

## 血浆 EGFR19 外显子缺失突变高灵敏度检测技术的建立\*

210008 南京 南京大学医学院附属鼓楼医院肿瘤中心  
谢 丽, 尹震宇<sup>1</sup>, 魏 嘉, 禹立夏, 钱晓萍, 刘宝瑞<sup>2</sup>

**【摘要】目的** 探讨结合酶切及片段分析技术建立稳定的高灵敏度 EGFR19 外显子缺失突变检测技术检测血浆 EGFR19 外显子缺失突变的价值。**方法** 设计针对野生型片段的限制性内切酶予以降低野生型 DNA 背景。通过野生型和突变型序列的分析,以野生型序列为酶切底物,选择工具内切酶 *Tru1 I*,设计内外两个 PCR 反应引物,且内侧引物一端予以标记绿色荧光。采用 PCR-酶切-PCR-片段分析步骤,优化各反应条件,得到稳定的技术。以野生型 DNA 稀释突变型 DNA 检测该方法的灵敏度。采用上述方法检测 42 例肺癌患者外周血浆中 EGFR19 外显子突变情况。**结果** 采用野生型 DNA 稀释突变型 DNA 模拟检测本方法的灵敏度,能够检测出 1:1000(Mt:Wt) 突变型 DNA。42 例肺癌患者中 5 例血浆 EGFR19 外显子存在缺失,其中 4 例为 15bp 的缺失,1 例为 24bp 的缺失。**结论** 本研究建立了一种联合酶切与片段分析的高灵敏度血浆 EGFR 19 外显子缺失突变检测技术,能够有效从外周血中检测出 EGFR19 外显子缺失突变。

**【关键词】** EGFR 19 外显子缺失突变; 突变检测; 血浆

中图分类号:R734.2 文献标识码:A 文章编号:1009-0460(2014)05-0407-04

### A high-sensitivity detection method for plasma EGFR exon 19 deletion

XIE Li, YIN Zhenyu, WEI Jia, YU Lixia, QIAN Xiaoping, LIU Baorui. Comprehensive Cancer Center, Drum Tower Hospital Affiliated to Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008, China

Corresponding author: LIU Baorui, E-mail:baorui@nju.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To establish a stable, high-sensitive detection technology of EGFR19 exon deletion mutation through combined restriction fragment length polymorphism(RFLP) and fragment analysis techniques. **Methods** Wide type DNA was digested to reduce the background. Fragment analysis was used to assess the length of DNA. The wild-type DNA was used to dilute mutant DNA to test the sensitivity of the method. Using this method, we detected the status of EGFR 19 exon in 42 non-small cell lung cancer (NSCLC) peripheral blood plasma. **Results** The mutant DNA diluted in wide-type DNA was used to test the sensitivity of the method and the highest sensitivity was 1:1000(Mt:Wt). For the 42 plasma samples of NSCLC, 5 samples contained EGFR19 exon deletion mutation, with four cases 15bp deletion, 1 cases 24bp deletion. **Conclusion** We established a restriction enzyme digestion and fragment analysis based high sensitive method to detect plasma EGFR exon 19 deletion. The method can effectively identify EGFR19 exon deletion mutations in the peripheral blood.

**【Key Words】** EGFR 19 exon deletion; Mutation detection; Plasma

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)突变对于非小细胞肺癌小分子酪氨酸激酶抑制剂(TKI)的使用具有重要的指导意义。在 EGFR 活化突变中,其 19 外显子缺失突变和 21 外显子 L858R 点突变占 90%以上,其中 EGFR19 外显子的缺失突变率在亚洲人群中与 L858R 突变比率类似,在白种人中其突变率约为 L858R 的 2 倍。体

液标本中蕴含的信息远比原来预想的多,除了通常用于肿瘤诊断以及病情判断的蛋白/多肽类肿瘤标志物,血浆等体液标本存在着非细胞性游离核酸(cell-free nucleic acids)。肿瘤患者的血清游离 DNA 高于健康个体,DNA 片段约 200~300bp,主要来源于肿瘤细胞坏死<sup>[1]</sup>。目前,国内外研究者开展了血浆 EGFR 突变检测技术的建立及应用探索。部

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81101816);南京市医学科技发展资助项目(YKK12063)

1 210008 南京大学医学院附属鼓楼医院老年科

2 通讯作者,E-mail:baorui@nju.edu.cn

分研究证实,外周血标本 EGFR 突变检测同样能够指导临床 EGFR-TKI 的使用<sup>[2-4]</sup>,且血液标本是临床检验常用标本,获取方便,且可反复获取。目前,针对点突变的检测技术较为成熟,如扩增阻滞突变系统(ARMS)-PCR 等。相对而言,由于 EGFR 19 外显子存在多种缺失突变,因而该外显子缺失突变检测较为困难。采用基于定量 PCR 的方法检测往往需要多个反应同步进行,增加了检测成本,同时也容易遗漏不常见的缺失突变。本研究结合酶切及片段分析技术,建立了稳定的高灵敏度 EGFR19 外显子缺失突变检测技术,现将结果报告如下。

## 1 材料与方法

1.1 标本来源 收集 2011 年 7 月至 2011 年 12 月南京大学附属鼓楼医院肿瘤科晚期非小细胞肺癌患者外周静脉血 42 例。入选标准:病理确诊为非小细胞肺癌;未对性别、年龄、病理类型及吸烟史等方面筛选。标本采用 EDTA 抗凝,2000r/m 10min 离心取上清,12 000r/m 10min 离心,取上清,-20℃ 保存备用。

1.2 细胞系 非小细胞肺癌 PC9 细胞系经测序证实为 EGFR 19 外显子 15bp 缺失;非小细胞肺癌 H1975 细胞系经测序证实为 19 外显子野生型,21 外显子 L858R 突变型。采用 PC9 细胞 DNA 作为 19 外显子阳性对照,H1975 细胞作为 19 外显子检测阴性对照。

1.3 试剂与仪器 DNA 提取分离试剂盒购自德国 Qiagen 公司,HS Taq PCR 试剂盒购自日本 Takara 公司,限制性内切酶 Tru1 I 购自加拿大 Fermentas 公司,500-LIZ 购自美国 Applied Biosystems 公司,BioPhotometer 生物分光光度计购自德国 Eppendorf 公司,ABI3130 型基因分析仪购自美国 Applied Biosystems 公司。

1.4 引物序列 19F1: 5'-GAAGGTGAGAAAGAT-AAAATTC-3';19R1: 5'-CTGAGGTTTCAGAGCCAT-GGA-3';19F2: 5'-GATAAAATTCCTCGTCTATC-3';19R2: 5'-CACACAGCAAAGCAGAAC-3'。

1.5 DNA 提取 用 DNA 提取分离试剂盒分别提取肺癌细胞系 PC9、H1975 细胞 DNA 及血浆 DNA,采用 BioPhotometer 生物分光光度计检测 DNA 的质量及数量,计算所有 DNA 的吸光值(A)比值: $A_{260} : A_{280}$  值均介于 1.8~2.0 之间。所提取的 DNA 置于 -20℃ 保存。

1.6 PCR 及酶切反应体系 PCR 反应体系均为 10 ×PCR buffer 2μl, dNTP 0.5μl,上下游引物为 1μl, Taq 酶 0.1μl, DNA 2μl,用水补足 20μl。PCR 扩增反应:95℃ 预变性 30s,95℃ 变性 15s,60℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 30s,30 个循环。酶切反应:Buffer R 2μl, Tru1 I 1μl,水 18μl,PCR 产物 10μl,65℃ 孵育 2h,直接取酶切反应产物进行 PCR,条件同前,引物为 19F2 和 19R2。

1.7 片段分析 将第 2 次 PCR 产物稀释 100 倍,加入适量 500-LIZ,热变性,采用 ABI 3130 基因分析仪进行片段分析。

1.8 灵敏度测定 采用梯度稀释法将 EGFR 19 外显子突变(PC9)的 DNA 按一定比例(1:10、1:100、1:1000)混合到 EGFR 19 外显子野生型(H1975)的 DNA 中。按上述 1.5 至 1.7 方法进行 EGFR 19 外显子检测。

## 2 结果

2.1 灵敏度 通过序列分析,EGFR19 外显子缺失突变区为限制性内切酶 Tru1 I 酶切位点。酶切富集联合片段分析法检测 EGFR 19 外显子突变,野生型 PCR 产物片段位于 94bp 左右(图 1)。本方法能检测的最低突变:野生型 DNA 比例为 1:1000(图 2)。

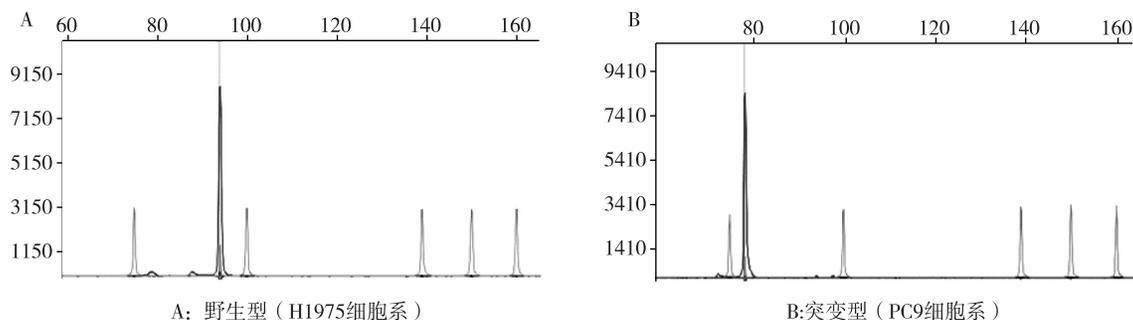


图 1 采用酶切富集联合片段分析法检测 EGFR 19 外显子突变结果

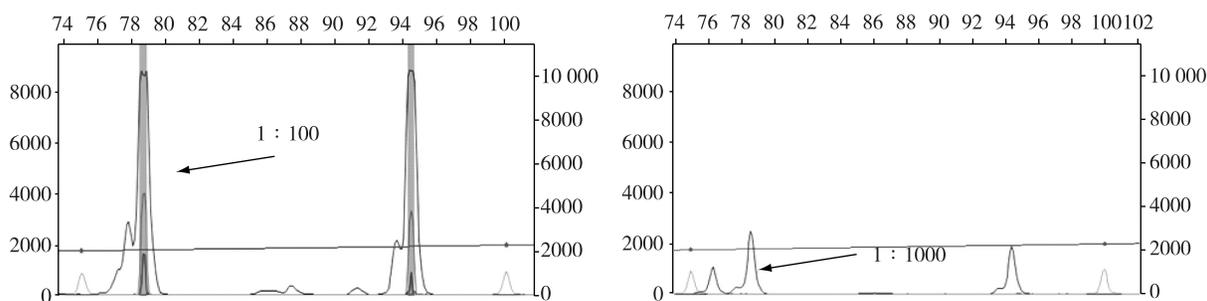


图 2 体外模拟实验检测 EGFR 19 外显子突变灵敏度

2.2 非小细胞肺癌患者血浆 EGFR 19 外显子缺失突变检测 42 例非小细胞肺癌患者的外周血中共检测得缺失突变阳性病例 5 例, 突变检出率为 11.9%, 其中 4 例为 15bp 缺失, 1 例为 24 bp 缺失。

### 3 讨论

EGFR 在细胞信号传导通路中起重要作用, 一旦被激活, 可导致肿瘤细胞内酪氨酸蛋白激酶活化和受体自身磷酸化, 从而促使细胞增生、分化、转移、血管生成及凋亡抑制<sup>[5]</sup>。EGFR 受体抑制剂包括小分子酪氨酸激酶抑制剂和单克隆抗体。EGFR-TKI 能够通过阻断细胞受体的三磷酸腺苷结合位点, 阻止下游信号传递而产生抑制肿瘤作用。大量临床试验亦发现, 不同的患者应用 EGFR-TKI 的疗效差异很大。对未经 EGFR 检测的患者, 使用 EGFR-TKI 的总有效率为 8%~12%; 但 2012 年 EU-RTAC 临床试验结果显示 EGFR 突变患者应用 EGFR-TKI 有效率约为 73.7%, 中位无进展生存时间(PFS)达 10.8 个月, 高于标准化疗组的 5.4 个月<sup>[6]</sup>。因此, 对于 EGFR 突变阳性的非小细胞肺癌患者采用 EGFR-TKI 治疗已经成为标准治疗。然而, EGFR 突变检测则受标本取材困难的限制。临床实践中有相当一部分非小细胞肺癌患者受病灶位置及病理分期因素影响, 难以进行手术治疗而获得病理组织学标本, 而部分病例采用活检虽然能够解决诊断, 但是活检组织量往往难以满足突变检测需求。因此, 本研究外周血检测 EGFR 突变的方法具有较广的临床实用价值。

2009 年, 西班牙加泰罗尼亚大学肿瘤研究所 Rosell 等<sup>[2]</sup>在新英格兰杂志首次报道了血浆/血清 EGFR PNA-PCR 突变检测技术应用于肺癌患者, 并且发现血浆/血清 EGFR 同样也能够用于预测厄洛替尼的疗效。2009 年, 国内王洁教授所在团队采用

变性高效液相色谱(dHPLC)技术检测 230 例进展期非小细胞肺癌患者血浆 EGFR 突变情况, 其突变的敏感性为 3:100(突变型:野生型), 并且在临床标本与组织对比中能够获得较好的突变检出率, 与肺癌 EGFR-TKI 治疗患者预后有关<sup>[3]</sup>。然而, 本研究建立的 EGFR 19 外显子突变检测方法能够检出 1:1000 的突变型 DNA, 且检测了 42 例未经选择的晚期非小细胞肺癌患者血浆, 其 EGFR 突变检出率为 11.9%, 但是对这部分患者 EGFR-TKI 使用情况及临床随访尚在进行中, 有待进一步分析。

血浆 DNA 检测面临如下问题:(1)肿瘤来源的 DNA 与正常组织来源的 DNA 混杂, 突变 DNA 面临大量野生型 DNA 混杂, 因此需要稳定、有效的血浆 DNA 突变技术;(2)由于血浆游离 DNA 较大部分来自于肿瘤细胞的凋亡坏死, 因此血浆 DNA 完整性较差, 片段长度集中在 300bp 以下。本方法采用酶切富集的方法, 设计针对野生型片段的限制性内切酶, 选择性富集突变 DNA, 并采用片段分析的方法进行片段长度判断, 有效进行了 EGFR 19 外显子是否存在缺失突变的评估。检测过程中, 所有 PCR 反应均将产物控制在 300bp 以下旨在提高检出效率。本方法较传统的直接测序法具有较高的灵敏度, 适合血浆等体液标本的检测。较 Scorpins 与 ARMS 技术联合应用(SARMS)-PCR 等基于探针的技术, 本技术只需进行单次检测, 便可覆盖多种不同的缺失突变, 并且片段分析技术能够准确得到缺失片段长度, 相对而言, 检测成本得到控制, 结果可信。因此, 本技术灵敏度高, 检测成本相对低廉, 具有临床进一步应用的潜能。

### 参考文献

- [1] Umetani N, Giuliano AE, Hiramatsu SH, et al. Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum[J]. J Clin Oncol, 2006, 24(26):4270-4276.

- [ 2 ] Rosell R, Moran T, Queralt C, et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer [ J ]. N Engl J Med, 2009, 361(10):958-967.
- [ 3 ] 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.
- [ 4 ] He C, Liu M, Zhou 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.
- [ 5 ] Sibilio M, Kroismayr R, Lichtenberger BM, et al. The epidermal growth factor receptor: from development to tumorigenesis [ J ]. Differentiation, 2007, 75(9):770-787.
- [ 6 ] Rosell R, Carcereny 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 (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial [ J ]. Lancet Oncol, 2012, 13(3):239-246.

收稿日期:2013-09-13; 修回日期:2014-01-12

## 《恶性肿瘤多药耐药的逆转》征订启事

东南大学出版社 2013 年底出版的《恶性肿瘤多药耐药的逆转》是我国著名血液病与肿瘤领域专家陈宝安教授集十余年研究成果主编的专著。陈宝安教授是东南大学附属中大医院血液科主任医师、二级教授、博士生和博士后导师,东南大学医学院肿瘤学系主任,兼任南京市血液学会前主任委员、江苏省血液学会副主任委员、江苏省抗癌协会血液肿瘤专业委员会主任委员和中国临床肿瘤学会(CSCO)执行委员等学术职务。先后承担 5 项国家自然科学基金肿瘤耐药逆转课题。

《恶性肿瘤多药耐药的逆转》全书分为两个部分,总论部分主要概述了目前肿瘤多药耐药研究的最新方向、肿瘤耐药的常用检测方法以及中、西药逆转肿瘤的多药耐药等;各论部分以肿瘤多药耐药的各个机制为出发点,详述了肿瘤多药耐药的具体机制和在这些机制基础上进行的耐药逆转的研究以及相关耐药逆转剂的研究进展。在书的末尾我们还附上了研究所用的肿瘤耐药细胞株,相关肿瘤与血液学 SCI 杂志,近两年国家自然科学基金资助的关于肿瘤耐药研究的项目,肿瘤学相关网站等供对从事肿瘤耐药研究或对相关方面感兴趣的读者参考。本书适合于肿瘤科和血液科医生作为参考书之用,也可作为对肿瘤学及肿瘤多药耐药领域感兴趣的医生及医学生们扩宽知识面的工具。

本书为 16 开本,全书 275 页,尺寸 23.8cm×16.8cm×1.6cm,重量 381g,定价 52 元。若直接到东南大学出版社购买或订购,可享受 7 折优惠。地址:江苏省南京市鼓楼区四牌楼 2 号东南大学出版社发行科,邮编 210096;银行账户:32001594138050000326,中国建行南京分行四牌楼分理处。电话:025-83795801;传真:025-83793652。