

非小细胞肺癌EGFR基因异质性研究进展

郑华 张红梅 史鹤玲 李宝兰

【中图分类号】R734.2

Advances of Heterogeneity of EGFR in Non-small Cell Lung Cancer

Hua ZHENG, Hongmei ZHANG, Heling SHI, Baolan LI

General Department, Beijing Chest Hospital of Capital Medical University, Beijing 101149, China

Corresponding author: Baolan LI, E-mail: libaolan1109@yahoo.com.cn

表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂 (epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors, EGFR-TKIs) 分子靶向治疗的问世使晚期非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 的治疗获得了突破性进展。它以疗效明显、毒副反应轻、口服方便等优点迅速占据了肺癌市场。日本和韩国^[1,2]分别报道了吉非替尼上市前后晚期NSCLC患者生存的回溯性研究, 结果发现吉非替尼上市后患者的生存期较上市前明显延长。研究^[3]发现TKI的疗效与EGFR的突变状态密切相关, EGFR的突变主要发生在外显子18-21, 缺失突变主要发生在外显子19, 最常见的是del E746-A750, 替代突变最常见的是发生在外显子21上的L858R, 这两处突变均为激活突变, 即它们能导致不依赖于配体的EGFR酪氨酸激酶的激活, 约占突变的90%^[4], 另外还有包括外显子20的T790M的耐药突变, 可导致原发或继发TKI耐药^[5]。但是在EGFR基因突变阳性的患者之间TKI (吉非替尼或厄洛替尼) 的疗效却存在很大差异, 最近研究提示这种差异可能与EGFR基因的异质性有关。EGFR突变异质性是一个非常新的概念, 同一病灶的不同部分、同一患者的不同病灶、甚至同一病灶治疗前后EGFR突变状态都可能不一致^[6]。发生EGFR基因异质性的原因可能是肿瘤细胞在转移过程中发生新的突变^[7], 或者在原发灶发生EGFR突变时就已经形成了异质性^[8]。本文旨在对这方面的研究结果进行综述。

1 同一肿瘤组织内EGFR基因异质性

Taniguchi等^[9]对21例具有EGFR突变、术后复发后仅

作者单位: 101149 北京, 首都医科大学附属北京胸科医院综合科 (通讯作者: 李宝兰, E-mail: libaolan1109@yahoo.com.cn)

接受了吉非替尼治疗的NSCLC患者标本进行分析, 利用显微切割技术, 对每一例肿瘤标本选取50个-60个瘤灶进行EGFR基因突变检测。21例患者中15例全部由EGFR突变细胞组成, 但其它6例由部分突变和部分未突变的细胞组成, 其中17例靶向治疗有效 (81%)。6例由部分突变和部分未突变的细胞组成的患者的无疾病进展生存期 (progression free survival, PFS) 和总生存期 (overall survival, OS) 均明显少于全部突变者 ($P=0.009$, $P=0.003$), 表明肿瘤组织内EGFR突变的异质性是影响靶向治疗疗效的重要因素。

Tomonaga等^[10]最近报道了混合型肺腺癌肿瘤组织内的异质性研究。该项研究测定了38例混合型肺腺癌, 每例纤维微切割的样本均由病理学家将其分为乳头状型、腺泡型和肺泡细胞型等亚型。结果在9例组织中检测到肿瘤内EGFR异质性, 而且EGFR突变更常见于肺泡细胞型, 但无统计学差异; EGFR突变肿瘤内异质性与吸烟史有关 ($P<0.043$)。结果提示在腺癌中EGFR的异质性可能与不同类型的细胞组成有关系。

上述研究提示肿瘤组织内部普遍存在EGFR异质性, 而且这种异质性会影响TKI治疗的疗效。

2 同一患者原发灶与转移灶EGFR基因异质性

研究证实原发灶与转移灶之间也存在EGFR基因异质性。Gow等^[11]分析了67例从未接受过TKI的NSCLC配对原发灶和转移灶的EGFR外显子18-21的检测结果。转移灶包括脑、骨、胸膜、皮肤、软组织、淋巴结、消化系统、肺、肾上腺等。用直接测序法, 18例具有原发灶EGFR突变的患者中9例转移灶丢失突变, 26例转移灶

中存在突变的患者中17例原发灶是阴性的。用扩增阻滞突变系统法 (scorpion amplified refractory mutation system, SARMS) 也测定了上述标本。结合两种方法原发灶和转移灶的不一致率为27% (18/67), 提示原发灶与远处转移灶之间存在EGFR基因异质性。

Schmid等^[12]用直接双向测序法测定96例配对的肺腺癌原发灶和局部淋巴结转移灶中EGFR基因外显子18-21突变状态。7例发现EGFR基因突变, 其中1例原发灶和淋巴结转移灶中的EGFR突变是一致的。3例是原发灶有突变而转移灶没有, 另3例是原发灶没有而转移灶有, 不一致率为6.25% (6/96), 结果提示在原发灶与局部转移淋巴结之间也存在EGFR基因异质性。

原发灶与转移灶的异质性也是影响TKI疗效的因素。Sun等^[13]用直接测序法测定80例NSCLC患者的原发灶和区域转移淋巴结中EGFR基因突变。160例标本中21例原发灶和26例转移灶显示EGFR突变。EGFR突变在原发灶和转移灶的不一致率为8.75% (7/80)。结果提示在中国有相当比例的NSCLC患者显示EGFR基因突变在原发灶和转移灶中不一致。其中, 5例纵隔淋巴结具有EGFR敏

感突变的患者接受了吉非替尼新辅助化疗, 3例为外显子19缺失突变, 2例为外显子21错义突变, 结果显示4例对吉非替尼治疗有效, 1例显示进展。有效的4例中原发灶和转移灶均缩小, 追溯原发灶的EGFR突变时发现, 4例均具有EGFR敏感突变, 进展的1例显示原发灶增大和出现胸腔积液, 进一步取原发灶进行基因检测发现原发灶的EGFR为野生型, 提示原发灶和转移灶的EGFR基因异质性是影响TKI疗效的重要因素。

还有很多其它的研究结果 (表1), 不同实验室原发灶与转移灶的EGFR基因突变不一致率存在一定的差异, 可能与患者入选标准不同以及检测方法不同有关, 但是均提示NSCLC中EGFR基因在原发灶和转移灶中确实存在不同程度的异质性。

3 肿瘤组织与血液的EGFR基因异质性

肿瘤组织与血液的DNA EGFR基因突变状态也存在差异。Bai等^[25]利用高压液相色谱法 (denaturing high-performance liquid chromatography, DHPLC) 分析了230例

表1 原发灶与转移灶中EGFR基因突变检测不一致率的比较

Tab 1 Comparison of EGFR mutation between primary and metastatic tumors

Author	No. of specimen	Detection technology ^a	Metastatic tumor ^b	Discordant rate (%)
Gow ^[11]	67	Sequencing SARMS	Br, Bo, Ly, GI, Lu, AG, Pl, Sk, ST	26.9% (18/67)
Schimid ^[12]	96	Sequencing	Ly	6.3% (6/96)
Sun ^[13]	80	Sequencing	Ly	8.8% (7/80)
Kalikakj ^[7]	25	Sequencing	Sk, Lu, TW, Br, AG, Li, Bo	28.0% (7/25)
Matsumoto ^[14]	19	Sequencing	Br	0 (0/6)
Park ^[15]	101	Sequencing Heteroduplex analysis	Ly	11.9% (12/101) 16.8% (17/101)
Gomez-Roca ^[16]	49	IHC	-	32.7% (16/49)
Badalian ^[17]	11	IHC	Bo	54.5% (6/11)
Rao ^[18]	51	IHC	Ly	10.6% (5/47) ^c 19.2% (9/47)
Watzka ^[19]	39	IHC	-	30.8% (12/39)
Italiano ^[20]	30	IHC FISH	AG, Bo, Br, Lu, ST	33.3% (10/30) 26.9% (7/26)
Bozzetti ^[21]	31	FISH	Li, Pl, Ab, Ri, Sk, Ly	32.1% (9/28)
Daniele ^[22]	28	FISH	Br, AG	22.9% (8/35)
Monaco ^[23]	40/366	FISH	Ly, Pl, Br, PF, Li, Bre	32.5% (11/34)
Fang ^[24]	35	Taqman RT-PCR	Ly, Br	31.5% (11/35)

^aIHC: immunohistochemistry; FISH: fluorescence in situ hybridization; ^bAb: abdomen; AG: adrenal gland; Br: Brain; Bre: breast; Bo: bone; GI: gastrointestinal system; Li: liver; Lu: metastatic lung tumor; Ly: lymph node; PF: pleural fluid; Pl: pleura; Ri: ribs; Sk: skin; ST: soft tissue; TW: thoracic wall; ^cClassification method is different between upper row and lower row. Upper row: (-/+ , ++ , +++), Lower row: (-, +/++ , +++).

IIIb期和IV期NSCLC患者血浆DNA样本和对应肿瘤组织的EGFR基因外显子19和21突变。230例标本中79例血浆EGFR突变, 77例肿瘤组织中EGFR突变, 16例血浆DNA突变的患者没有对应原发灶的突变, 14例肿瘤组织EGFR突变的患者血浆DNA未检测到突变, 不一致率为13.0% (30/230)。其中102例患者接受了吉非替尼治疗, 在37例具有血浆EGFR突变的患者中22例 (59.5%) 治疗有效, 而在65例没有血浆EGFR突变的患者中仅15例 (23.1%) 治疗有效 (P=0.002), 而且血浆EGFR突变阳性的患者PFS明显长于没有突变的患者 (P=0.044)。血浆或组织EGFR突变阳性为独立的预后因素 (P=0.001), 说明只要血浆和组织中其一有EGFR突变从TKI治疗中获益的可能性就大。

与Bai等^[25]的研究结果相似, Brevet等^[26]结合了质谱基因分型检测 (mass spectrometry genotyping assay, Sequenom) 和突变富集PCR (mutant-enriched PCR, ME-PCR) 方法检测血浆DNA中EGFR突变, 将31例血浆中DNA的EGFR突变结果与肿瘤组织DNA进行比较。血浆DNA的EGFR突变与原发灶的不一致率为39% (12/31)。厄洛替尼治疗的患者总生存与血浆或肿瘤组织EGFR突变密切相关 (P=0.002), 2例只在血浆DNA中有阳性突变的患者也显示很好的疗效和预后。血浆DNA中EGFR突变对TKI治疗的疗效具有预测价值。

Zhao等^[27]比较了93例肺癌组织和配对血浆样本的EGFR突变状态。其中3例组织和1例血浆在巢式PCR时未获得目标片段。89例配对血浆和组织的EGFR突变一致率为80.9% (72/89)。女性、非鳞癌、晚期患者突变符合率较高, 在这些人群中血浆可代替组织标本进行检测。进一步检测证实对鳞癌、早期患者检测血浆基因突变不是一个明智的选择。

Yung等^[28]测定了35例NSCLC患者靶向治疗前血浆EGFR基因突变, 具有外显子19缺失和L858R突变的分别有6例 (17%) 和9例 (26%)。与肿瘤样本的测序结果相比较, 血浆EGFR突变的敏感性和特异性分别为92%和100%。研究发现血浆突变序列的浓度与临床缓解密切相关, 在部分缓解或完全缓解的患者中可见到浓度降低, 然而在肿瘤进展的患者中可观察到突变持续存在。1例患者在TKI起效后停药, EGFR突变在停药后4周再次出现。

上述研究结果提示, 血浆和组织的EGFR基因突变存在异质性, 也具有很大比例的一致性, 因此血浆EGFR突变状态一定程度上可预测组织的EGFR突变状态, 而且无论血浆或是组织, 只要其一具有突变从TKI治疗中获益

的可能性就大。

4 化疗前后EGFR基因的异质性

这方面的研究较少, 以下两项研究结果提示无论是组织中还是血液中EGFR基因突变状态均会在化疗后发生一定程度的改变。卓明磊等^[29]在2010年CSCO会议上报道新辅助化疗前后NSCLC肿瘤组织EGFR突变状态的变化。取46例化疗前后肿瘤组织标本进行微切割后提取DNA, 采用DHPLC法检测EGFR突变状态。全组患者化疗前EGFR突变率为43.5% (20/46), 化疗后比例降为37% (17/46)。35例患者化疗前后EGFR基因型保持不变 (22例保持野生型, 13例保持突变型), 4例由野生型转为突变, 7例由突变型转为野生。本组患者34例 (78.9%) 达到化疗有效, 而12例 (21.1%) 为疾病稳定。多因素分析结果显示化疗方案、周期数、性别、吸烟和病理类型等因素与EGFR基因型转换无明显相关。

Wang等^[30]研究化疗前后血浆EGFR突变状态的变化。共有253例患者入组, 其中包括203例进展期NSCLC和50例IIIa期NSCLC。血浆样本来源于化疗前 (一线治疗前) 和化疗后 (2个周期化疗后)。EGFR的突变用高压液相色谱法测定。203例患者中化疗前的血浆有36.5% (74/203) 和化疗后29.6% (60/203) 的EGFR突变。其中117例在化疗前后保持了原本的EGFR基因状态 (包括93例野生型和24例突变型), 36例由阴性转为阳性, 50例由阳性转为阴性。同样的趋势在新辅助化疗中也发现, 新辅助化疗前突变率为44% (22/50), 新辅助化疗后为36% (18/50), 突变率有所下降。以上研究结果提示对于化疗失败拟采用靶向治疗的患者, 最好采用即时标本进行EGFR突变检测。

综上所述, NSCLC中EGFR基因突变存在异质性, 不同时间、不同标本、甚至同一标本内都存在EGFR基因突变的异质性, 这是导致TKI治疗疗效存在差异的原因之一, 也提示临床上最好采用即时多点标本的EGFR基因检测结果来指导TKI治疗。

参 考 文 献

- 1 Kim HS, Park K, Jun HJ, et al. Comparison of survival in advanced non-small cell lung cancer patients in the pre- and post-gefitinib eras. *Oncology*, 2009, 76(4): 239-246.
- 2 Takano T, Fukui T, Ohe Y, et al. EGFR mutations predict survival benefit from gefitinib in patients with advanced lung adenocarcinoma: a historical comparison of patients treated before and after gefitinib approval in Japan. *J*

- Clin Oncol, 2008, 26(34): 5589-5595.
- 3 Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, *et al.* Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med*, 2009, 361(10): 947-957.
 - 4 Chan SK, Gullick WJ, Hill ME. Mutations of the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer-search and destroy. *Eur J Cancer*, 2006, 42(1): 17-23.
 - 5 Yatabe Y. *EGFR* mutations and the terminal respiratory unit. *Cancer Metastasis Rev*, 2010, 29(1): 23-36.
 - 6 Thunnissen E. Heterogeneity *EGFR* in lung cancer. WCLC, 2011, Abstract No. M13.4.
 - 7 Kalikaki A, Koutsopoulos A, Trypaki M, *et al.* Comparison of *EGFR* and *K-RAS* gene status between primary tumours and corresponding metastases in NSCLC. *Br J Cancer*, 2008, 99(6): 923-929.
 - 8 Sakurada A, Lara-Guerra H, Liu N, *et al.* Tissue heterogeneity of *EGFR* mutation in lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*, 2008, 3(5): 527-529.
 - 9 Taniguchi K, Okami J, Kodama K, *et al.* Intratumor heterogeneity of epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer and its correlation to the response to gefitinib. *Cancer Sci*, 2008, 99(5): 929-935.
 - 10 Tomonaga N, Nakamura Y, Yamaguchi H, *et al.* Analysis of intra-tumor heterogeneity of *EGFR* mutations in mixed-type lung adenocarcinoma. WCLC, 2011, Abstract No. P1.093.
 - 11 Gow CH, Chang YL, Hsu YC, *et al.* Comparison of epidermal growth factor receptor mutations between primary and corresponding metastatic tumors in tyrosine kinase inhibitor-naive non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*, 2009, 20(4): 696-702.
 - 12 Schmid K, Oehl N, Wrba F, *et al.* *EGFR/KRAS/BRAF* mutations in primary lung adenocarcinomas and corresponding locoregional lymph node metastases. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(14): 4554-4560.
 - 13 Sun L, Zhang Q, Luan H, *et al.* Comparison of *KRAS* and *EGFR* gene status between primary non-small cell lung cancer and local lymph node metastases: implications for clinical practice. *J Exp Clin Cancer Res*, 2011, 30: 30.
 - 14 Matsumoto S, Takahashi K, Iwakawa R, *et al.* Frequent *EGFR* mutations in brain metastases of lung adenocarcinoma. *Int J Cancer*, 2006, 119(6): 1491-1494.
 - 15 Park S, Holmes-Tisch AJ, Cho EY, *et al.* Discordance of molecular biomarkers associated with epidermal growth factor receptor pathway between primary tumors and lymph node metastasis in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*, 2009, 4(7): 809-815.
 - 16 Gomez-Roca C, Raynaud CM, Penault-Llorca F, *et al.* Differential expression of biomarkers in primary non-small cell lung cancer and metastatic sites. *J Thorac Oncol*, 2009, 4(10): 1212-1220.
 - 17 Badalian G, Barbai T, Rásó E, *et al.* Phenotype of bone metastases of non-small cell lung cancer: epidermal growth factor receptor expression and *K-RAS* mutational status. *Pathol Oncol Res*, 2007, 13(2): 99-104.
 - 18 Rao C, Hu Q, Ma J, *et al.* Comparison of the epidermal growth factor receptor protein expression between primary non-small cell lung cancer and paired lymph node metastases: implications for targeted nuclide radiotherapy. *J Exp Clin Cancer Res*, 2010, 29: 7.
 - 19 Watzka SB, Rauscher-Pötsch I, Nierlich P, *et al.* Concordance between epidermal growth factor receptor status in primary non-small-cell lung cancer and metastases: a post-mortem study. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2010, 38(1): 34-37.
 - 20 Italiano A, Vandenbos FB, Otto J, *et al.* Comparison of the epidermal growth factor receptor gene and protein in primary non-small-cell-lung cancer and metastatic sites: implications for treatment with *EGFR*-inhibitors. *Ann Oncol*, 2006, 17(6): 981-985.
 - 21 Bozzetti C, Tiseo M, Lagrasta C, *et al.* Comparison between epidermal growth factor receptor (*EGFR*) gene expression in primary non-small cell lung cancer (NSCLC) and in fine-needle aspirates from distant metastatic sites. *J Thorac Oncol*, 2008, 3(1): 18-22.
 - 22 Daniele L, Cassoni P, Bacillo E, *et al.* Epidermal growth factor receptor gene in primary tumor and metastatic sites from non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*, 2009, 4(6): 684-688.
 - 23 Monaco SE, Nikiforova MN, Cieply K, *et al.* A comparison of *EGFR* and *KRAS* status in primary lung carcinoma and matched metastases. *Hum Pathol*, 2010, 41(1): 94-102.
 - 24 Fang Q, Zhang L, Wang SY, *et al.* Discordance of epidermal growth factor receptor mutations between primary and corresponding metastatic tumors in non-small cell lung cancer. *Chin J Lung Cancer*, 2011, 14(6): 518-522. [方勤, 张亮, 王思愚, 等. 非小细胞肺癌原发灶与相应转移灶之间*EGFR*基因突变状况的不一致性研究. *中国肺癌杂志*, 2011, 14(6): 518-522.]
 - 25 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 IIIB to IV non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 2009, 27(16): 2653-2659.
 - 26 Brevet M, Johnson ML, Azzoli CG, *et al.* Detection of *EGFR* mutations in plasma DNA from lung cancer patients by mass spectrometry genotyping is predictive of tumor *EGFR* status and response to *EGFR* inhibitors. *Lung Cancer*, 2011, 73(1): 96-102.
 - 27 Zhao X, Wang M. *EGFR* mutation status in paired plasma and tissue samples of 93 NSCLC patients from China. WCLC, 2011, Abstract No. MO22.13
 - 28 Yung TK, Chan KC, Mok TS, *et al.* Single-molecule detection of epidermal growth factor receptor mutations in plasma by microfluidics digital PCR in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(6): 2076-2084.
 - 29 Zhuo ML, Bai H, An TT, *et al.* Effect of new adjuvant chemotherapy on *EGFR* mutation status in Chinese non-small cell lung cancer patients. CSCO, 2010, Abstract No: BII043. [卓明磊, 白桦, 安彤彤, 等. 非小细胞肺癌患者*EGFR*突变状态在新辅助化疗前后的变化. CSCO, 2010, Abstract No: BII043.]
 - 30 Wang J, Bai H, Zhao J, *et al.* Effect of chemotherapy on *EGFR* mutation status in Chinese non-small cell lung cancer patients. ASCO, 2010, Annual Meeting Abstract No: e18031.

(收稿: 2011-07-01 修回: 2011-07-20)

(本文编辑 孙丹)