性福尔马林固定、石蜡包埋、切片及 HE 染色,由病理科医师阅片确诊。16 例外周血是已明确为肺癌晚期目前无法取活检的患者。

1.2 试剂 EGFR 基因检测试剂盒、EML4-ALK 基因重排试剂盒以及 FDPP DNA/RNA 提取试剂盒均来自厦门艾德生物有限公司,EGFR 基因检测试剂盒可检测 7 种突变基因(包括 18、19、20、21 号外显子上的 7 种突变基因)。EML4-ALK 基因重排试剂盒可检测突变体 1(E6、A19)、突变体 2 和突变体 3。

1.3 方法

1.3.1 前处理 石蜡标本 5 μm 切片 8~20 张至 EP 管中,1 mL 二甲苯脱蜡 1~2 次,1 mL 无水乙醇脱二甲苯,37 °C 温浴器上 10 min 挥发酒精。

1.3.2 EGFR 基因检测 使用 DNA 提取试剂盒,按操作进行消化过夜,具体提取步骤按试剂说明书,所提取的样本 DNA 经微量分光光度仪检测 DNA 浓度,PCR 总反应体积是 42.3 μL,DNA 上机浓度是 2.5 ng/μL。使用的仪器为 ABI7500 扩增仪。PCR 扩增条件是:95 °C,5 min;95 °C,25 s,15 个循环;64 °C,20 s;72 °C,20 s;93 °C,25 s,31 个循环;60 °C,35 s,72 °C,20 s;收集 FAM 信号。使用的仪器为 ABI7500 荧光定量 PCR 扩增仪。

1.3.3 ALK 融合基因检测 使用 DNA/RNA 双提试剂盒,所提取的样本 RNA 经微量分光光度仪检测 RNA 浓度及纯度,A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 均为 2.0~2.1 之间,提取的总 RNA 加入 EA 逆转录酶经逆转录成单链 cDNA,再经探针扩增阻滞突变-聚合酶链锁反应 (ARMS-PCR) 进行扩增,PCR 总反应体积是 25

μL,扩增条件同 EGFR。

1.4 统计学处理 采用 SPSS11.0 软件进行统计学分析,计数资料使用 χ<sup>2</sup> 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 753 例 NSCLC 患者中 EGFR 基因突变 325 例,突变率为 43.16%。18 号外显子突变 8 例(2.46%);19 号外显子突变 140 例(43.08%);20 号外显子突变 11 例(3.38%),其中 20Ins 突变 7 例(2.15%),T790M 突变 2 例(0.62%),S768I 突变 2 例(0.62%);21 号外显子突变 154 例(47.38%),其中 L858R 突变 152 例(46.77%),L861Q 突变 2 例(0.62%),双突变 12 例(3.69%),其中 L858R/T790M 突变 5 例(1.54%);19del/L858R 突变 1 例(0.31%);19del/T790M 突变 4 例(1.23%),G719X/S768I 突变 2 例(0.62%)。见表 1。

2.2 EGFR 基因突变与临床特征的关系 NSCLC 患者中,男性患者的患病人数多于女性(435>318),但 EGFR 基因突变率女性[58.17%(185/318)]高于男性[32.18%(140/435)]。年龄≥60 岁患者居多,突变率 41.18%(196/476),<60 岁突变率为 46.57%(129/277),但差异无统计学意义(P>0.05)。不吸烟者突变率[43.77%(218/498)]明显高于吸烟者[18.04%(46/255)],差异有统计学意义(P<0.05)。腺癌患者占总 NSCLC 患者的 76.89%,腺癌和腺鳞癌的突变率(49.05%,60.00%)明显高于鳞癌(15.18%),腺癌转移的组织突变率也较高(50.00%),其中胸膜转移 7 例,突变 6 例;脑转移 5 例,突变 2 例;胸椎转移 1 例,突变 1 例;淋巴结转移 4 例,肝转移 1 例,均无突变发生。见表 2。

2.3 ALK 融合基因突变率及临床特征 在 EGFR 检测的病例中同时检测 EML4-ALK 融合基因 110 例,共突变 10 例,突变率为 9.09%,突变体 1 型(V1)突变 8 例,突变率占总突变率的 80.00%;突变体 2 型、3 型(V2、V3)各突变 1 例,占突变率的 10.00%(见表 1)。ALK 融合基因突变率女性(10.41%)高于男性(8.06%),但差异无统计学意义(P>0.05)。年龄<60 岁患者突变率(16.67%)明显高于年龄≥60 岁患者(3.23%),且差异有统计学意义(P<0.05)。不吸烟者突变率(12.86%)高于吸烟者(2.5%),但差异无统计学意义(P>0.05)。10 例突变患者中 8 例为肺腺癌,2 例为肺腺癌淋巴结转移。EGFR 基因与 EML4-ALK 融合基因共存突变 1 例,男性,31 岁,为肺腺癌患者,检测出 EML4-ALK 融合基因突变体 1 型和 EGFR 基因 19 号外显子共存突变。见表 2。

表 1 EGFR 基因和 EML4-ALK 融合基因突变的特点

检测名称	n	突变率(%)	外显子	突变率(%)	突变类型
EGFR 基因突变					
G719X	8	2.46	18	2.46	点突变
19del	140	43.08	19	43.08	缺失突变
T790M	2	0.62	20	3.38	点突变
20ins	7	2.15			插入突变
S768I	2	0.62			点突变
L858R	152	46.77	21	47.38	点突变
L861Q	2	0.62			点突变

续表 1 EGFR 基因和 EML4-ALK 融合基因突变的特点

检测名称	n	突变率(%)	外显子	突变率(%)	突变类型
19del/T790M	4	1.23	19+20	3.69	双突变
L858R/T790M	5	1.54	20+21		
19del/L858R	1	0.31	19+21		
G719X/S768I	2	0.62	18+20		
EML4-ALK 融合基因突变					
V1	8	80.00	A20+E13、6a/b、20	9.09	断裂拼接
V2	1	10.00	A20+E15、14		断裂拼接
V3	1	10.00	A20+E2、17、18		断裂拼接

表 2 EGFR 基因和 EML4-ALK 融合基因突变与临床特征的相互关系

参数	EGFR				EML4-ALK				
	n	阳性例数(n)	突变率(%)	P	n	阳性例数(n)	突变率(%)	P	
性别	男	435	140	32.18	<0.05	62	5	8.06	>0.05
	女	318	185	58.17		48	5	10.41	
年龄	≥60	476	196	41.18	>0.05	62	2	3.23	<0.05
	<60	277	129	46.57		48	8	16.67	
吸烟	有	255	46	18.04	<0.05	40	1	2.50	>0.05
	无	498	218	43.77		70	9	12.86	
组织分型	腺癌	579	284	49.05	<0.05	89	8	8.99	>0.05
	鳞癌	112	17	15.18		14	0	0.00	
	腺鳞癌	5	3	60.00		0	0	0.00	
	腺癌转移	18	9	50.00		6	2	33.33	
	其他	39	12	20.51		1	0	0.00	
合计	753	325	43.16		110	10	9.09		

### 3 讨论

EGFR 属于酪氨酸激酶受体,它介导的信号传导途径调节细胞的生长、增殖和分化,EGFR 基因位于第 7 号染色体短臂上(7P12),长约 118 kb,由 28 个外显子组成<sup>[9]</sup>,EGFR 突变主要发生在胞内 TK 区域的前 4 个外显子上(18~21),目前发现的 TK 区域突变有 30 多种<sup>[10]</sup>,它们能导致不依赖于配体的 EGFR-TK 激活突变(3 种类型:缺失突变、替代突变、复制或插入突变)。EGFR 基因突变检测目前已成为 NSCLC 患者靶向药物治疗的参考依据,一代 TKI 药物如吉非替尼和厄洛替尼,在 NSCLC,特别是在肺腺癌的治疗中显示出很好的疗效,美国 FDA 批准厄洛替尼用于一线化疗进展 NSCLC,较安慰剂显著提高总生存期和有效率,肿瘤相关疼痛、咳嗽、症状呼吸困难均得到改善<sup>[11]</sup>。通过对中山市 NSCLC 患者 EGFR 基因检测的研究发现,NSCLC 患者以腺癌居多(76.89%),EGFR 基因总突变率为 43.16%,其中 19 号外显子和 21 号外显子突变率最高(分别是 43.08%和 47.38%),21 号外显子主要以 L858R 突变为主。这与 EGFR 基因突变 90%左右集中在 19 号外显子的缺失和 21 号外显子的错位突变<sup>[12]</sup>的报道相符合,19 号外显子主要为第 746~750 位密码子缺失突变,导致相应的氨基酸序列丢失,21 号外显子为 858 位密码子(L858R)出现 T-G 转换,从而使该位点的亮氨酸变为精氨酸,这两种突变均会增强

肿瘤细胞对酪氨酸激酶抑制剂(TKIs)的敏感性<sup>[13-14]</sup>。有文献报道,19 号外显子的突变率占 EGFR 突变总数的 50%以上<sup>[15]</sup>,而本研究显示,21 号外显子的突变率略高于 19 号外显子,但有研究报道差异无统计学意义( $P>0.05$ )<sup>[16]</sup>。联合突变在各地文献中也均有报道,本研究检测出双突变 12 例(3.69%),其中 20 号外显子和 21 号外显子共突变 5 例,占双突变的 41.67%(5/12),明显高于其他类型的双突变。EGFR 基因突变以女性、不吸烟者、腺癌、腺鳞癌和腺癌转移的突变率较高,NSCLC 可转移至胸膜、淋巴结、脑、肝和胸椎等部位,本研究显示,转移至胸膜的突变率高达 85.7%(6/7),明显高于其他转移部位的突变率,有报道 EGFR 基因在 NSCLC 淋巴结转移患者中的突变率高于无淋巴结转移患者<sup>[17-19]</sup>,本研究却未检测到淋巴结转移的突变病例,这有待于更多病例的统计研究。

EML4-ALK 融合基因也是 NSCLC 的一个重要的驱动基因,有文献报道,不加选择的 NSCLC 患者 EML4-ALK 融合基因总突变率为 3.4%,东方人群突变率为 4.1%,欧美人群为 2.5%<sup>[20]</sup>。Zhang 等<sup>[21]</sup>研究发现,用 RACF-caclpled PCR sequencing 法在中国非选择性 NSCLC 患者中检测出该融合基因的突变率为 11.6%。本研究对研究人群的检测结果显示:EML4-ALK 融合基因突变率为 9.09%(10/110),以突变体 1

的突变率最高,此结果与国内文献所报道的结果也大致相符。且突变均为腺癌患者,以年轻患者多见,突变者发生转移的概率高,以淋巴结转移为主。多数研究报道,EGFR 基因突变和 EML4-ALK 融合基因重排在多数情况下被认为是独立的分子事件,相互排斥,EML4-ALK 融合基因重排又是 EGFR 基因获得性耐药旁路激活的重要机制,但本研究检测出 1 例 EGFR 基因突变和 EML4-ALK 融合基因重排共存的患者,据文献报道亚洲人群 EGFR 基因突变和 EML4-ALK 融合基因重排共存发生率为 0.5%~1.5%,且 EGFR 基因和 EML4-ALK 融合基因磷酸化水平对 TKI 药物疗效具有预测作用<sup>[8,22]</sup>,这说明 EGFR 基因突变和 EML4-ALK 融合基因重排共存现象发生率较低,但不属于独立的分子事件。

通过本次研究,中山市 NSCLC 患者 EGFR 基因突变率和 EML4-ALK 融合基因突变率与国内各地区研究报道的突变率大致相同,这说明 EGFR 基因与 EML4-ALK 融合基因融合基因是 NSCLC 两个非常重要的靶点,在 NSCLC 患者中检测 EGFR 基因和 EML4-ALK 融合基因状态具有重要的临床意义,2016 版《中国晚期原发性肺癌诊治专家共识》推荐所有病理诊断为肺腺癌、含有腺癌成分和具有腺癌分化的 NSCLC 患者进行 EGFR 基因和 EML4-ALK 融合基因突变检测,建议对活检标本诊断或不吸烟的鳞癌患者也进行 EGFR 基因检测。基因检测将造福更多的肺癌患者。基因检测有助于寻找靶向药物,延长生存时间,提高患者生活质量。目前,EGFR 基因及 EML4-ALK 融合基因突变的研究已日渐成熟,但仍需要大量的研究资料去完善我国肺癌分子数据库。

#### 参考文献

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics [J]. JAMA, 2013, 310(9):982.
- [2] 董丹丹,唐源,邹艳,等.四川地区肺腺癌中 EGFR 基因 19、21 外显子突变研究[J].临床与实验病理学杂志, 2011, 27(12):1306-1309.
- [3] 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.
- [4] 陈慧娟,喻长顺,李洪波.广东地区非小细胞肺癌 EGFR 基因的突变研究[J].分子诊断与治疗杂志, 2011, 3(1):29-32.
- [5] 单莉,张琰,赵峰,等.维吾尔族肺腺癌患者的 EGFR 基因突变分析[J].中国肺癌杂志, 2013, 16(2):78-81.
- [6] 谢飞,程德云,樊莉莉,等.西南地区原发性肺腺癌患者 EGFR 基因突变率分析[J].四川医学, 2014, 35(5):624-626.
- [7] 潘丽霞,李娜,高文京,等.浙江省非小细胞肺癌患者 EGFR 基因与 EML4-ALK 融合基因突变的检测及其临床特征[J].南京医科大学学报(自然科学版), 2016, 36(7):830-834.
- [8] 林小梅,莫娟梅,邹敏,等. EGFR 突变的非小细胞肺癌患者 EML4-ALK 融合基因的检测及其临床特征分析[J].中国病理生理杂志, 2012, 28(6):1135-1139.
- [9] Dutta PR, Maly A. Cellular responses to EGFR inhibitor- sand their relevance to cancer therapy[J]. Cancer Lett, 2007, 254(2):165-177.
- [10] 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.
- [11] Pérez-Soler R, Chachoua A, Hammond LA, et al. Determinants of tumor response and survival with erlotinib in patients with non-small-cell lung cancer[J]. J Clin Oncol, 2004, 22(16):3238-3247.
- [12] 刘标,周晓军.非小细胞肺癌个体化治疗的靶向分子检测[J].临床与实验病理学杂志, 2012, 28(8):831-837.
- [13] Sordella R, Bell DW, Haber DA, et al. Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways[J]. Science, 2004, 305(5687):1163-1167.
- [14] Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, et al. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications[J]. Cancer Res, 2004, 64(24):8919-8923.
- [15] Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, et al. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers[J]. J Natl Cancer Inst, 2005, 97(5):339-346.
- [16] 孔蕴源,吕小林,江梅,等.江西地区非小细胞肺癌 EGFR 基因突变分析[J].实验与检验医学, 2016, 34(5):557-560.
- [17] Shiozawa T, Ishii G, Goto K, et al. Clinicopathological characteristics of EGFR mutated adenosquamous carcinoma of the lung[J]. Pathol Int, 2013, 63(2):77-84.
- [18] Song J, Zhong R, Huang H, et al. Combined treatment with Epimedium koreanum Nakai extract and gefitinib overcomes drug resistance caused by T790M mutation in non-small cell lung cancer cells [J]. Nutr Cancer, 2014, 66(4):682-689.
- [19] De Biase D, Visani M, Malapelle U, et al. Next-generation sequencing of lung cancer EGFR exons 18-21 allows effective molecular diagnosis of small routine samples (cytology and biopsy)[J]. PLoS One, 2013, 8(12):e83607.
- [20] 杨衿记,张绪超,江本元,等. EML4-ALK 融合基因为靶点的晚期 NSCLC 个体化治疗研究进展[J].癌症进展, 2010, 8(6):538-545.
- [21] Zhang X, Zhang S, Yang X, et al. Fusion of EML4 and ALK is associated with development of lung adenocarcinomas lacking EGFR and KRAS mutations and is correlated with ALK expression[J]. Mol Cancer, 2010, 9(12):188.
- [22] Lou NN, Zhang XC, Chen HJ, et al. Clinical outcomes of advanced non-small-cell lung cancer patients with EGFR mutation, ALK rearrangement and EGFR/ALK co-alterations[J]. Oncotarget, 2016, 7(40):65185-65195.