

肺腺癌患者肿瘤组织、胸水癌细胞以及胸水 cfDNA 的 EGFR 基因突变状态比较



扫码阅读电子版

蒋娟 李敏 许娟 曹立明 杨华平 邓彭博 安健 胡成平

中南大学湘雅医院呼吸与危重症医学科 国家临床重点专科, 长沙 410008

通信作者: 胡成平, Email:huchengp28@csu.edu.cn

【摘要】 目的 通过检测肺腺癌患者肿瘤组织标本、胸水标本表皮生长因子受体 (EGFR) 基因突变状态, 明确胸水标本能否成为组织标本的替代选择。**方法** 2013 年 9 月至 2015 年 1 月中南大学湘雅医院呼吸与危重症医学科符合入选标准的肺腺癌患者 46 例, 收集患者的胸水游离 DNA (cfDNA)、胸水癌细胞、肿瘤组织标本。采用液相芯片法检测 3 种标本 EGFR 基因突变状态。**结果** 46 例患者胸水 cfDNA 的 EGFR 基因突变率为 43.5% (20/46), 胸水癌细胞 EGFR 基因突变率为 36.1% (13/36), 肿瘤组织样本的 EGFR 基因突变率为 45.7% (21/46)。胸水 cfDNA 与组织标本 EGFR 基因突变一致率为 93.5% (43/46), $\kappa=0.868$ 。胸水细胞与组织标本 EGFR 基因突变一致率为 91.7% (33/36), $\kappa=0.822$ 。**结论** 胸水 cfDNA 标本、胸水细胞标本 EGFR 基因突变状态与配对组织标本一致性好, 当无法获取组织标本时, 胸水标本可作为良好替代。

【关键词】 肺腺癌; 受体, 表皮生长因子; 肿瘤; 胸水; 游离 DNA; 癌细胞

基金项目: 国家自然科学基金 (81873406); 国家重点研发计划 (SQ2016YFSF110276)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-436X.2019.03.001

Comparisons of EGFR mutation status in tumor tissues, pleural effusion cancer cells and cfDNA samples of patients with lung adenocarcinoma

Jiang Juan, Li Min, Xu Juan, Cao Liming, Yang Huaping, Deng Pengbo, An Jian, Hu Chengping

Department of Respiratory and Critical Care Medicine, National Key Clinical Specialty, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China

Corresponding author: Hu Chengping, Email:huchengp28@csu.edu.cn

【Abstract】 Objective To determine whether pleural effusion samples, including cell-free DNA (cfDNA) samples and pleural effusion cancer cells, could be an alternative of tumor tissue samples to test epidermal growth factor receptor (EGFR) gene mutation status. **Methods** A total of 46 patients with lung adenocarcinoma diagnosed in the Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Xiangya Hospital from September 2013 to January 2015 were included in this study. The matched pleural effusion cfDNA samples, cancer cells, tumor tissues samples were collected from these patients. EGFR mutation status in different kinds of samples was determined by liquid-chip platform. **Results** EGFR mutation was identified in 20 out of 46 (43.5%) pleural effusion cfDNA samples, 13 out of 36 (36.1%) pleural effusion cancer cell samples, and 21 out of 46 (45.7%) matched tumor tissues. The overall concordance of the EGFR gene mutation detected in pleural effusion cfDNA samples and tumor tissue samples was 93.5% (43/46, $\kappa=0.868$). The overall concordance of the EGFR gene mutation detected in cancer cell samples and tumor tissue samples was 91.7% (33/36, $\kappa=0.822$). **Conclusions** Pleural effusion cfDNA samples and cancer cell samples have high concordance with matched tumor tissue samples, suggesting that pleural fluid is an alternative for detecting EGFR mutation when the biopsy of tumor tissue is infeasible.

【Key words】 Lung adenocarcinoma; Receptor, epidermal growth factor; Tumor; Pleural

effusion; Cell-free DNA; Cancer cells

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81873406); Key National Development Program of China (SQ2016YFSF110276)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-436X.2019.03.001

2017年美国癌症学会统计数据显示肺癌仍是全世界发病率和病死率排名第一的癌症^[1]。近年来,分子靶向治疗是肺癌治疗的热点,大量多中心临床试验研究结果显示:表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)基因突变阳性的非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者接受EGFR-酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI)治疗,可明显改善患者预后^[2-3]。NCCN指南推荐NSCLC患者检测EGFR基因突变状态,EGFR基因突变阳性患者可选择EGFR-TKI作为一线治疗方案^[4]。

然而,由于多种原因,约有20%患者无法获取肺癌组织标本。因此,寻找非组织标本替代组织标本,检测EGFR基因突变状态,具有重要的临床意义。目前研究的非组织标本主要有:血浆、胸水、心包积液、腹水、痰液、支气管灌洗液等。恶性胸水是肺癌的晚期并发症,8%~15%的肺癌患者可并发恶性胸水,肺腺癌中恶性胸水发生率更高^[5]。恶性胸水肿瘤负荷大,胸水中含较多肿瘤细胞及肿瘤细胞的DNA片段,更能反映肿瘤的异质性。目前,胸水与配对组织样本EGFR基因突变状态比较的研究较少,胸水是否可以作为肿瘤组织的可靠替代样本尚不明确。本研究旨在比较肺腺癌患者中胸水样本与肿瘤组织标本EGFR基因突变情况的一致性,判断胸水是否可以作为组织标本的可靠替代。

1 对象与方法

1.1 研究对象及标本收集 研究对象为2013年9月至2015年1月中南大学湘雅医院呼吸与危重症医学科经病理确诊的肺腺癌患者,一共46例,收集患者配对的胸水、胸水细胞沉渣、肿瘤组织标本。本研究通过中南大学湘雅医院医学伦理委员会批准(CTXY-1100083),患者签署知情同意书。

入组标准:(1)年龄>18岁;(2)患者经组织学或者细胞学病理确诊为原发性肺腺癌;(3)患者经中南大学湘雅医院病理科2名以上医师根据细胞学及免疫组织化学结果确诊为原发性肺腺癌;(4)合并恶性胸腔积液的Ⅳ期(TNM分期,UICC 2009版)肺腺癌患者;(5)未接受过放疗、化疗或者EGFR-TKI治疗。

恶性胸水的判断标准^[6]:(1)患者临床表现,如呼吸困难等;(2)影像学检查,一般中-大量胸水,可见纵隔淋巴结肿大;(3)胸水性状、生化、常规指标;(4)胸水肿瘤标志物,如癌胚抗原等;(5)胸水细胞学病理检查(确诊);(6)胸腔镜胸膜活检病理结果(确诊)。

共收集胸水标本46例,其中胸水细胞沉渣制备成蜡块36例,提取胸水游离DNA(cell-free DNA, cfDNA)46例,组织标本46例(原发灶11例,转移灶35例)。46例胸水cfDNA标本分别与胸水细胞蜡块或组织标本配对。36例患者同时配对胸水cfDNA、胸水细胞蜡块及组织标本3种类型标本。25例患者胸膜标本与胸水cfDNA标本配对。组织标本主要为活检组织,来源于以下几种方式:支气管镜活检6例,CT引导下肺穿刺活检5例,淋巴结切除活检8例,彩色超声引导下胸膜活检2例,胸腔镜下胸膜活检25例。

1.2 检测方法 采用敏感度高的液相芯片法检测胸水cfDNA、胸水癌细胞及肿瘤组织标本EGFR基因突变状态。液相芯片技术又称流式荧光技术、悬浮阵列。检测EGFR基因突变主要经过PCR、纯化、ASPE延伸、杂交及luminex检测读数等过程。所需标本量少,剪感度高,剪特异性强,检测速度快,高通量,操作简单。Zhang等^[7]采用该技术检测了86例晚期NSCLC患者血浆标本及对应的肿瘤组织标本的EGFR、KRAS、BRAF和PI3KCA基因突变情况,结果表明液相芯片技术检测血浆标本和肿瘤组织标本突变情况一致性较高,是预测晚期NSCLC患者接受EGFR-TKI药物治疗疗效的快速、无创伤检测方法。分别计算胸水cfDNA标本、胸水细胞蜡块及组织标本EGFR基因突变率。并计算各类样本的剪感度、剪异度、假阳性率、假阴性率,剪感度=真阳性例数/(真阳性例数+假阴性例数),剪异度=真阴性例数/(真阴性例数+假阳性例数),假阳性率=假阳性例数/(真阴性例数+假阳性例数),假阴性率=假阴性例数/(真阳性例数+假阴性例数)。

1.3 统计学分析 采用SPSS 22.0软件进行统计学分析。采用 χ^2 检验分析胸水cfDNA与组织标本、细胞蜡块与组织标本、胸水cfDNA标本与细

胞蜡块标本两两样本间 EGFR 突变的一致性。通过计算 κ 值来评价一致性水平, $\kappa > 0.75$ 表示一致性水平非常好。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胸水 cfDNA、胸水细胞蜡块及肿瘤组织标本的 EGFR 基因突变情况 如表 1 所示, 肿瘤组织标本 EGFR 基因突变率为 45.7% (21/46), 胸水 cfDNA 标本 EGFR 基因突变率为 43.5% (20/46), 胸水癌细胞的 EGFR 基因突变率为 36.1% (13/36)。

表 1 肿瘤组织标本、胸水癌细胞以及胸水 cfDNA 标本的 EGFR 基因突变状态

标本类型	例数	EGFR 基因突变 [例 (%)]		EGFR 突变率 (%)
		19-del	L858R	
肿瘤组织	46	8(17.4)	13(28.3)	45.7
胸水 cfDNA	46	8(17.4)	12(26.1)	43.5
胸水细胞蜡块	36	6(16.7)	7(19.4)	36.1

注: cfDNA 为游离 DNA; EGFR 为表皮生长因子受体

2.2 肿瘤组织标本的 EGFR 基因突变检测结果

46 例患者组织标本中 EGFR 基因突变 21 例, 其中 19-del 突变 8 例 (17.4%), 21 外显子 L858R 点突变 13 例 (28.3%)。11 例原发灶标本中有 6 例 (54.5%) EGFR 基因突变阳性, 35 例转移灶标本中 15 例 (42.9%) EGFR 基因突变阳性。原发灶与转移灶的 EGFR 突变率差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.461, P = 0.497$)。见表 2。

表 2 肺腺癌原发灶与转移灶组织标本的 EGFR 突变状态

标本	EGFR 基因突变 [例 (%)]		χ^2 值	P 值
	阳性	阴性		
原发灶	6(54.5)	5(45.5)	0.461	0.497
转移灶	15(42.9)	35(57.1)		

注: EGFR 为表皮生长因子受体

2.3 胸水 cfDNA 标本 EGFR 基因检测结果 46 例胸水 cfDNA 标本中 EGFR 基因突变 20 例, 其中 19-del 突变 8 例 (17.4%), 21 外显子 L858R 点突变 12 例 (21.6%)。43 例胸水 cfDNA 标本与组织标本 EGFR 基因突变检测结果相同, 包括 EGFR 突变阳性 19 例, EGFR 阴性 24 例。这 2 类标本间有 3 例患者的配对标本检测结果不一致。其中, 2 例组织标本为阳性 (19-del 突变 1 例, L858R 突变 1 例), 而胸水样本为阴性; 1 例组织标本检测阴性, 而胸水样本检测为 19-del 阳性 (表 3)。此外, 1 例患者的胸水 cfDNA 标本检测结果为同时存在 19-del 和 L858R 点突变, 而组织样本检测仅为 L858R 突变。胸水 cfDNA 标本与组织

标本 EGFR 基因突变状态一致率为 93.5% (43/46), $\kappa = 0.868$, 提示两者一致性较好 ($\chi^2 = 34.73, P = 0.223$)。以组织标本检测作为金标准, 胸水 cfDNA 的 EGFR 基因突变检测敏感度为 90.5%, 特异度为 96.0%, 假阳性率为 4.0%, 假阴性率为 9.5%。

如表 4 所示, 配对的胸水 cfDNA 与胸膜组织标本 25 例, 其中胸水 cfDNA 标本 EGFR 基因突变阳性率为 44.0% (11/25), 胸膜 EGFR 基因突变率为 48.0% (12/25)。24 例患者的胸水 cfDNA 标本与胸膜标本 EGFR 基因突变检测结果一致。1 例患者的配对标本检测结果有差异, 其胸膜标本检测为 19-del 突变阳性, 而胸水 cfDNA 样本为阴性, 胸水 cfDNA 标本与胸膜标本 EGFR 基因突变状态一致率为 96.0% (24/25), $\kappa = 0.920$ ($\chi^2 = 21.28, P = 1.000$)。以胸膜标本作为金标准, 胸水 cfDNA 的 EGFR 基因突变检测敏感度为 91.7%, 特异度为 100.0%, 假阳性率为 0.0%, 假阴性率为 8.3%。

表 3 胸水 cfDNA 与配对肿瘤组织标本的 EGFR 突变状态 [例 (%)]

胸水 cfDNA EGFR 突变	肿瘤组织 EGFR 突变		合计
	阳性	阴性	
阳性	19(90.5)	1(4.0)	20(43.5)
阴性	2(9.5)	24(96.0)	26(56.5)
合计	21(45.7)	25(54.3)	46(100.0)

注: cfDNA 为游离 DNA; EGFR 为表皮生长因子受体; $\chi^2 = 34.730, P = 0.233$

表 4 胸水 cfDNA 与配对胸膜组织标本的 EGFR 突变状态 [例 (%)]

胸水 cfDNA EGFR 突变	胸膜标本 EGFR 突变		合计
	阳性	阴性	
阳性	11(91.7)	0(0.0)	11(44.0)
阴性	1(8.3)	13(100.0)	14(56.0)
合计	12(48.0)	13(52.0)	25(100.0)

注: cfDNA 为游离 DNA; EGFR 为表皮生长因子受体; $\chi^2 = 21.28, P = 1.000$

2.4 胸水细胞蜡块标本 EGFR 基因检测结果 42 例胸水标本离心后包埋制成细胞蜡块, 其中 36 例标本发现腺癌细胞, 6 例蜡块未见癌细胞, 胸水中肿瘤细胞检出率为 85.7% (36/42)。36 例蜡块标本行 EGFR 基因突变检测, 突变阳性率为 36.1% (13/36)。其中 19-del 突变 6 例, 21 外显子 L858R 点突变 7 例。33 例胸水细胞蜡块标本与组织标本 EGFR 基因突变检测结果相同, 包括 EGFR 突变阳性 12 例, EGFR 突变阴性 21 例。2 类标本间有 3 例患者的配对标本检测结果不一致, 其中 2 例患

者的组织标本为突变阳性（2例均为L858R），而胸水细胞蜡块标本为突变阴性；1例患者的组织标本检测阴性，而胸水细胞蜡块标本检测19-del阳性（表5）。且胸水细胞蜡块标本与组织标本EGFR基因突变状态一致率为91.7%（33/36）， $\kappa=0.822$ ，说明两者一致性较好（ $\chi^2=24.432, P=1.000$ ）。以组织标本作为对照，胸水细胞蜡块的EGFR基因突变检测敏感度为85.7%，特异度为95.5%，假阳性率为4.5%，假阴性率为14.3%。

表5 胸水细胞蜡块与配对肿瘤组织标本的EGFR突变状态 [例 (%)]

胸水细胞蜡块 EGFR 突变	肿瘤组织 EGFR 突变		合计
	阳性	阴性	
阳性	12(85.7)	1(4.5)	13(36.1)
阴性	2(14.3)	21(95.5)	23(63.9)
合计	14(38.9)	22(61.1)	36(100.0)

注：EGFR为表皮生长因子受体； $\chi^2=24.432, P=1.000$

34例胸水细胞蜡块标本与胸水cfDNA标本EGFR基因突变检测结果相符，包括EGFR突变阳性13例，EGFR阴性21例。2类标本间有2例配对标本检测结果有差异，2例胸水细胞蜡块标本检测阴性，而胸水cfDNA标本检测阳性，均为L858R突变（表6）。胸水cfDNA标本与胸水细胞蜡块标本EGFR基因突变状态一致率为94.4%（34/36）， $\kappa=0.883$ ，提示两者一致性较好（ $\chi^2=28.487, P=0.500$ ）。

表6 胸水cfDNA标本与配对胸水细胞蜡块标本的EGFR突变状态 [例 (%)]

胸水cfDNA EGFR 突变	胸水细胞蜡块 EGFR 突变		合计
	阳性	阴性	
阳性	13(100.0)	2(8.7)	15(41.7)
阴性	0(0.0)	21(91.3)	21(58.3)
合计	13(36.1)	23(63.9)	36(100.0)

注：cfDNA为游离DNA；EGFR为表皮生长因子受体； $\chi^2=28.487, P=0.500$

3 讨论

随着众多肿瘤驱动基因的发现及大量临床多中心分子靶向药物临床研究结果的公布，靶向药物的治疗优势已经凸显，其中尤以EGFR-TKI的研究较多，临床疗效显著。EGFR基因突变状态可预测EGFR-TKI的临床疗效。NCCN及CSCO指南推荐：NSCLC患者推荐检测EGFR基因突变状态，若EGFR基因突变阳性，可选择EGFR-TKI作为一线治疗方案；若在化疗过程中发现EGFR基因突变阳性可以换用TKI治疗，或完成化疗疗程后口服靶向药物维持治疗，或化疗后随访至病变进展

二线用靶向药物。因此，建议NSCLC患者常规行EGFR基因突变检测，尤其肺腺癌患者。既往研究表明^[8-9]，EGFR基因突变的优势人群为亚裔、不吸烟、女性、腺癌患者，优势人群突变率约为60%^[10]。EGFR基因突变主要集中在腺癌患者，肺鳞癌EGFR基因突变阳性率不到10%。因此，本试验为提高各类标本EGFR基因突变检测的阳性率，均选择肺腺癌患者入组。本研究结果显示患者组织标本EGFR基因突变阳性率为45.7%，突变类型主要是19-del及L858R点突变，与既往研究^[1,11]以及本课题组的研究结果^[12-13]基本一致。

研究显示，肺腺癌患者组织标本EGFR基因突变率为50%左右^[14-16]，胸水癌细胞突变率约为30%左右^[17-18]，胸水cfDNA标本突变率差异较大，介于30%~70%之间^[17-20]。本研究中肿瘤组织、胸水癌细胞及胸水cfDNA标本的EGFR突变阳性率分别为45.7%、36.1%与43.5%。血标本是近年非组织标本的研究热点，血标本与组织标本EGFR基因突变率一致性较好，在无法获取组织标本时，可作为组织标本替代。然而血标本中肿瘤细胞及肿瘤细胞DNA片段浓度低，血浆样本的EGFR基因突变检出率与研究人群的临床特征以及检测方法的敏感度密切相关，其敏感度波动在33%~100%之间，晚期、分化程度低的患者采用敏感度高的检测方法时血浆EGFR基因突变检出率相对较高^[21-23]。相对于血标本，恶性胸水标本具有含较多肿瘤细胞及较高浓度的肿瘤细胞DNA片段的优点。临床上，大约30%~40%胸水标本中不能找到或者无足够数量的肿瘤细胞用于分子检测，而恶性胸水中则含有较多cfDNA片段。因此，本研究直接检测胸水cfDNA标本EGFR突变状态具有重要的参考价值。

胸水cfDNA标本与组织标本EGFR基因突变一致率为93.5%，一致性较好。表明胸水cfDNA标本可以反映患者肿瘤组织的EGFR基因突变状态。在合并恶性胸腔积液且不能获取肿瘤组织标本的肺腺癌患者，可以检测胸水标本的EGFR基因突变状态作为替代。但本研究胸水标本与组织标本EGFR基因突变情况还存在一定差异，分析可能有以下两点原因：（1）由于检测方法的敏感度不可能达到100%，当标本中突变DNA含量低至检测范围以外时，可出现假阴性结果；（2）由于肿瘤组织的异质性，肿瘤组织中同时存在突变阳性及突变阴性肿瘤细胞^[24]，而活检获取的组织标本量少，受肿瘤异质性影响较大，对检测结果产生影响。

本研究中将胸水 cfDNA 标本与组织标本进行比较,结果显示 1 例组织标本阴性,胸水 cfDNA 标本阳性。分析原因:考虑与肿瘤异质性相关,本研究组织标本均为小活检标本,受肿瘤异质性影响可能性大。而恶性胸水是肺癌晚期并发症,胸水标本中含较多肿瘤细胞及 cfDNA 片段,该结果提示:在采用敏感度较高的检测方法时,胸水标本是可靠的 EGFR 基因突变检测标本。

36 例胸水细胞蜡块标本 EGFR 基因突变率为 36.1%,这与既往文献报道基本一致^[17]。胸水细胞蜡块与组织标本 EGFR 基因突变一致率为 91.7%,一致性较好,表明在无法获取组织样本行 EGFR 基因突变检测时,胸水细胞蜡块是组织标本的良好替代。本研究显示胸水 cfDNA 标本 EGFR 基因突变率为 43.5%,高于胸水细胞蜡块,与 Yeo 等^[18]研究结果一致。提示在采用敏感度高的检测方法时,胸水 cfDNA 标本 EGFR 基因突变检测阳性率可能比胸水细胞蜡块更高。

关于原发灶与转移灶突变情况比较,本研究中转移灶(42.9%)与原发灶(54.5%)肿瘤组织 EGFR 基因突变率不一致,但差异无统计学意义。与 Han 等^[25]研究结果一致,原发灶 EGFR 基因突变率为 48.6%,转移灶为 43.2%。但也与某些报道^[26-27]不同。分析原因可能是:(1) 2 种标本不是同一患者配对标本;(2) 由于肿瘤的异质性,原发灶与转移灶突变不一致;(3) 本研究中组织样本为原发灶的患者仅 11 例,而转移灶的患者 35 例,两样本例数差异较大,且例数相对较少,对研究结果造成影响;(4) 本研究转移灶多为胸膜转移灶和淋巴结转移灶,而既往研究转移灶包括骨转移灶、脑转移灶等。

本研究中 1 例患者胸水 cfDNA 标本检测结果同时存在 19-del 和 L858R 点突变,而该患者的组织及细胞蜡块标本仅存在 L858R 突变。既往研究报道^[24],同一患者同一病灶不同部位检测出不同的 EGFR 突变类型。对于同一标本检出 EGFR 双突变,且均为敏感突变的情况很少(不到 1%),相关研究也较少。目前已有 2 项研究^[19,28]表明,19-del 和 L858R 双敏感突变 TKI 疗效较好,与单一敏感突变比较,对 TKI 的敏感度增强,但以上 2 项研究的双突变例数较少,并不能证明双敏感突变 TKI 疗效好于单一敏感突变。本研究中胸水 cfDNA 双突变而组织及蜡块仅单一突变,这可能主要与肿瘤的异质性关系较大,且该例患者组织为胸膜转移灶的小活检标本,受肿瘤异质性影响较

大,最终导致胸水 cfDNA 标本与组织标本 EGFR 基因突变类型不一致。本研究结果提示:与组织标本比较,胸水 cfDNA 标本可能受肿瘤异质性影响相对较小,结果可能更准确,更能反映肿瘤组织的实际突变情况。

本研究中,肺腺癌患者的 EGFR 突变类型主要为 19-del 及 L858R 点突变,其中组织标本中 19-del 突变类型占 17.4%,L858R 突变类型占 28.3%。与既往研究结果^[9]不一致:19-del 突变约占总突变的 55%;21 号外显子多为点突变(主要是 L858R),约占所有突变 40%。本研究中 21 号外显子突变类型所占比例大于 19-del 突变类型,可能存在以下原因:(1) 标本例数较少,影响研究结果;(2) 入组患者为筛选的肺腺癌合并胸水患者,而非随机入组的 NSCLC 患者,可能导致该结果与既往研究不同。

4 结论

胸水 cfDNA 标本、胸水细胞蜡块与肿瘤组织标本 EGFR 基因突变一致性较好。当肿瘤组织样本获取困难时,胸水标本(包括 cfDNA 与胸水细胞)可作为组织样本的替代,行 EGFR 基因突变检测,且胸水 cfDNA 标本更为可靠。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017[J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(1):7-30. DOI:10.3322/caac.21387.
- [2] 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. DOI:10.1056/NEJMoa0810699.
- [3] Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial[J]. Lancet Oncol, 2010, 11(2):121-128. DOI:10.1016/S1470-2045(09)70364-X.
- [4] Ettinger DS, Wood DE, Akerley W, et al. NCCN Guidelines Insights: Non-Small Cell Lung Cancer, Version 4.2016 [J]. J Natl Compr Canc Netw, 2016, 14(3):255-264.
- [5] Jung M, Kim SH, Lee YJ, et al. Prognostic and predictive value of CEA and CYFRA 21-1 levels in advanced non-small cell lung cancer patients treated with gefitinib or erlotinib [J]. Exp Ther Med, 2011, 2(4):685-693. DOI:10.3892/etm.2011.273.
- [6] 胡成平. 2014 恶性胸腔积液诊断和治疗专家共识要点解读 [J]. 中国实用内科杂志, 2014, 34(8):765-766. DOI:10.7504/nk2014070202.
- [7] Zhang H, Liu D, Li S, et al. Comparison of EGFR signaling

- pathway somatic DNA mutations derived from peripheral blood and corresponding tumor tissue of patients with advanced non-small-cell lung cancer using liquidchip technology[J]. *J Mol Diagn*, 2013, 15(6): 819-826. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2013.06.006.
- [8] Pao W, Miller V, Zakowski M, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(36): 13306-13311. DOI: 10.1073/pnas.0405220101.
- [9] 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. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2818.
- [10] Fukuoka M, Wu YL, Thongprasert S, et al. Biomarker analyses and final overall survival results from a phase III, randomized, open-label, first-line study of gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients with advanced non-small-cell lung cancer in Asia (IPASS) [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(21): 2866-2874. DOI: 10.1200/JCO.2010.33.4235.
- [11] Wu JY, Yu CJ, Yang CH, et al. First-or second-line therapy with gefitinib produces equal survival in non-small cell lung cancer[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, 178(8): 847-853. DOI: 10.1164/rccm.200803-389OC.
- [12] 陆蓉莉. EGFR突变与晚期肺腺癌生物学特性及TKIs疗效关系研究[D]. 长沙: 中南大学, 2012.
- [13] 夏宁. EML4-ALK, EGFR, KRAS, c-Met 基因在中国肺腺癌患者中基因状态的临床研究[D]. 长沙: 中南大学, 2012.
- [14] Sugio K, Uramoto H, Ono K, et al. Mutations within the tyrosine kinase domain of EGFR gene specifically occur in lung adenocarcinoma patients with a low exposure of tobacco smoking[J]. *Br J Cancer*, 2006, 94(6): 896-903. DOI: 10.1038/sj.bjc.6603040.
- [15] Zhang X, Chang A. Somatic mutations of the epidermal growth factor receptor and non-small-cell lung cancer[J]. *J Med Genet*, 2007, 44(3): 166-172. DOI: 10.1136/jmg.2006.046102.
- [16] Yokoyama T, Kondo M, Goto Y, et al. EGFR point mutation in non-small cell lung cancer is occasionally accompanied by a second mutation or amplification[J]. *Cancer Sci*, 2006, 97(8): 753-759. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2006.00233.x.
- [17] Akamatsu H, Koh Y, Kenmotsu H, et al. Multiplexed molecular profiling of lung cancer using pleural effusion[J]. *J Thorac Oncol*, 2014, 9(7): 1048-1052. DOI: 10.1097/JTO.000000000000203.
- [18] Yeo CD, Kim JW, Kim KH, et al. Detection and comparison of EGFR mutations in matched tumor tissues, cell blocks, pleural effusions, and sera from patients with NSCLC with malignant pleural effusion, by PNA clamping and direct sequencing[J]. *Lung Cancer*, 2013, 81(2): 207-212. DOI: 10.1016/j.lungcan.2013.04.023.
- [19] Liu Y, Liu B, Li XY, et al. A comparison of ARMS and direct sequencing for EGFR mutation analysis and tyrosine kinase inhibitors treatment prediction in body fluid samples of non-small-cell lung cancer patients [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2011, 30: 111. DOI: 10.1186/1756-9966-30-111.
- [20] Liu X, Lu Y, Zhu G, et al. The diagnostic accuracy of pleural effusion and plasma samples versus tumour tissue for detection of EGFR mutation in patients with advanced non-small cell lung cancer: comparison of methodologies[J]. *J Clin Pathol*, 2013, 66(12): 1065-1069. DOI: 10.1136/jclinpath-2013-201728.
- [21] Taron M, Ichinose Y, Rosell R, et al. Activating mutations in the tyrosine kinase domain of the epidermal growth factor receptor are associated with improved survival in gefitinib-treated chemorefractory lung adenocarcinomas [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(16): 5878-5885. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-2618.
- [22] 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. DOI: 10.1200/JCO.2008.17.3930.
- [23] Goto K, Ichinose Y, Ohe Y, et al. Epidermal growth factor receptor mutation status in circulating free DNA in serum: from IPASS, a phase III study of gefitinib or carboplatin/paclitaxel in non-small cell lung cancer [J]. *J Thorac Oncol*, 2012, 7(1): 115-121. DOI: 10.1097/JTO.0b013e3182307f98.
- [24] Nakano H, Soda H, Takasu M, et al. Heterogeneity of epidermal growth factor receptor mutations within a mixed adenocarcinoma lung nodule [J]. *Lung Cancer*, 2008, 60(1): 136-140. DOI: 10.1016/j.lungcan.2007.08.021.
- [25] Han HS, Eom DW, Kim JH, et al. EGFR mutation status in primary lung adenocarcinomas and corresponding metastatic lesions: discordance in pleural metastases [J]. *Clin Lung Cancer*, 2011, 12(6): 380-386. DOI: 10.1016/j.clc.2011.02.006.
- [26] Monaco SE, Nikiforova MN, Cieply K, et al. A comparison of EGFR and KRAS status in primary lung carcinoma and matched metastases[J]. *Hum Pathol*, 2010, 41(1): 94-102. DOI: 10.1016/j.humpath.2009.06.019.
- [27] Schmid K, Oehl N, Wrba F, et al. EGFR/KRAS/BRAF mutations in primary lung adenocarcinomas and corresponding locoregional lymph node metastases [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(14): 4554-4560. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0089.
- [28] Zhang GC, Lin JY, Wang Z, et al. Epidermal growth factor receptor double activating mutations involving both exons 19 and 21 exist in Chinese non-small cell lung cancer patients [J]. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 2007, 19(7): 499-506. DOI: 10.1016/j.clon.2007.04.006.