

# 非小细胞肺癌患者胸腔积液与外周血 ctDNA 中 EGFR 基因突变检测的对比研究

徐敏 何婉 李岚 朱美琴 陈亦欣 许瑞莲

**【摘要】 目的** 比较晚期非小细胞肺癌 (NSCLC) 患者胸腔积液与外周血循环肿瘤 DNA (ctDNA) 中 EGFR 基因突变间的差异。**方法** 用高通量测序技术同时检测 22 例晚期 NSCLC 患者的胸腔积液 ctDNA 与外周血 ctDNA 的 EGFR 基因突变情况, 以外周血 ctDNA 为金标准, 分析胸腔积液 ctDNA 对 EGFR 基因突变的检测效果。**结果** 以外周血 ctDNA 检出的 EGFR 基因突变结果为金标准, 胸腔积液 ctDNA 中检出 NSCLC 基因突变的灵敏度为 86%~100%, 特异度达 94%~100%, 与外周血 ctDNA 结果的总体符合率为 95%~100%, 且胸腔积液 ctDNA 检测出的突变丰度高于外周血 ctDNA ( $P = 0.002$ )。**结论** 晚期 NSCLC 患者胸腔积液和外周血 ctDNA 中 EGFR 基因突变检测结果一致, 胸腔积液检测丰度较高, 具有良好的临床应用价值。

**【关键词】** 非小细胞肺癌; 高通量基因测序; 循环肿瘤脱氧核糖核酸

**Comparison of EGFR gene mutation detection between pleural effusion and peripheral blood ctDNA in patients with non-small cell lung cancer** Xu Min, He Wan, Li Lan, Zhu Meiqin, Chen Yixin, Xu Ruilian.

Department of Medical Oncology, Shenzhen People's Hospital, the Second Clinical Medical College of Jinan University, Shenzhen Cancer Institute, Shenzhen 518020, China

Corresponding author, Xu Ruilian, E-mail: xuruilian@126.com

**【Abstract】 Objective** To compare the differences in the EGFR gene mutation detection between the pleural effusion and peripheral blood circulating tumor DNA (ctDNA) in patients with advanced-stage non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** The EGFR gene mutation in the pleural effusion and peripheral blood ctDNA of 22 patients with advanced-stage NSCLC were detected by next-generation sequencing (NGS). The ctDNA gene detection in the peripheral blood was considered as the golden standard. The detection effect of EGFR gene mutation upon the pleural effusion ctDNA was evaluated. **Results** The EGFR gene mutation in the peripheral blood ctDNA was considered as the golden standard. The sensitivity of detection of NSCLC gene mutation in pleural effusion ctDNA was 86%-100% and the specificity was 94%-100%. The overall consistent rate with the results of peripheral blood ctDNA was ranged from 95% to 100%. The mutation abundance detected in the pleural effusion ctDNA was significantly higher than that in the peripheral blood ctDNA ( $P = 0.002$ ).

**Conclusions** The outcomes of EGFR gene mutation are consistent between the pleural effusion and peripheral blood of patients with advanced NSCLC. The mutation abundance of the pleural effusion is higher compared with that of the peripheral blood, which is worthy of clinical significance.

**【Key words】** Non-small cell lung cancer; Next-generation sequencing; Circulating tumor DNA

非小细胞肺癌 (NSCLC) 占全部肺癌患者发病率的 80%~85%, 其中约 50% 的患者确诊时已为晚期, 5 年生存率低于 5%。随着分子病理学的发展, 越来越多肺癌驱动基因被发现, 给患者带来了全新的治疗策略。表皮生长因子受体基因 (EGFR)

作为最受关注的肺癌靶标基因, 其突变状态是决定 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂 (EGFR-TKI) 疗效的关键。然而目前临床上大部分 NSCLC 患者在确诊时已为 III B~IV 期, 无法手术, 无法获取肿瘤组织或组织不足造成难以进行分子检测。近年有研究表明, 外

周血循环肿瘤 DNA(ctDNA)所检测的 EGFR 突变与组织 DNA 检测的特异度相似,灵敏度尚待提高<sup>[1-3]</sup>。而 ctDNA 中检出 EGFR 突变阳性者接受 EGFR-TKI 治疗生存期获得延长<sup>[1-2]</sup>。基于此,通过外周血 ctDNA 检测 EGFR 基因突变已获得专家认可,达成共识<sup>[4]</sup>。晚期 NSCLC 患者常伴有恶性胸腔积液(MRE),胸腔积液的采集较为简便、易行,对于无法获取肿瘤组织的患者而言也是一个良好的基因检测替代标本。然而,胸腔积液 ctDNA 与外周血 ctDNA 用于 EGFR 基因检测时何种更精确尚未知。为此,近期笔者通过高通量基因测序亦称下一代测序(NGS)技术检测 22 例晚期 NSCLC 患者胸腔积液 ctDNA 中的 EGFR 基因突变情况,并以外周血 ctDNA 作对照,现报告如下。

## 对象与方法

### 一、研究对象

选取 2014 年 11 月至 2015 年 12 月我院收治的ⅢB~Ⅳ期 NSCLC 合并 MRE(经细胞病理学证实)患者 22 例,所有患者均抽取外周血及胸腔积液标本。其中男 13 例、女 9 例,年龄 35~70 岁、中位年龄 50 岁,腺癌 20 例、鳞癌 2 例。本研究经医院医学伦理委员会批准,所有患者均已经签署知情同意书。

### 二、方 法

#### 1. 采集血样及抽取胸腔积液

清晨在患者空腹状态下抽取肘静脉血 5 ml,立即在室温下以 2 000 转/分离心 10 min,分离血浆和血细胞,小心采集上层血浆,注意避免触及血细胞。临床抽取新鲜胸腔积液样本约 15 ml,同样以 2 000 转/分离心 10 min,弃上清。如细胞量过少,可重复加入胸腔积液后再离心。

#### 2. 血浆和胸腔积液样本 DNA 提取

用 Qiagen DNA 提取试剂盒提取血浆和胸腔积液样本中的 DNA,具体操作参照试剂盒说明书进行。

#### 3. ctDNA 分离

应用薄膜柱吸附试剂盒分别从血浆和胸腔积液中分离 ctDNA:将 DNA 定量后按试剂盒说明书取 20 ng 以上进行 DNA 文库构建,步骤包括:ctDNA 大片段分离、小片段回收、DNA 末端修复和 A 接头连接、在 DNA 的两端加上 Illumina 测序试剂盒的专用接头、依据所需 DNA 片段大小进行磁珠筛选、应用 PCR 法扩增文库用于探针杂交捕获及测

序实验。

#### 4. 生物素标记探针捕获基因

应用杂交富集探针(Geneseeq)对已建好的 DNA 文库进行目标基因靶标富集及扩增,包括:DNA 捕获探针与文库杂交;清洗和回收捕获的文库产物;捕获文库与链霉亲和素磁珠结合;磁珠捕获文库清洗,去除非特异性结合的文库。

#### 5. 高通量基因测序

血浆样本和胸腔积液提取 ctDNA 后送南京世和基因生物技术有限公司进行全基因检测。将捕获后的文库在 Illumina HiSeq 4000 高通量测序平台上样,DNA 在 Illumina 试剂盒 Flow cell 上形成 DNA 簇,测序平台相继通过单碱基合成后暂停、荧光检测、合成恢复的循环完成 DNA 高通量测序。

#### 6. 数据分析

将高通量基因测序结果与中国人种 hg19 基因组数据对比,完成基因 Mapping 工作。同步分析各种基因突变类型,分析生成肿瘤特有突变和种系突变。

### 三、统计学处理

应用 SPSS 20.0 分析数据。以外周血 ctDNA 结果为对照,分析各病例胸腔积液 ctDNA 对 NSCLC 基因突变的诊断效能,计算胸腔积液 ctDNA 诊断 NSCLC 基因突变的灵敏度、特异度及总体符合率。用符号秩和检验对比胸腔积液和血浆 EGFR 基因突变检测丰度。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

### 一、胸腔积液的 EGFR 基因突变情况分析

22 例合并 MRE 的 NSCLC 患者的胸腔积液标本中,12 例检测到 EGFR 基因突变,突变率为 55%(12/22)。12 例 EGFR 基因突变标本包括:5 例(42%)19 号外显子缺失突变,该 5 例中有 1 例同时合并 20 号外显子 T790M 原发耐药突变;6 例(50%)21 号外显子 L858R 点突变;1 例不常见的 A289F 突变。19 号外显子缺失突变和 21 号外显子 L858R 点突变共占总体突变类型的 92%(11/12)。

### 二、外周血的 EGFR 基因突变情况分析

22 例合并 MRE 的 NSCLC 患者的外周血标本中,11 例检测到 EGFR 基因突变,突变率为 50%(11/22)。11 例 EGFR 基因突变的标本包括:5 例(42%)19 号外显子缺失突变,该 5 例中有 1 例同时合并 20 号外显子 T790M 原发耐药突变;5 例(42%)21 号外显子 L858R 点突变;1 例不常见的 A289F 突变。19 号外显子缺失突变和 21 号外显子

L858R 点突变共占总体突变类型的 91% (10/11)。

三、配对样本中胸腔积液和外周血 EGFR 基因突变的一致性及检测丰度的比较

以外周血 ctDNA 检出的基因突变结果为金标准, 胸腔积液 ctDNA 对 NSCLC 基因突变的灵敏度为 86%~100%, 特异度达 94%~100%, 与外周血

ctDNA 结果的总体符合率为 95%~100%, 见表 1。其中, 有 1 例患者外周血 ctDNA 中未检出突变, 但相应胸腔积液 ctDNA 中则检测出 EGFR 21 号外显子 L858R 点突变。而在检测丰度方面, 胸腔积液 ctDNA 检测出的突变丰度高于外周血 ctDNA ( $Z = -3.509, P = 0.002$ )。

突变基因	胸腔积液 + (例)		胸腔积液 - (例)		灵敏度 (%)	特异度 (%)	总体符合率 (%)
	外周血 +	外周血 -	外周血 -	外周血 +			
EGFR 19 号外显子	5	0	17	0	100	100	100
EGFR 20 号外显子	1	0	21	0	100	100	100
EGFR 21 号外显子	5	1	16	0	100	94	95
KRAS	4	0	18	0	100	100	100
TP53	6	0	15	1	86	100	95
ERBB2	2	0	20	0	100	100	100
PIK3CA	2	0	19	0	100	100	100
ALK 基因融合	2	0	20	0	100	100	100
BRAF	1	0	21	0	100	100	100

表 1 NSCLC 患者外周血和胸腔积液 ctDNA 中检测出突变基因的比较

注: KRAS 为鼠肉瘤病毒原癌同源体; TP53 为肿瘤抑制蛋白 P53; ERBB2 为表皮生长因子受体 2; PIK3CA 为磷脂酰肌醇-3-激酶; BRAF 为鼠肉瘤滤过性毒菌致癌同源体 B1

四、其他少见基因的检测结果

在 22 例 NSCLC 患者中, 检测出 2 例 EML4-ALK 基因融合, 2 例 KRAS 基因突变; 每例胸腔积液的检测丰度略高于相应外周血 ctDNA, 但两者比较差异无统计学意义 ( $Z = -1.826, P = 0.068$ )。

讨 论

在目前 NSCLC 的诊治中, 基因分型指导下的个体化治疗对于指导用药至关重要。其中, 针对 EGFR 基因突变的 EGFR-TKI 的应用给 NSCLC 患者带来了巨大的生存获益。但是, 大部分 NSCLC 患者在诊断时均为晚期, 难以获取肿瘤组织。而且, 由于肿瘤的异质性, 根据初诊时的组织标本指导后续的治疗可能存在偏倚。鉴于此, 液体活组织检查(活检)技术在肿瘤分子检测中崭露头角, 体液(主要为外周血, 还有胸腹腔积液、尿液、唾液)中的循环肿瘤细胞(CTC)、ctDNA、外泌体等肿瘤来源的生物标志物, 为肺癌的精准诊断和个体化治疗提供了很大的助力<sup>[5]</sup>。

ctDNA 指恶性肿瘤体细胞 DNA 经脱落或者当细胞凋亡后释放进入循环系统的小片段 DNA, 可以出现与原发肿瘤 DNA 相同特征或基因改变: 如

点突变、超甲基化、微卫星不稳定性(MI)、杂合性缺失(LOH)等多种类型的基因修饰变异<sup>[6]</sup>。前瞻性研究表明, 外周血 ctDNA 与肿瘤组织相比, 其 EGFR 基因突变的检测同样具有较高特异度, 灵敏度有待提高。外周血 ctDNA 检测出 EGFR 突变阳性的患者接受吉非替尼治疗后, 较标准化学治疗的患者客观缓解率明显提高, 无进展生存期明显延长<sup>[1-2]</sup>。因此, 中国 NSCLC 患者 EGFR 基因突变检测专家组认为, 当肿瘤组织难以获取时, 外周血 ctDNA 可作为 EGFR 基因突变检测的合理替代选择, 并写入了 2016 年专家共识<sup>[4]</sup>。

MRE 是晚期 NSCLC 患者常见合并症之一。在肿瘤组织难以获取时, 胸腔积液可以作为细胞学检测的替代。但由于胸腔积液标本易受采集分离等种种因素干扰, 其在 EGFR 基因突变检测效能报道不一。国内禹乐等<sup>[7]</sup>应用实时荧光定量 PCR 的方法检测发现, 同一患者的胸腔积液细胞中提取的 DNA 质量与组织标本相近, 浓度却普遍略低, 但检测的总体 EGFR 突变率相近。赵士伟等<sup>[8]</sup>用 ADx-ARMS 方法检测了胸腔积液和肺癌组织标本的 EGFR 基因突变率, 也发现两者比较差异无统计学意义。

胸腔积液与外周血 ctDNA 在 NSCLC 患者 EGFR 基因突变检测方面孰优孰劣还没有定论。由于循环中存在的 ctDNA 极其微量,对检测技术提出了很高的要求。NGS 一次可以针对几十万至几百万条 DNA 分子进行序列测定,所需的 DNA 样本量极少,适用于 ctDNA 这种微量 DNA 的检测,在肿瘤诊断方面表现出较高的灵敏度和特异性。Couraud 等<sup>[9]</sup>用 NGS 技术检测了 68 例晚期 NSCLC 患者配对肿瘤组织的外周血 ctDNA,结果显示外周血 ctDNA 含量与分期和转移灶数目相关,其相比组织检测的灵敏度为 58%,特异性为 87%。Newman 等<sup>[10]</sup>应用 NGS 技术检测 NSCLC 患者血浆 ctDNA,发现在 II ~ IV 期的患者中,检测灵敏度达 100%,I 期患者的灵敏度为 50%,而各期肺癌患者的特异性均为 96%。NGS 技术从而也被公认为是检测 ctDNA 的“金标准”<sup>[11]</sup>。

本研究通过 NGS 技术检测晚期 NSCLC 患者胸腔积液及配对外周血中的 ctDNA,并进行多基因联合检测以及对比分析,比较两者间的差异。结果发现,以外周血 ctDNA 检出的基因突变结果为金标准,胸腔积液 ctDNA 对 NSCLC 基因突变的灵敏度为 86%~100%,特异性达 94%~100%,与外周血 ctDNA 结果的总体符合率为 95%~100%。其中,有 1 例患者外周血 ctDNA 中未检出突变,但相应胸腔积液 ctDNA 中则检测出 EGFR exon 21 号外显子 L858R 点突变,为应用 EGFR-TKI 提供了良好的依据。在检测耐药突变基因 T790M 方面,两者也达到了一致。而在检测丰度方面,胸腔积液 ctDNA 检测出的突变丰度高于其对应的外周血 ctDNA。究其原因,可能系胸腔积液中脱落出的肿瘤细胞片段 DNA 较释放入血的更多,更易被检测到。

外周血 ctDNA 作为液体活检的重要组成,可以说是一种新型的肿瘤标记物,可实时反映出恶性肿瘤发生、发展过程中基因异常的动态变化,且与组织活检标本相比,具有操作简便、损伤小、患者易接受、可反复取材等优势。本研究显示,用 NGS 技术亦能检测出微量的胸腔积液 ctDNA,与外周血相比,具有相同的检测效能,甚至检测丰度更高,从而为 NSCLC 患者的 EGFR 基因突变检测开辟了新途径。胸腔积液和外周血 ctDNA 的检测及其生物学指标的研究,将有可能为晚期 NSCLC 患者的诊断、预后判定及跟踪随访等提供一系列方便、快捷、特异、无创或微创的分子生物学检测手段。

## 参 考 文 献

- [1] Goto K, Ichinose Y, Ohe Y, Yamamoto N, Negoro S, Nishio K, Itoh Y, Jiang H, Duffield E, McCormack R, Saijo N, Mok T, Fukuoka M. 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 Thorac Oncol*, 2012, 7 (1): 115-121.
- [2] Douillard JY, Ostoros G, Cobo M, Ciuleanu T, Cole R, McWalter G, Walker J, Dearden S, Webster A, Milenkova T, McCormack R. Gefitinib treatment in EGFR mutated caucasian NSCLC: circulating-free tumor DNA as a surrogate for determination of EGFR status. *J Thorac Oncol*, 2014, 9 (9): 1345-1353.
- [3] 徐敏,何婉,李岚,朱美琴,陈亦欣,许瑞莲. 外周血循环肿瘤 DNA 基因突变检测在非小细胞肺癌中的应用价值. *新医学*, 2016, 47 (6): 380-383.
- [4] 中国非小细胞肺癌患者表皮生长因子受体基因突变检测专家组. 中国非小细胞肺癌患者表皮生长因子受体基因突变检测专家共识 (2016 版). *中华病理学杂志*, 2016, 45 (4): 217-220.
- [5] 张梦颖,李敏,胡成平. 液体活检在肺癌精准医疗中的应用. *中华医学杂志*, 2016, 96 (42): 3430-3433.
- [6] Diaz LA Jr, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol*, 2014, 32 (6): 579-586.
- [7] 禹乐,朱启淦,杨立民,温路生,魁国菊,潘羨心,孟加榕. 胸水细胞块 EGFR 基因突变检测在非小细胞肺癌中的临床意义. *山西医科大学学报*, 2017, 48 (5): 462-466.
- [8] 赵士伟,楚慧丽,徐小博,毕经旺. ADx-ARMS 方法检测晚期非小细胞肺癌患者胸水标本癌细胞基因突变的临床意义. *现代肿瘤医学*, 2015, 23 (17): 2446-2448.
- [9] Couraud S, Vaca-Paniagua F, Villar S, Oliver J, Schuster T, Blanché H, Girard N, Trédaniel J, Guilleminault L, Gervais R, Prim N, Vincent M, Margery J, Larivé S, Foucher P, Duvert B, Vallee M, Le Calvez-Kelm F, McKay J, Missy P, Morin F, Zalcman G, Olivier M, Souquet PJ; BioCAST/IFCT-1002 investigators. Noninvasive diagnosis of actionable mutations by deep sequencing of circulating free DNA in lung cancer from never-smokers: a proof-of-concept study from BioCAST/IFCT-1002. *Clin Cancer Res*, 2014, 20 (17): 4613-4624.
- [10] Newman AM, Bratman SV, To J, Wynne JF, Eclow NC, Modlin LA, Liu CL, Neal JW, Wakelee HA, Merritt RE, Shrager JB, Loo BW Jr, Alizadeh AA, Diehn M. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med*, 2014, 20 (5): 548-554.
- [11] Chia PL, Do H, Morey A, Mitchell P, Dobrovic A, John T. Temporal changes of EGFR mutations and T790M levels in tumour and plasma DNA following AZD9291 treatment. *Lung Cancer*, 2016, 98: 29-32.

(收稿日期: 2017-08-01)

(本文编辑: 林燕薇)