DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.06.010

· 临床研究 ·

430 例中国非小细胞肺癌患者 *EGFR*、*KRAS*、*BRAF* 和 *PIK3CA* 基因突变状态及其临床意义

杨宁[1],郭妹[1],宋玉兰[1],李美霞[2],蒲晓宇[2](1. 广东药学院附属第一医院 病理科,广东 广州 510080; 2. 益善生物技术股份有限公司,广东 广州 510080)

[摘 要] **目的**:探讨非小细胞肺癌(non-small cell lung cancers,NSCLC)患者表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, *EGFR*)信号通路中 *EGFR*、Kirsten 鼠肉瘤病毒癌基因(Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, *KRAS*)、B-Raf 原癌基因丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(B-Raf proto oncogene serine/threonine protein kinase,*BRAF*)和磷脂酰肌醇-3-激酶 α 亚单位(phosphatidylinositol -4,5- bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha,*PI3KCA*)基因的突变状态及其临床意义,为酪氨酸酶抑制剂(tyrasin kimase inhibitor, TKI)临床用药与科学研究提供依据。**方法**:采用 SurPlex-xTAG70plex 液相芯片技术平台检测中国 430 例 NSCLC 患者的福尔马林固定石蜡包埋(formalin fixed paraffin embedded, FFPE)组织中 *EGFR*、*KRAS*、*BRAF* 和 *PIK3CA* 基因的突变状态,分析基因的突变率及其与临床病理特征的关系。**结果**:*EGFR*、*KRAS*、*BRAF* 和 *PIK3CA* 的突变率分别为 41.2%,7.9%,0.7% 和 3.7%。*EGFR* 外显子 19、21 在女性患者中的突变率明显高于男性($P<0.01$),在肺腺癌患者中的突变率明显高于其他类型肺癌($P<0.01$),在无吸烟史患者中的突变率高于有吸烟史的患者($P<0.01$)。相反地,*KRAS* 突变在男性患者中的突变率高于女性($P<0.05$),在肺腺癌中的突变率高于肺鳞癌($P<0.005$),有吸烟史患者的突变率高于无吸烟史患者($P<0.01$)。在肺腺癌患者中 *PIK3CA* 的突变率明显低于其他类型肺癌($P<0.01$)。**结论**:*EGFR* 和 *KRAS* 基因突变率与性别、组织学类型及吸烟史密切相关。在检测中发现 *EGFR* 和 *KRAS* 双突变,此外 *PIK3CA* 突变并非与 *EGFR* 和 *KRAS* 突变互斥。

[关键词] EGFR 信号通路;基因突变;非小细胞肺癌;分子标记;中国患者;液相芯片
[中图分类号] R734.2; R730.2 [文献标识码] A [文章编号] 1007-385X(2015)06-0734-06

Clinical signficance of *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* and *PIK3CA* gene mutations in 430 Chinese patients with non-small cell lung cancer

Yang Ning[1], Guo Mei[1],Song Yulan[1], Li Meixia[2], Pu Xiaoyu[2](1. Department of Pathological, First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510080, Guangdong, China; 2. SurExam Bio-Tech Co., Guangzhou 510080, Guangdong, China)

[**Abstract**] **Objective**: To provide guide for the clinical medication of EGFR-tyrosine kinase inhibitors (TKIs) and discussion of their association with clinical pathological features, we investigated the amplification and mutation status of genes encoding epidermal growth factor receptor (EGFR), Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS), B-Raf proto oncogene serine/threonine protein kinase (BRAF) and phosphatidylinositol -4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha (PIK3CA) in NSCLC patients. **Methods**: *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* and *PIK3CA* mutations in 430 randomly selected Chinese patients with NSCLC were analyzed by SurPlex-xTAG70plex platform. The relationship between the mutations and the clinicopathologic features was further evaluated. **Results**: The mutation rates of *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* and *PIK3CA*were 41.2%, 7.9%, 0.7%, and 3.7% respectively in these patients. The mutation rates of *EGFR* exon 19 and 21 were higher in females than those in males ($P<0.01$), significantly increased in adenocarcinomas compared to those in the other forms of lung cancers ($P<0.01$), and risen markedly in non-smokers compared to those in smokers ($P<$

[基金项目] 广东省科学技术厅"高新区及孵化育成体系建设领域"专项资助(No. 2014B010108005). Project supported by the Heigh-tech District and Incubation System Construction Field Foundation of Guangdong Provincial Department of Science and Technology (No. 2014B010108005)
[作者简介] 杨宁(1964-),男,河南省郑州市人,副主任医师,主要从事临床病理诊断与研究,E-mail:ynzwl@126.com
[通信作者] 杨宁(Yang Ning, corresponding author),E-mail:ynzwl@126.com
[优先发表] http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20151216.1249.014.html

0.01). Conversely, the *KRAS* mutation rates were higher in males than those in females ($P<0.05$), increased significantly in adenocarcinomas compared to those in the other forms of lung cancers ($P<0.005$), and risen markedly in smokers compared to those in non-smokers ($P<0.01$). The *PIK3CA* mutation rates were significantly lower in adenocarcinomas compared to those in the other forms of lung cancers ($P<0.01$). **Conclusion**: The mutation rates of *EGFR* and *KRAS* in NSCLC are associated with gender, pathohistology, and smoking habits. Concurrent presence of *EGFR* and *KRAS* mutations was found in NSCLC from these patients, and the mutational statuses of *PIK3CA* and *EGFR* or *KRAS* were not mutually exclusive.

[**Key words**] EGFR signaling pathway; mutation; non-small cell lung cancer; biomarker; Chinese patient; liquidchip

[Chin J Cancer Biother, 2015, 22(6): 734-739]

肺癌，尤其是非小细胞肺癌(non-small cell lung cancers, NSCLC)的病死率位于世界癌症致死率首位[1]。表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)在细胞分化和增殖中起到重要作用，且在癌细胞中异常表达[2-4]，EGFR-酪氨酸酶抑制剂(EGFR-tyrosine kinase inhibitor, EGFR-TKI)，如吉非替尼(Gefitinib)和埃克替尼(Icotinib)，能作用于EGFR酪氨酸激酶亚单元从而封闭 EGFR 信号通路。但在临床试验[5-7]中只有部分患者对治疗应答。EGFR信号通路中存在的基因突变，如*EGFR*、Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (*KRAS*)、B-Raf proto oncogene serine/threonine protein kinase (*BRAF*) 和 phosphatidylinositol -4,5- bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha(*PIK3CA*)的突变与对 EGFR-TKI 的临床应答有关。*EGFR* 外显子 18、19 或 21 突变导致下游信号通路产生变化[8-10]，并使癌细胞对 TKI 介导的细胞凋亡更为敏感，但是 *EGFR* 外显子 20，*BRAF*，*KRAS* 或 *PIK3CA* 在 TKI 治疗中起到抑制作用[11-15]。因此，监控 NSCLC 患者以上基因的突变情况能大体识别 EGFR-TKI 获益人群。当前研究[16-20]证明，*EGFR*激酶区突变在患肺腺癌、不吸烟的东亚女性人群中最为常见。针对 EGFR 信号通路下游各基因具体突变位点的突变情况，一直缺乏针对中国患者的同一样本多突变位点的并行分析。益善公司发明的 SurPlex-xTAG70plex 平台能同时检测包括 *EGFR*、*KRAS*、*BRAF* 和 *PIK3CA* 突变在内的 70 多个突变位点，本研究用其分析了 430 例中国 NSCLC 患者的 FFPE手术组织中 *EGFR*、*KRAS*、*BRAF* 和 *PIK3CA* 基因的突变情况，以期为临床用药与科学研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 临床资料

选取 2010 年 5 月至 2014 年 8 月间广东药学院附属第一医院病理科收治的的中国 NSCLC 患者原发灶或转移灶的 FFPE 手术组织样本 430 例。患者年龄 15～85 岁，中位年龄 58 岁。在 430 例患者中，334 例(77.7%)为腺癌(adenocarcinoma, ADC)，96 例(22.3%)为鳞癌(squamous carcinoma, SQC)。样本中不包含大细胞神经内分泌癌和良性肿瘤。205 例为有吸烟史患者(47.7%)，219 例为无吸烟史患者(51.0%)，6 例未知(1.4%)。

1.2 SurPlex-xTAG70plex 液相芯片技术平台检测 *EGFR*、*KRAS*、*BRAF* 和 *PIK3CA* 在 NSCLC 组织中的突变情况分析

用 Maxwell 系统(Promega, GA, USA)提取组织切片(FFPE)的基因组 DNA，其浓度采用 Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)测定。用 Luminex 200 检测 *EGFR* 外显子 18、19、20、21，*KRAS* 外显子 2、3，*BRAF* 外显子 15 和 *PIK3CA* 外显子 9、20。检测主要分为 5 个步骤：(1)多重 PCR 扩增目的基因片段；(2)在反应体系中加入核酸外切酶Ⅰ-虾碱性磷酸酶(EXO-SAP)去除多余核苷酸和引物；(3)等位基因特异引物延伸。为分辨不同类型的突变位点，针对每个目的基因序列设计特异等位基因特异性延伸(allele specific primer extension, ASPE)引物，引物的一端与目的基因序列特异性地结合，Tsp DNA 聚合酶确保只延伸碱基 100% 吻合的引物-模板互补端。引物另一端连接着 Tag 标签序列，标签序列将与微球上特异的 Anti-tag 序列相结合；(4)与交联了特异探针的微球进行杂交反应；(5)Luminex 阅读仪上读取数据：将杂交后的产物放入 Luminex 200 读取中位荧光强度(median fluorescence intensity, MFI)。DNA 提取和前 3 步在独立的生产质量管理规范(good manufacturing practice, GMP)标准试验间进行。第 4、5 步在药品非临床研究质量管理规范性(good laboratory practice, GLP)实验室进行。以上所做突变分析均在益善测试中心完成[21]。

1.3 统计学处理

采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析。应用卡

方检验,如果列联表中有 20% 以上单元格的期望频数小于 5,则采取 Fisher 确切概率法。以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结　果

2.1　NSCLC 患者中 *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* 和 *PIK3CA* 突变情况及具体位点突变情况

本次检测涉及 430 例样本。共 177 例检出 *EGFR*突变(41.2%),其中,*EGFR* 外显子 18 突变 5 例(1.2%), 外显子 19 突变 81 例(18.8%),外显子 20 突变 8 例(1.9%), 外显子 21 突变 83 例(19.3%)。*KRAS*、*BRAF* 和 *PIK3CA* 突变率分别为 7.9% 、0.7% 和 3.7%(表 1)。13 例(3.0%)出现多位点同时突变。其中,12 例(92.3%)双突变,1 例三突变。6 例(46.2%)*EGFR* 外显子 19 或外显子 21 突变的同时出现 *PIK3CA* 突变。1 例 *EGFR* 外显子 19 和 *KRAS* 双突变,1 例 *KRAS* 和 *PI3CA* 双突变(表 2)。多突变样本采用常规 DNA 测序验证(图 1)。

表 1　430 名中国 NSCLC 患者中 *EGFR*、*KRAS*、*BRAF*、*PIK3CA* 突变率

Tab. 1　Mutation status of *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* and *PIK3CA* in 430 Chinese patients with NSCLC

Gene	No. of mutation	Percentage(%)
EGFR	177	41.2
exon 18	5	1.2
exon 19	81	18.8
exon 20	8	1.9
exon 21	83	19.3
KRAS	34	7.9
exon 2	32	7.4
exon 3	2	0.5
BRAF E15	3	0.7
PIK3CA	16	3.7
exon 9	11	2.6
exon 20	5	1.2

表 2　13 例 NSCLC 多基因突变患者统计

Tab. 2　Summary of 13 NSCLC patients with multiple mutations

Clinical characteristics				Mutation sites
No.	Age/gender	Histology	Smoking	
1	61/F	ADC	No	*EGFR* exon 20 and 21
2	67/M	ADC	No	*EGFR* exon 21 and *PIK3CA* exon 9
3	61/F	ADC	No	*EGFR* exon 19 and 20, and *PIK3CA* exon 20
4	50/F	ADC	No	*EGFR* exon 19 and *PIK3CA* exon 9
5	77/M	Non- ADC	Yes	*EGFR* exon 21 and *PIK3CA* exon 20
6	45/M	ADC	Yes	*EGFR* exon 20 and 21
7	44/F	ADC	No	*EGFR* exon 18 and 20
8	42/F	ADC	No	*EGFR* exon 2 and *PIK3CA* exon 9
9	64/F	ADC	No	*EGFR* exon 19 and 20
10	56/M	ADC	Yes	*EGFR* exon 19 and *KRAS* exon 2
11	55/F	SQC	No	*EGFR* exon 19 and *PIK3CA* exon 9
12	56/M	ADC	No	*EGFR* exon 19 and *PIK3CA* exon 9
13	71/F	ADC	No	*EGFR* exon 20 and 21

ADC: Adenocarcinoma; SQC: Squamous carcinoma; F: Female; M: Male

EGFR 基因中最普遍的突变型为外显子 21 的 L858R (CTG > CGG),占到了 *EGFR* 所有突变的 46.5%。Del E746-A750(K745: AAA), del E746-A750 (K745:AAG), del L747-S752 ins S, del L747-

E749 ins P 和 del L747-T751 是外显子 19 的 5 种主要的框内缺失突变型（图 2A）。*KRAS* 外显子 2 主要的突变形式有 G12C，G12D，G12V，G12A；*PIK3CA* 外显子 9 主要的突变形式有 E545K，E542K，外显子 20 主要的突变形式为 H1047R。所有检出的 *BRAF* 外显子 15 突变均为 V600E（图 2B）。

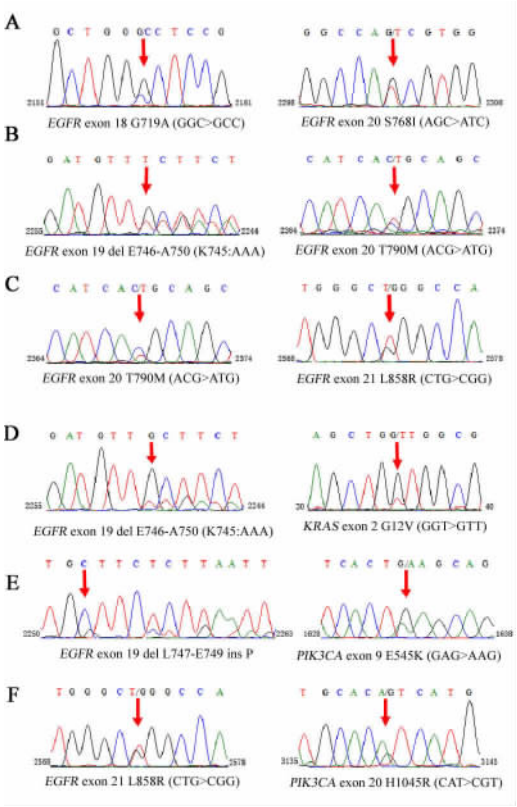

图 1　6 例多重突变样本的 DNA 测序分析

Fig. 1　DNA sequencing data of 6 specimens with multiple mutations

A: The specimen carrying both *EGFR* exon 18 G719A (GGC > GCC) and exon 20 S768I (AGC > ATC) mutations; B: The specimen carrying both *EGFR* exon 19 del E746-A750 (K745:AAA) and exon 20 T790M (ACG > ATG) mutations; C: The specimen carrying both *EGFR* exon 20 T790M (ACG > ATG) and exon 21 L858R (CTG > CGG) mutations; D: The specimen carrying both *EGFR* exon 19 del E746-A750 (K745:AAA) and *KRAS* exon 2 G12V (GGT > GTT) mutation; E: The specimen carrying both *EGFR* exon 19del L747-E749 ins P and *PIK3CA* exon 9E545K (GAG > AAG) mutations; F: The specimen carrying both *EGFR* exon 21 L858R (CTG > CGG) and *PIK3CA* exon 20 H1047R (CAT > CGT) mutations. Arrow points to mutations

2.2　患者临床特征与 *EGFR*，*KRAS*，*BRAF* 和 *PIK3CA* 突变的关系

如表 3，*EGFR* 外显子 19、21 在女性患者中的突变率高于男性（外显子 19，28.3% *vs* 11.8%，$P<0.001$；外显子 21，27.7% *vs* 13.0%，$P<0.001$）。ADC 中的突变率高于其他肺癌亚型（外显子 19，22.6% *vs* 6.3%，$P<0.01$；外显子 21，22.5% *vs* 8.3%，$P<0.01$）。不吸烟患者中高于吸烟者（外显子 19，26.9% *vs* 10.7%，$P<0.001$；外显子 21，28.3% *vs* 10.2%，$P<0.01$）。*KRAS* 突变率在男性患者（10.2% 男性 *vs* 4.9% 女性，$P<0.05$），ADC（9.9% ADC *vs* 1.0% 非 ADC，$P<0.01$），吸烟患者（11.7% 吸烟者 *vs* 4.6% 非吸烟者，$P<0.01$）中较高。

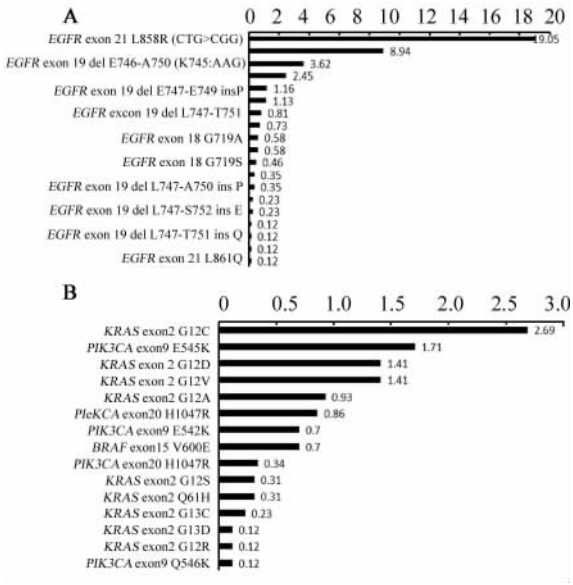

图 2　单基因突变频率（$n=430$，%）

Fig. 2　Frequency for mutations of individual genes（$n=430$，%）

A: *EGFR* exons 18-21; B: *KRAS* exons 2 and 3, *BRAF* exon 15, and *PIK3CA* exons 9 and 20

3　讨　论

本课题研究了 430 例中国 NSCLC 患者体细胞 *EGFR*、*KRAS*、*BRAF* 和 *PIK3CA* 基因突变情况，发现中国 NSCLC 患者 *EGFR*、*KRAS*、*BRAF* 和 *PIK3CA* 突变率与东亚患者类似[6,22-28]。但是 *EGFR* 突变率高于高加索人，*KRAS* 突变率低于高加索人[10,29-31]。王琼等[32]检测 260 例 NSCLC 患者肿瘤组织中的 *EGFR*（18、19、20 和 21 外显子）突变情况，结果显

示，*EGFR* 基因突变检出率为 48.8%，与本文研究结果一致，这为解释中国患者对 EGFR-TKI 的高应答率提供了理论依据。

本研究显示，*EGFR* 外显子 19、21 突变与性别，病理类型和吸烟史有关，该发现已有许多研究证明[9-10,33]。中国不吸烟肺癌患者明显多于北美及欧洲，例如，在中国女性人群中，由吸烟引起的肺癌发生率明显要低于北美及欧洲人群[34]。需指出的是，虽然中国女性普遍不吸烟，但她们可能遭受二手烟危害。此外，环境污染可能在这些差异中起到重要作用。

在 NSCLC 患者中同时存在 *EGFR* 和 *KRAS* 突变非常罕见。一直以来研究者[26,35-38]均认同两者互斥。在 430 例样本中仅 1 例(0.2%)存在 *EGFR* 和 *KRAS* 双突变。此外，*PIK3CA* 突变并非与 *EGFR* 和 *KRAS* 突变互斥。研究[39-40]报道，*EGFR* 外显子 20 的 T790M 突变与 EGFR-TKI 获得性耐药有关。这解释了为何在研究中发现 *EGFR* 外显子 20 通常与 *EGFR* 激活突变相关。

表 3　*EGFR*、*KRAS*、*BRAF* 和 *PIK3CA* 突变相关因素

Tab. 3　Factors associated with mutations of *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* and *PIK3CA*

Item	*EGFR*						*KRAS*		*PIK3CA*	
	Exon 19	*P*	Exon 20	*P*	Exon 21	*P*	Exon 2,3	*P*	Exon 9,20	*P*
Gender										
Famle	52/184	< 0.01	6/184	0.078	51/184	<0.01	9/184	<0.05	4/184	0.411
Male	29/246		2/246		32/246		25/246		12/246	
Pathology type										
ADC	75/334	<0.01	8/334	0.208	75/334	<0.01	33/334	<0.01	9/334	0.059
SQC	6/96		0/96		8/96		1/96		7/96	
Smoking										
Yes	22/205	< 0.01	2/205	0.287	21/205	<0.01	24/205	<0.01	9/205	0.614
No	59/219		6/219		62/219		10/219		7/219	

传统检测基因突变的方法主要是测序法，但由于肿瘤 DNA 的突变率不高，检测灵敏度不高。研究采用 SurPlex-xTAG70plex 液相芯片技术平台分析 430 个样本中，每个样本的 9 个基因，共 26 个突变位点。该平台对样本量要求低，且在降低检测误差的同时，能够发掘同一样本的多基因同时突变信息，为临床研究提供更多参考。

(致谢：益善生物技术股份有限公司提供本研究的试剂和资助。感谢其对本研究的帮助和技术支持)。

[参 考 文 献]

[1] Siegel R, Ma J, Zhaohui Zou MS, et al. Cancer statistics, 2014 [J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(1): 9-29

[2] Cuneo KC, Nyati MK, Ray D, et al. EGFR targeted therapies and radiation: optimizing efficacy by appropriate drug scheduling and patient selection [J]. Pharmacol Ther, 2015, 154: 67-77.

[3] Piotrowska Z, Sequist LV. Epidermal growth factor receptor-mutant lung cancer: new drugs, new resistance mechanisms, and future treatment options [J]. Cancer J, 2015, 21(5): 371-377.

[4] Russo A, Franchina T, Ricciardi GR, et al. A decade of EGFR inhibition in EGFR-mutated non small cell lung cancer (NSCLC): old successes and future perspectives [J]. Oncotarget, 2015, 6 (29): 26814-26825.

[5] Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, et al. Multi-institutional randomized phase Ⅱ trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer [J]. J Clin Oncol, 2003, 21(12): 2237-2246.

[6] Fukuhara T, Maemondo M, Inoue A, et al. Factors associated with a poor response to gefitinib in the NEJ002 study: smoking and the L858R mutation [J]. Lung Cancer, 2015, 88(2):181-186.

[7] Zhang Y, Kang S, Fang W, et al. Impact of smoking status on EGFR-TKI efficacy for advanced non-small-cell lung cancer in EGFR mutants: a meta-analysis [J]. Clin Lung Cancer, 2015,16 (2):144-151.

[8] Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in three pidermal growth factor receptor underlying responsiveness of

non-small-cell lung cancer to gefitinib[J]. N Engl J Med, 2004, 350(21): 2129-2139.

[9] Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy[J]. Science, 2004, 304(5676):1497-1500.

[10] Wu S, Zhu Z, He J, et al. A novel mutantenriched liquidchip technology for the qualitative detection of somatic mutations in KRAS gene from both serum and tissue samples[J]. Clin Chem Lab Med, 2010, 48(8): 1103-1106.

[11] Lee VH, Tin VP, Choy TS, et al. Association of exon 19 and 21 EGFR mutation patterns with treatment outcome after first-line tyrosine kinase inhibitor in metastatic non-small-cell lung cancer[J]. J Thorac Oncol, 2013, 8(9): 1148-1155.

[12] 黄志敏，吴一龙. 非小细胞肺癌的 BRAF 基因突变及其临床意义[J]. 中国肺癌杂志，2012，15(3)：183-186.

[13] Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Molecular spectrum of somatic EGFR and KRAS gene mutations in non small cell lung carcinoma: determination of frequency, distribution pattern and identification of novel variations in Indian patients[J]. Pathol Oncol Res, 2015, 21(3): 675-687.

[14] Minuti G, D'Incecco A, Cappuzzo F. Targeted therapy for NSCLC with driver mutations[J]. Expert Opin Biol Ther, 2013, 13(10):1401-1412.

[15] Yang CH. EGFR tyrosine kinase inhibitors for the treatment of NSCLC in East Asia: present and future[J]. Lung Cancer, 2008, 60(Suppl 2): S23-S30.

[16] Yatabe Y, Mitsudomi T. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancers[J]. Pathol Int, 2007, 57(5): 233-244.

[17] 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.

[18] Bai H, Mao L, Wang HS, et al. Epidermal growth factor receptor mutations in plasma DNA samples non-small-cell lung cancer[J]. J Clin Oncol, 2009, 27(16): 2653-2659.

[19] 李琦，赵亚力，郝好杰，等. 中国肺癌患者 EGFR 基因的突变研究[J]. 中华肿瘤杂志，2008，29(4):270-273.

[20] 陈万青. 2004－2005 年中国恶性肿瘤发病与死亡的估计[J]. 中华肿瘤杂志，2009，31(4)：664-668.

[21] Xu J, He J, Yang H, et al. Somatic mutation analysis of EGFR, KRAS, BRAF and PIK3CA in 861 patients with non-small cell lung cancer[J]. Cancer Biomark, 2011, 10(2): 63-69.

[22] Soung YH, Lee JW, Kim SY, et al. Mutational analysis of EGFR and K-RAS genes in lung adenocarcinomas[J]. Virchows Arch, 2005, 446(5): 483-488.

[23] Tam IY, Chung LP, Suen WS, et al. Distinct epidermal growth factor receptor and KRAS mutation patterns in non-small cell lung cancer patients with different tobacco exposure and clinicopathologic features[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(5): 1647-1653.

[24] 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.

[25] Jang TW, Oak CH, Chang HK, et al. EGFR and KRAS mutations in patients with adenocarcinoma of the lung[J]. Korean J Intern Med, 2009, 24(1): 48-54.

[26] Shibata T, Hanada S, Kokubu A, et al. Gene expression profiling of epidermal growth factor receptor/KRAS pathway activation in lung adenocarcinoma[J]. Cancer Sci, 2007, 98(7): 985-991.

[27] Kawano O, Sasaki H, Endo K, et al. PIK3CA mutation status in Japanese lung cancer patients[J]. Lung Cancer, 2006, 54(2): 209-215.

[28] Nelson HH, Christiani DC, Mark EJ, et al. Implications and prognostic value of K-ras mutation for early-stage lung cancer in women[J]. J Natl Cancer Inst, 1999, 91(23): 2032-2038.

[29] Fallet V, Saffroy R, Girard N, et al. High-throughput somatic mutation profiling in pulmonary sarcomatoid carcinomas using the lung carta? Panel: exploring therapeutic targets[J]. Ann Oncol, 2015, 26(8): 1748-1753.

[30] Marks JL, McLellan MD, Zakowski MF, et al. Mutational analysis of EGFR and related signaling pathway genes in lung adenocarcinomas identifies a novel somatic kinase domain mutation in FGFR4[J]. PLoS ONE, 2007, 2(5): e426.

[31] 王琼，吕亚莉，钟梅，等. 非小细胞肺癌中 EGFR 和 K-ras 基因突变检测分析与病理特征的关系[J]. 诊断病理学杂志，2012，19(2):144-147.

[32] Sasaki H, Endo K, Takada M, et al. EGFR exon 20 insertion mutation in Japanese lung cancer[J]. Lung Cancer, 2007, 58(3): 324-328.

[33] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.

[34] 张洁霞，李时悦，占扬清，等. 中国非小细胞肺癌患者 K-Ras 和 EGFR 基因突变与临床病理特征的关系[J]. 临床肿瘤学杂志，2014，19(9):799-803.

[35] 孙蕾娜，栾焕玲，臧凤琳，等. 中国人非小细胞肺癌 EGFR 和 K-ras 基因突变与临床病理特征及厄洛替尼治疗效果的关系[J]. 中华肿瘤杂志，2010，32(9)：667-670.

[36] Do H, Krypuy M, Mitchell PL, et al. High resolution melting analysis for rapid and sensitive EGFR and KRAS mutation detection in formalin fixed paraffin embedded biopsies[J]. BMC Cancer, 2008, 8: 142. DOI:10.1186/1471-2407-8-142.

[收稿日期] 2015－07－02 [修回日期] 2015－10－15
[本文编辑] 黄静怡