

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.03.018

· 短篇论著 ·

血浆 EGFR 基因突变指导进展期肺腺癌的靶向治疗

EGFR gene mutation guides target therapy of advanced lung adenocarcinoma

袁海花, 刘峰, 张文颖, 赵美, 王炯轶, 姜斌 (上海交通大学医学院附属第三人民医院 肿瘤科, 上海 201900)

[摘要] 目的: 研究进展期肺腺癌患者血浆中 EGFR 基因突变与小分子酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI) 吉非替尼(gefitinib, 又称易瑞沙 Iressa) 治疗进展期肺腺癌患者疗效间的关系。方法: 选择上海交通大学医学院附属第三人民医院肿瘤科一线治疗失败后的 44 例进展期肺腺癌患者(男 32 例, 女 12 例) 和 15 位健康志愿者(男 11 例, 女 4 例)。采集受试者血浆, 利用改良酚-氯仿方法提取血浆 DNA, 利用突变富集型 PCR(mutant-enriched PCR, ME-PCR) 扩增 EGFR 基因外显子 19 和 21, 然后进行基因测序。分析肺腺癌患者 EGFR 基因突变与患者年龄、性别、吸烟史、体力状况(performance status, PS) 评分、临床分期、是否接受放疗、一线化疗周期数间的关系, Kaplan-Meier 法和 Log-rank 检验分析 EGFR 基因突变组与 EGFR 野生型组接受吉非替尼治疗的 PFS 和疗效差异。结果: 44 例肺腺癌患者血浆中有 13 例检出 EGFR 基因突变, 其中外显子 19 缺失突变 8 例、外显子 21 点突变 5 例; 健康对照组中未发现 EGFR 基因突变。肺腺癌患者 EGFR 基因突变与患者性别、吸烟史相关, 与患者年龄、PS 评分、分期、是否接受放疗及化疗周期数无关。EGFR 基因突变的肺腺癌患者经吉非替尼治疗后中位无疾病进展时间(PFS) 明显长于无 EGFR 突变患者(8 个月 vs 3.7 个月, $P=0.008$)。结论: 进展期肺腺癌患者血浆中 EGFR 基因突变检测可以作为分子靶向药物治疗的参考。

[关键词] 肺腺癌; 血浆; EGFR 基因; 小分子酪氨酸激酶抑制剂; 分子靶向治疗

[中图分类号] R734.2; R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)03-0327-04

肺腺癌约占原发性支气管肺癌的 25%, 其中约 70% 的患者在就诊时已属进展期。IPASS(Iressa Pan-Asia Study) 研究^[1] 建议, 进展期肺腺癌患者治疗前有必要进行表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR) 基因突变检测, 但临床上很难获取足够的组织标本进行 EGFR 基因突变的检测, 在该研究中 683 例组织标本只有 437 例(64%) 能进行 EGFR 基因突变的检测^[1]。EGFR 基因突变中 85% ~ 90% 是 EGFR 基因外显子 19 的缺失突变和外显子 21 的点突变^[2]。目前不少研究者已在外周血中进行 EGFR 基因突变检测的研究^[3-7]。本研究利用血浆进行 EGFR 基因突变检测, 观察一线治疗失败后进展期肺腺癌患者接受小分子酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI) 吉非替尼靶向治疗的疗效, 以期 EGFR 基因突变检测寻找创伤性小、临床上可行性更大的途径和方法。

1 材料与方法

1.1 血浆标本留取和冻存方法

选择上海交通大学医学院附属第三人民医院肿瘤科一线治疗失败后的进展期肺腺癌患者 44 例, 均签署知情同意书, 留取全血 5 ml, 于 2 h 内 $2\ 500 \times g$ 、 $4\ ^\circ\text{C}$ 离心 20 min, 分离血浆, 置于 EP 管内, 冻存于 $-80\ ^\circ\text{C}$ 冰箱内。入组患者组织标本均病理证实为肺腺癌, 分期为进展期, 年龄范围在 36 ~ 80 岁, 中位

年龄为 60.5 岁, 男性 32 例、女性 12 例。留取标本时间为 2009 年 1 月 17 日至 2009 年 12 月 5 日, 随访截止时间为 2010 年 10 月 31 日。实验同时留取 15 位健康志愿者血浆, 其中男性 11 例、女性 4 例, 中位年龄为 58.5 岁。

1.2 改良酚-氯仿法提取血浆 DNA

利用改良酚-氯仿法提取血浆 DNA。1 ml 血浆中加入 25% SDS 50 μl 、20 mg/ml 蛋白酶 K(Qiagen 公司) 30 μl 、 $55\ ^\circ\text{C}$ 过夜后加入等体积的水饱和酚, 移至低密度锁相凝胶管(MaXtract Low Density, Qiagen 公司), 离心后分离出上清液, 加入等体积的氯仿/异戊醇(24: 1), 混匀后移至高密度锁相凝胶管(MaXtract High Density, Qiagen 公司), 离心后提取的上清液中加入 1/10 体积的醋酸钠(3 mmol/L) 和等体积的异丙醇, $-20\ ^\circ\text{C}$ 过夜, 沉淀漂洗 DNA 后溶于 50 μl 的缓冲液体系中, $-20\ ^\circ\text{C}$ 冻存。

1.3 突变富集 PCR 和测序检测 EGFR 基因突变

[基金项目] 上海市教委基金资助项目(No. 08YZ47)。Project supported by the Scientific Foundation from Education Commission of Shanghai (No. 08YZ47)

[作者简介] 袁海花(1979 -), 女, 上海市人, 硕士, 主要从事肿瘤靶向治疗的研究, E-mail: ayuan790415@126.com

[通信作者] 姜斌(JIANG Bin, corresponding author), E-mail: dr_jiang@yeah.net

突变富集 PCR(mutant-enriched PCR, ME-PCR) 为两轮巢式 PCR, 第一轮扩增出 *EGFR* 基因外显子 19 和 21 后, 利用位点特异性酶切除野生型部分, 再进行第二轮扩增出含有突变的外显子 19 和 21^[5]。 *EGFR* 基因外显子 19 的第一轮正向引物为 ATC-CCAGAAGGTGAGAAAGATAAAATTC, 反向引物为 CCTGAGGTTCCAGAGCCATGGA, *EGFR* 基因外显子 21 的正向引物为 CAGCCAGGAACGTACTGGTGA, 反向引物为 TCCCTGGTGTGTCAGGAAAATGCT。 第一轮反应条件为: 95 °C 10 min, 35 个循环的 94 °C 30 s、56 °C 60 s、72 °C 60 s。 第一轮扩增出的产物分别用 *Mse* I 和 *Msc* I 切除外显子 19 和 21 的野生型部分, 再利用第二轮引物扩增产物, 外显子 19 第二轮正向引物为 ACTGTA AAAACGACGGCCAGTATC-CCAGAAGGTGAGAAAGATAAAATTC, 反向引物为 ACCAGGAAACAGCTATGACCACACAGCAAAGCAGAACTCACATCGAG; 外显子 21 第二轮正向引物为 ACTGTA AAAACGACGGCCAGTGCAGCATGTCAAGATCACAGAT, 反向引物为 ACCAGGAAACAGCTATGACCTCCCTGGTGTGTCAGGAAAATGCT。 反应条件为 95 °C 10 min, 40 个循环的 94 °C 30 s、60 °C 30 s、72 °C 40 s, 最后 72 °C 10 min。 扩增出的产物再进行测序, 分析其突变情况。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件, 利用 χ^2 检验分析基因突变各组间的差异, 利用 Kaplan-Meier 法进行无疾病进展生存分析, Log-rank 检验分析治疗后 *EGFR* 基因突变组及野生型组之间的疗效差异, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺腺癌患者血浆中的 *EGFR* 突变的检出率

在 44 例肺腺癌患者血浆中, 共检测到有 13 例 *EGFR* 基因突变, 其中外显子 19 缺失突变有 8 例(图 1), 均为 $\Delta E746-A750$ 缺失突变(GGAATTA-AGAGAAGC), 外显子 21 突变有 5 例(图 2)。 15 例正常人血浆中 *EGFR* 均为野生型, 与肺腺癌患者存在显著差异($P = 0.017$)。

2.2 肺腺癌患者血浆中 *EGFR* 突变与临床病理特征间的关系

在 44 例肺腺癌患者血浆中, 共检测出 13 例 *EGFR* 基因突变, 其中 6 例为女性(6/11), 7 例为男性(7/33)。 男性中 4 例为外显子 19 突变, 3 例为外显子 21 突变; 女性中 4 例为外显子 19 突变, 2 例为外显子 21 突变。 *EGFR* 基因突变与性别($P =$

0.036)、吸烟史($P = 0.040$)相关, 常见于女性、不吸烟者; 与年龄($P = 0.426$)、体力状况(performance status, PS)评分($P = 0.923$)、临床分期($P = 0.892$)、放疗($P = 0.586$)、化疗周期数($P = 0.950$)无相关性。

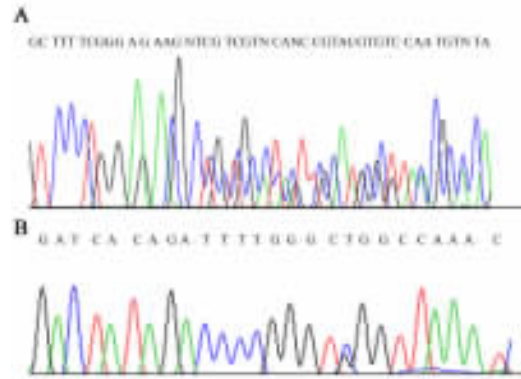


图 1 肺腺癌患者血浆中 *EGFR* 基因外显子 19(A)和 21(B)的突变

表 1 肺腺癌患者血浆中 *EGFR* 突变与临床病理特征的关系

临床病理特征	病例数	<i>EGFR</i> 突变	外显子 19 突变	外显子 21 突变	<i>P</i> 值
性别					
男性	33	7	4	3	$P = 0.036$
女性	11	6	4	2	
年龄					
≥ 60	23	8	5	3	$P = 0.426$
< 60	21	5	3	2	
吸烟史					
是	24	4	3	1	$P = 0.040$
否	20	9	5	4	
PS 评分					
0, 1	30	9	6	3	$P = 0.923$
≥ 2	14	4	2	2	
临床分期					
III B 期	23	7	4	3	$P = 0.892$
IV 期	21	6	4	2	
放疗					
是	5	2	2	0	$P = 0.586$
否	39	11	6	5	
化疗周期数					
< 2	7	2	1	1	$P = 0.950$
≥ 2	37	11	7	4	

2.3 肺腺癌患者血浆中 EGFR 突变与吉非替尼疗效间的关系

在 44 例肺腺癌患者中,13 例患者接受吉非替尼治疗,其中 EGFR 基因突变者 9 例,其中位无疾病进展时间(progression-free survival, PFS)为 4 个月; EGFR 野生型患者 4 例,其中位 PFS 为 3.7 个月($P = 0.008$)。结果提示,EGFR 基因突变肺腺癌患者接受吉非替尼靶向治疗疗效较好。

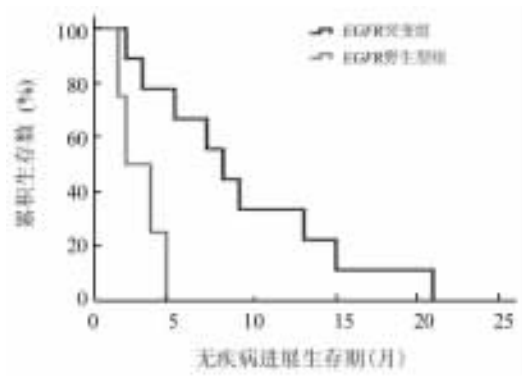


图3 EGFR 突变组与野生型组吉非替尼治疗后 PFS 比较

3 讨论

进展期肺癌患者一般通过支气管镜下活检、CT 定位下肺穿刺、胸腔镜下活检获取组织标本进行病理诊断,但是这些操作创伤大且获取的肿瘤组织标本量少,很难有足够量的肿瘤组织标本进行 EGFR 基因突变的检测。而患者血浆标本获取容易、创伤小,易被患者及家属接受。肿瘤患者血浆中存在肿瘤游离 DNA,可能来源于原发肿瘤释放的 DNA、外周循环中肿瘤微转移灶释放的 DNA、肿瘤细胞凋亡或坏死释放的 DNA^[8]。本研究中,29.5% (13/44) 的进展期肺腺癌患者血浆中检测到 EGFR 基因突变,而健康对照组中未发现有 EGFR 基因突变,证实了进展期肺腺癌患者血浆中存在游离肿瘤 DNA,在无法获取足够组织标本条件下,血浆可成为检测肺腺癌患者 EGFR 基因突变的标本。

在进展期非小细胞肺癌患者中,化疗是主要的治疗手段,但有效率只有 17% ~ 22%^[9]。随着分子靶向药物研究的进展,发现 TKI 对于女性、不吸烟、肺腺癌、EGFR 基因突变者疗效好^[1, 10]。EGFR 基因突变非小细胞肺癌患者对 TKI 治疗有效率达 75%,而 EGFR 基因野生型患者有效率 < 10%^[11]。TKI 作用于 EGFR 胞内的酪氨酸激酶区域,竞争性抑制了

酪氨酸激酶 ATP 结合位点的活化,抑制 EGFR 的自体磷酸化,抑制肿瘤细胞信号转导和增殖,阻断细胞凋亡、侵袭和转移。编码 EGFR 酪氨酸酶功能区的为外显子 18 ~ 21,外显子 19 的缺失突变占 45%,外显子 21 的点突变占 40% ~ 45%;另外一部分为外显子 18 和 20 的突变^[2]。在本研究的 44 例进展期肺腺癌患者血浆中,共检测出 13 例 (13/44, 29.5%) EGFR 基因突变,EGFR 基因外显子 19 突变为 8 例 (8/44, 18.2%),外显子 21 突变为 5 例 (5/44, 11.4%)。肺腺癌患者血浆中 EGFR 基因突变与患者性别、吸烟史有相关性,而与患者年龄无明显相关性,这与本课题前期在肺腺癌患者组织标本中检测 EGFR 基因突变的结果一致^[12]。本研究同时证实 EGFR 基因突变与患者 PS 评分、分期、是否接受放疗、一线化疗周期无关。Chen 等^[5]的研究证实,非小细胞肺癌血浆中 EGFR 基因突变者无疾病进展期 (PFS) 要长于 EGFR 基因野生型患者 (7.609 vs 2.877 个月, $P = 0.002$)。在本研究中,入组患者均为一线治疗失败的进展期肺腺癌患者,在接受 TKI 靶向药物吉非替尼治疗后发现,EGFR 基因突变组的中位 PFS 明显长于 EGFR 野生型患者,EGFR 基因突变的进展期肺腺癌患者可从 TKI 靶向药物治疗中明显获益。

本研究表明,在临床上未能获取足够的组织标本进行基因突变检测时,血浆 EGFR 基因突变检测可以作为 TKI 靶向治疗的参考。

[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] 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.
- [3] Asano H, Toyooka S, Tokumo M, et al. Detection of EGFR gene mutation in lung cancer by mutant-enriched polymerase chain reaction assay [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(1): 43-48.
- [4] Bai H, Mao L, Wang HS, et al. Epidermal growth factor receptor mutations in plasma DNA samples predict tumor response in Chinese patients with stages III B to IV non-small-cell lung cancer [J]. J Clin Oncol, 2009, 27(16): 2653-2659.
- [5] He C, Liu M, Z-hou C, et al. Detection of epidermal growth factor receptor mutations in plasma by mutant-enriched PCR assay for prediction of the response to gefitinib in patients with non-small-cell lung cancer [J]. Int J Cancer, 2009, 125(10): 2393-2399.
- [6] Kimura H, Suminoe M, Kasahara K, et al. Evaluation of epider-

- mal 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.
- [7] 董强刚, 韩宝惠, 黄进肃, 等. 晚期肺癌血清游离 DNA 中 EGFR 外显子 19 的基因突变研究[J]. 肿瘤, 2006, 26(1): 59-63.
- [8] Pathak AK, Bhutani M, Kumar S, et al. Circulating cell-free DNA in plasma/serum of lung cancer patients as a potential screening and prognostic tool [J]. Clin Chem, 2006, 52(10): 1833-1842.
- [9] Schiller JH, Harrington D, Belani CP, et al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer [J]. N Engl J Med, 2002, 346(12): 92-98.
- [10] Janne PA, Engelman JA, Johnson BE. Epidermal growth factor receptor mutations in non-small-cell lung cancer: Implications for treatment and tumor biology [J]. J Clin Oncol, 2005, 23(14): 3227-3234.
- [11] Riely GJ, Politi KA, Miller VA, et al. Update on epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(24): 7232-7241.
- [12] Jiang B, Zhu ZZ, Liu F, et al. Prevalence of mutation in the epidermal growth factor receptor gene in Chinese patients with non-small cell lung cancer [J]. Clin Oncol (R Coll Radiol), 2006, 18(8): 635.
- [收稿日期] 2011-02-10 [修回日期] 2011-04-25
[本文编辑] 韩 丹

· 科技动态 ·

胰腺癌中 miR-301A 是 NF- κ B 的活化物

NF- κ B 信号转导在胰腺癌可发生组成性活化,但并非来源于 NF- κ B 通路中成员遗传活化。来自美国 Louisville 大学的小组研究了在胰腺癌组织中该通路被激活的原因。

miRNA 已被证明是激活 NF- κ B 活化下游发挥功能的效应物,因此作者对一个 miRNA 库进行了筛选,寻找可以调节 NF- κ B 活性的 miRNA。可最有效激活 NF- κ B 信号的 miRNA 是 miR-301A,能使 NF- κ B 的活性上升 5 倍。miR-301A 不与 NF- κ B 转录因子复合物中任何一个亚基结合。但 NF- κ B 的抑制因子 NKRF 是 miR-301A 的靶标之一。当 miR-301A 在 293T 细胞中过表达可使 NKRF 蛋白和 mRNA 的表达减少至原表达量的 1/3,从而使 NF- κ B 的活性上调约 2.5 倍。

在胰腺癌细胞中利用反义寡核苷酸敲减 miR-301A 的表达,可使 NKRF 表达上调, NF- κ B 的 5 个靶基因表达下调,其中一个靶基因 SKA2 的第一内含子即编码 miR-301A。作者在 SKA2 上游发现一个功能性 NF- κ B(特别是 NFKB1-RelA)结合位点,表明 miR-301A 也是活化的 NF- κ B 的一个靶标。而敲除 RELA 和 NFKB1 确实会使 miR-301A 的表达降低。作者的研究结果发现了一个反馈回路,miR-301A 下调 NKRF 的表达,反过来减轻了对 NF- κ B 活性的抑制并激活其靶基因,其中包括 miR-301A。此外,作者发现与正常和癌旁组织相比,胰腺癌组织中 NKRF 表达降低,这与 miR-301A 的高表达和 NF- κ B 活化相一致。

那么,miR-301A 的表达是否影响肿瘤的生长? 在 PANC-1 细胞中稳定敲除 miR-301A 表达可显著减低 RELA 的表达水平,抑制肿瘤细胞增殖和移植肿瘤的生长,并升高 NKRF 的表达。同时,血管形成也受到抑制,表明在 NF- κ B 的下游靶基因血管内皮生长因子 C(VEGFC)对降低移植瘤的生长发挥非常重要的作用。结果表明了缺乏 miR-301A 对 NKRF 的抑制可导致肿瘤生长抑制。综上,该研究发现了一个重要的反馈回路,可以在胰腺癌中有效地引起和保持 NF- κ B 的活性,因此可作为有效的治疗靶点。

[徐安 摘译,李楠 审阅. Lu Z, Li Y, Takwi A, Li B, et al. EMBO J, 2011, 30(1): 57-67.]