

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.06.015

· 短篇论著 ·

## 非小细胞肺癌组织中 *EGFR* 基因突变与 *ERCCI* mRNA 表达的关系

Association of *EGFR* mutation with *ERCCI* mRNA expression in non-small cell lung cancer

徐小博, 楚慧丽, 仲晨, 王俊, 王宝成, 毕经旺(中国人民解放军济南军区总医院 肿瘤科, 山东 济南 250031)

**[摘要]** 目的:探讨非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)中表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, *EGFR*)基因突变与核苷酸切除修复交叉互补基因1(excision repair cross-complementing 1, *ERCCI*) mRNA 表达之间的关系。方法:收集2012年6月1日至2012年12月31日在济南军区总医院肿瘤科经组织病理确诊为NSCLC患者的肿瘤组织标本41例,应用突变扩增阻滞系统(amplification refractory mutation system, ARMS)检测*EGFR*基因突变,采用RT-PCR方法检测*ERCCI* mRNA表达,应用Spearman相关性检验对*EGFR*突变状态与*ERCCI* mRNA的表达进行相关性分析。结果:在41例患者中,*EGFR*突变21例,*ERCCI* mRNA高、中、低表达率分别为19.1%(4/21)、57.1%(12/21)和23.8%(5/21),*EGFR*基因突变与*ERCCI* mRNA表达呈显著相关( $P < 0.01$ )。结论: NSCLC组织中*EGFR*基因突变与*ERCCI* mRNA表达具有显著相关性。

**[关键词]** 非小细胞肺癌;表皮生长因子受体;突变;核苷酸切除修复交叉互补基因1

**[中图分类号]** R734.2; R730.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2014)06-0687-03

肺癌是全球发病率和病死率最高的恶性肿瘤,其中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占肺癌总发病率的80%~85%<sup>[1]</sup>。化疗和靶向治疗是目前治疗NSCLC的有效手段,如何最大限度地提高疗效,对不同特点人群给予针对性的治疗,实现NSCLC的个体化治疗是目前肿瘤治疗的焦点之一。本文探讨表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, *EGFR*)基因突变与核苷酸切除修复交叉互补基因1(excision repair cross-complementing 1, *ERCCI*)在NSCLC中的表达情况,并分析两者之间的相关性,以期为其应用于临床个体化治疗提供数据支持。

### 1 材料与方法

#### 1.1 主要材料与试剂

收集济南军区总医院肿瘤科2012年6月1日至2012年12月31日经组织病理确诊为NSCLC患者41例,其中男性28例,女性13例;年龄35~81岁,中位年龄59岁,≤60岁26例、>60岁15例;腺癌35例,鳞癌4例,腺鳞癌1例,其他型2例;吸烟27例,未吸烟14例。所有标本采集均符合医学伦理学规定,患者均签署知情同意书。

ADx-ARMS人类*EGFR*基因4种突变检测试剂盒、Real-time PCR人类*ERCCI*表达检测试剂盒均购自厦门艾德生物医药科技有限公司。

#### 1.2 ADx-ARMS技术检测NSCLC组织中*EGFR*基

因外显子的突变

本研究检测标本来源于肺癌肿瘤组织或穿刺组织,采用ADx-ARMS技术检测NSCLC*EGFR*基因外显子19、20、21的4种常见基因位点突变(包括de-IE746-A750两种缺失突变:T790M, L858R)。根据试剂盒操作说明进行PCR反应,反应体系为25 μl(23.5 μl DNA + 1.5 μl Taq酶)。反应条件为95℃ 5 min, 95℃ 25 s, 64℃ 20 s, 72℃ 20 s, 共15个循环; 95℃ 25 s, 60℃ 35 s(此处收集FAM和HEX荧光信号), 72℃ 20 s, 31个循环。数据分析采用Stratagene Mxpro软件。

#### 1.3 Real-time PCR方法检测NSCLC组织*ERCCI* mRNA的表达水平

利用荧光定量PCR方法检测NSCLC组织中*ERCCI* mRNA表达。依试剂盒操作说明进行cDNA合成,然后进行PCR反应,具体反应程序如下: 95℃ 5 min; 94℃ 15 s, 60℃ 20 s, 72℃ 20 s, 10个循环; 94℃ 15 s, 58℃ 35s(此处收集FAM荧光信

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No. 81272619)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81272619)

**[作者简介]** 徐小博(1986-),男,山东省莱阳市人,学士,主要从事胸部肿瘤治疗的基础及临床研究, E-mail: xujingtao369@163.com

**[通信作者]** 毕经旺(Bi Jingwang, corresponding author), E-mail: jing-wangbi@live.cn

号),72 ℃ 15 s,35 个循环。数据分析采用标准曲线法,分别获得内参基因  $\beta$ -actin 和目的基因 *ERCC1* 的 Ct 值,样本的 *ERCC1* 基因表达水平采用  $\Delta\Delta Ct$  法计算。

1.4 结果判定

1.4.1 *EGFR* 突变结果判定 针对 4 种常见 *EGFR* 基因突变位点设计相应的突变检测荧光探针,遇到变异型核苷酸序列时,荧光探针与之完全结合,在 PCR 过程中探针荧光报告基团因酶解分离而发射荧光,能够检测到荧光信号的积累,实现检测 *EGFR* 基因突变位点的目的;而当遇到野生型核苷酸序列时,荧光探针不能与之完全结合,因此检测不到荧光信号的积累。利用 ADx 人类 *EGFR* 基因 4 种突变检测试剂盒,根据样本扩增曲线及相应 Ct 值,具体检测结果判断标准如下:出现扩增曲线且 Ct 值 < 26 为阳性,26 ≤ Ct 值 < 29 为弱阳性;否则判定为阴性或低于试剂盒的检测下限。

1.4.2 *ERCC1* mRNA 表达结果判定 以 *ERCC1* 基因、内参基因  $\beta$ -actin 各自的四个梯度质控品分别作标准曲线,分别记录检测样品在 *ERCC1* 基因标准曲

线上的数值 Ct1,检测样品在内参基因  $\beta$ -actin 标准曲线上的数值 Ct2,再计算相对比值 Ct1/Ct2:Ct1/Ct2 值小于  $2.3 \times 10^{-3}$  为低表达;Ct1/Ct2 值介于  $2.3 \times 10^{-3} \sim 6.17 \times 10^{-3}$  为中表达;Ct1/Ct2 值大于  $6.17 \times 10^{-3}$  为高表达。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行分析,计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,*EGFR* 突变情况采用描述性统计分析方法,*EGFR* 突变与 *ERCC1* mRNA 表达相关性采用 Spearman 相关检验分析,以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示具有显著差异。

2 结果

2.1 *EGFR* 突变结果分析

41 例患者中有 21 例出现 *EGFR* 突变,突变率为 51.2%,9 例为 19 外显子突变(42.8%),12 例为 21 外显子 L858R 突变(57.2%),20 外显子 T790M 未发现突变(表 1)。图 1 为 *EGFR* 19 外显子 19-Del 与 21 外显子 L858R 检测结果示意图。

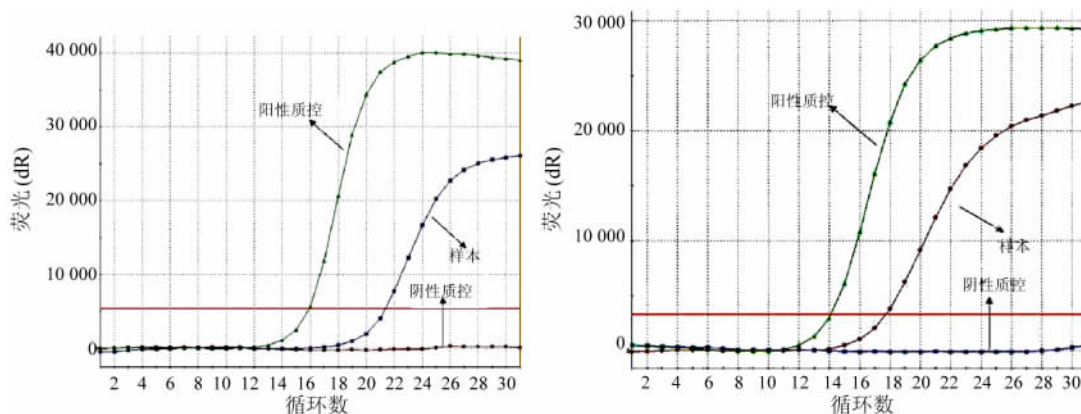


图 1 ADx-ARMS 法检测 *EGFR* 第 19 外显子与第 21 外显子的突变

表 1 41 例 NSCLC 患者 *EGFR* 突变情况

外显子	突变	碱基变化	突变例数
19	E746_A750del	2235_2250del15	9
20	T790M	2369C > T	0
21	L858R	2573T > A	12

2.2 *EGFR* 突变与 *ERCC1* mRNA 表达之间的关系

21 例 *EGFR* 突变阳性病例中,*ERCC1* mRNA 高、中、低表达率分别为 19.1% (4/21)、57.1% (12/21) 和 23.8% (5/21)。20 例 *EGFR* 突变阴性

病例中,*ERCC1* mRNA 高、中、低表达率分别为 10% (2/20)、70% (14/20) 和 20% (4/20)。*EGFR* 突变与 *ERCC1* mRNA 表达水平具有显著相关性。

3 讨论

近年来,以酪氨酸激酶为靶点的治疗方案在特定基因型肿瘤患者的治疗中占据了越来越重要的地位。携带 *EGFR* 敏感突变的 NSCLC 已经成为一个与临床相关的、独特的肺癌亚群,如具有 19 外显子缺失突变、21 外显子 L858R 插入突变的 NSCLC 患者,可以从酪氨酸激酶抑制剂( tyrosine kinase inhibi-

tor,TKI)吉非替尼与厄洛替尼等治疗中获益<sup>[2-3]</sup>。经典的临床实验研究(如 IPASS<sup>[4]</sup>、First-SIGNAL<sup>[5-6]</sup>、OPTIMA<sup>[7]</sup>等)证明了 EGFR-TKIs 药物对 NSCLC 显著的治疗效果,确立了根据患者的基因分型选择合适靶向药物进行个体化治疗的理论。但是,有关 *EGFR* 突变与药敏基因相关的研究目前少有报道。

*ERCC1* 是核苷酸外切修复家族中的重要成员,参与 DNA 链的切割和损伤修复过程,与铂类药物的耐药有关<sup>[8]</sup>。所有肿瘤细胞中具有 *ERCC1* 表达,而且表达水平差异很大。临床研究已经证实,*ERCC1* 表达水平与铂类化疗疗效和生存期呈负相关,即表达水平低的患者对铂类药物敏感,反之表达水平高的患者表现耐药。Roth 等<sup>[9]</sup>的一项荟萃分析更为 *ERCC1* 表达和以铂类为基础的化疗治疗晚期 NSCLC 患者的反应率(response rate)、总生存期(overall survival, OS)具有相关性提供了证据支持。

目前关于 NSCLC 中 *EGFR* 突变与 *ERCC1* 的相关性研究,Gandara 等<sup>[10]</sup>采用 RT-PCR 方法检测了 1207 例 NSCLC 患者 *EGFR* 突变和 *ERCC1* mRNA 表达,结果提示,*EGFR* 突变和 *ERCC1* mRNA 低表达密切相关( $P < 0.01$ )。Lee 等<sup>[11]</sup>分析了 130 例手术切除的 NSCLC 患者 *EGFR* 突变及 *ERCC1* 蛋白表达情况,结果显示,*ERCC1* 阳性表达与阴性表达患者的 *EGFR* 突变率分别为 12.5% 与 30.0%,两者差异具有统计学意义( $P = 0.014$ )。本研究收集中国人 NSCLC 患者的标本进行检测也得到了相同的结果,*ERCC1* mRNA 表达与 *EGFR* 突变具有显著相关性。但是,由于本研究是小样本研究结果,国内尚缺乏大样本的研究数据。因此,关于中国人 *EGFR* 突变与 *ERCC1* mRNA 表达在 NSCLC 中临床意义分析仍需大样本的研究。

## [ 参 考 文 献 ]

[1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics [J]. CA

Cancer J Clin, 2007, 57(1):43-46.

- [2] Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small cell lung cancer with mutated EGFR [J]. N Engl J Med, 2010, 362(25): 2380-2388.
- [3] Ciardiello F, Jezdic S. New insights on personalized cancer treatment: A report from the ESMO congress [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2011, 11(1): 21-23.
- [4] Nguyen KS, Neal JW. First-line treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer: The role of erlotinib and other tyrosine kinase inhibitors [J]. Biologics, 2012, 6:337-345.
- [5] Ku GY, Haaland BA, de Lima Lopes G Jr. Gefitinib vs. chemotherapy as first-line therapy in advanced non-small cell lung cancer: Meta-analysis of phase III trials [J]. Lung Cancer, 2011, 74(3): 469-473.
- [6] Health Quality Ontario. Epidermal growth factor receptor mutation (EGFR) testing for prediction of response to EGFR-targeting tyrosine kinase inhibitor (TKI) drugs in patients with advanced non-small-cell lung cancer: An evidence-based analysis [J]. Ont Health Technol Assess Ser, 2010, 10(24): 1-48.
- [7] Ellis PM, Morzycki W, Melosky B, et al. The role of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as therapy for advanced, metastatic, and recurrent non-small-cell lung cancer: A Canadian national consensus statement [J]. Curr Oncol, 2009, 16(1):27-48.
- [8] Kalikaki A, Kanaki M, Vassalou H, et al. DNA repair gene polymorphisms predict favorable clinical outcome in advanced non-small cell lung cancer [J]. Clin Lung Cancer, 2009, 10(2): 118-123.
- [9] Roth JA, Carlson JJ. Prognostic role of ERCC1 in advanced non-small cell lung cancer: A systematic review and meta-analysis [J]. Clin Lung Cancer, 2011, 12(6):393-401.
- [10] Gandara DR, Grimminger P, Mack PC, et al. Association of epidermal growth factor receptor activating mutations with low ERCC1 gene expression in non-small cell lung cancer [J]. Thorac Oncol, 2010, 5(12): 1933-1938.
- [11] Lee KH, Min HS, Han SW, et al. ERCC1 expression by immunohistochemistry and EGFR mutations in resected non-small cell lung cancer [J]. Lung Cancer, 2008, 60(3): 401-407.

[ 收稿日期 ] 2014 - 05 - 25

[ 修回日期 ] 2014 - 10 - 27

[ 本文编辑 ] 黄静怡

## 本期广告目次

沈阳三生制药有限责任公司 .....	封二
德国美天旎生物技术有限公司 .....	封三
碧迪医疗器械有限公司 .....	封四
上海细胞治疗工程技术研究中心有限公司 .....	插页