

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*

510120 广州 呼吸疾病国家临床医学研究中心 广州呼吸疾病研究所
张洁霞, 李时悦, 占扬清, 欧阳铭¹

【摘要】 目的 探讨中国非小细胞肺癌(NSCLC)患者中 K-Ras 和表皮生长因子受体(EGFR)基因突变情况及其与临床病理特征的关系。方法 回顾性分析 2011 年 7 月至 2013 年 8 月广州医科大学附属第一医院收治的 381 例 NSCLC 患者的临床病理特征,并应用扩增突变阻滞系统(ARMS)检测其癌组织中 EGFR 基因 18、19、20、21 外显子共 21 个点突变和 K-Ras 基因 12、13 密码子共 6 个点突变,分析其突变情况及与临床病理特征的相关性。结果 21 例(5.5%)存在 K-Ras 基因突变,其中 20 例 12 密码子,1 例 13 密码子 Asp 突变;146 例(38.3%)存在 EGFR 突变,其中 4 例 18 外显子突变(G719S),52 例 19 号外显子序列缺失突变,3 例 20 外显子序列缺失突变,85 例 21 外显子突变(81 例 L858R,4 例 L861Q),2 例双突变。男性患者 K-Ras 基因突变率高于女性患者,差异有统计学意义(6.8% vs. 2.5%, $P=0.018$)。EGFR 基因突变与性别、吸烟史、临床分期、全身转移、病理类型均有关($P<0.05$)。二分类 Logistic 回归分析显示,病理类型和性别与 EGFR 基因突变密切相关。结论 中国 NSCLC 患者中 EGFR 突变常见,该突变与腺癌有关;K-Ras 基因突变率较低,多见于男性,其他相关因素尚需进一步研究。

【关键词】 非小细胞肺癌(NSCLC); K-Ras; 表皮生长因子受体(EGFR); 突变

中图分类号:R734.2 文献标识码:A 文章编号:1009-0460(2014)09-0799-05

Relationship between the mutations of K-Ras and EGFR gene and the clinicopathological features of non-small cell lung cancer

ZHANG Jiexia, LI Shiyue, ZHAN Yangqing, OUYANG Ming. National Clinical Research Center for Respiratory Disease, Guangzhou Institute of Respiratory Disease, Guangzhou 510120, China

Corresponding author: OUYANG Ming, E-mail: ouyang1135@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between the mutations of K-Ras and epidermal growth factor receptor (EGFR) gene and K-Ras gene and clinicopathological features in Chinese patients with non-small cell lung cancer(NSCLC). **Methods** From July 2011 to August 2013, 381 cases of NSCLC patients with both EGFR and K-Ras mutations tested in the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University were retrospectively enrolled in the study. All pathological specimens were tested for twenty-one mutations in EGFR 18-21 exon and six mutations in K-Ras 12, 13 codon by amplification refractory mutation system(ARMS). The clinicopathological features of patients were analyzed according to the mutation status of EGFR and K-Ras. **Results** Gene mutation of K-Ras was tested in 21 cases, including 20 cases 12 codon mutation and 1 case 13 codon mutation. Gene mutation of EGFR was tested in 146 cases, including 4 cases of 18 exon G719S mutation, 52 cases of 19 exon deletion mutation, 3 cases of 20 exon deletion mutation, 85 cases of 21 exon mutation (81 cases of L858R and 4 cases of L861Q) and two dual gene mutation. K-Ras mutation was more frequently happened in male patients than in female patients (6.8% vs. 2.5%, $P=0.018$). EGFR mutations were related with gender, smoking history, TNM stage, systemic metastases and pathological type($P<0.05$). Binary Logistic regression shown that pathological type and gender were closely related to EGFR mutation($P<0.05$). **Conclusion** EGFR mutation was common in Chinese patients with NSCLC, and was related to adenocarcinoma. However, K-Ras mutation was rare and more commonly happened in male patients with NSCLC. More studies should be conducted to investigate the relationship between clinical features and EGFR and K-Ras mutation.

【Key Words】 Non-small cell lung cancer(NSCLC); K-Ras; Epidermal growth factor receptor(EGFR); Mutation

* 基金项目:广东省科技计划资助项目(2011B031800288)

¹ 通讯作者 E-mail: ouyang1135@126.com

肺癌是世界上常见恶性肿瘤之一,其中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占肺癌的80%~85%^[1],晚期NSCLC患者的5年生存率仅约15%。随着对肿瘤发病机制及其生物学行为研究的不断深入,近几年以表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, EGFR-TKIs)为代表的分子靶向治疗研究日益增多,疗效及不良反应均较传统的放化疗明显改善,因此人们越来越多将治疗的焦点集中于特异性高、不良反应轻的分子靶向药物。EGFR突变已被临床确立为评估TKIs治疗敏感性的有效预测指标^[2]。亚裔、女性、腺癌及不吸烟患者的EGFR突变率明显高于其他亚组患者,其对TKIs的反应率也相应较高。不同于EGFR, K-Ras基因突变的NSCLC患者对EGFR-TKIs的应答效果较差^[2-3]。此外, K-Ras基因突变可作为NSCLC无进展生存期重要的不良预后因子^[4]。但是,到目前为止,关于EGFR和K-Ras的关系,二者的突变率及其与临床病理特征的相关性等,尚缺乏临床数据。本研究同时检测了381例NSCLC患者的EGFR和K-Ras突变情况,并对EGFR和K-Ras突变情况与临床病理特征的相关性进行分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集2011年7月至2013年8月广州医科大学附属第一医院进行手术的NSCLC患者381例,中位年龄63岁(54~70岁)。男性264例,女性117例;有吸烟史者128例;淋巴结转移者34例;全身转移的患者131例。肺切除标本201例、肺外手术切除标本17例、淋巴结活检标本16例、经皮肺穿刺活检标本77例、支气管镜肺活检标本46例、经支气管镜超声淋巴结活检标本8例、胸水沉渣标本16例,备行K-Ras和EGFR基因突变检测。所有标本均经病理科医师复习阅片后制备石蜡组织切片。按照2011年国际肺癌研究学会、美国胸科学会和欧洲呼吸学会公布的肺腺癌国际多学科分类方案,对行肺切除手术的腺癌患者,进一步分析腺癌的主要病理亚型,并判断是否伴有脏层胸膜浸润及淋巴管内癌栓形成。

1.2 方法 切片常规脱蜡,再水化、收集。使用厦门艾德生物医药科技有限公司生产的ADx-ARMS™ EGFR和K-Ras基因突变试剂盒(Adx)根据试剂盒说明书检测EGFR基因第18、19、20和21外显子共

21个位点的突变及K-Ras基因第12、13位密码子共6个点突变。DNA提取按说明书进行,提取的DNA样品于NanoDrop ND2000微量紫外分光光度计检测DNA浓度和吸光值(A),确保 $A_{260/280}$ 在1.8~2.0之间,不符合标准的DNA样品进行重新提取。PCR反应条件:95℃5min,1个循环;第2阶段:95℃25s,64℃20s,72℃20s,15个循环;第3阶段:93℃25s,60℃35s,72℃20s,15个循环。信号收集:第3阶段60℃收集FAM和HE_x信号,执行实时PCR,约90min完成检测。突变结果确定:首先确定样品管各自的突变Ct值(FAM信号),然后确定样品的外控Ct值(FAM信号), ΔCt 值=突变Ct值-外控Ct值。根据不同突变Ct值和 ΔCt ,把样品检测结果分为阴性、弱阳性及强阳性。弱阳性及强阳性均判读为有突变,阴性为无突变。

1.3 统计学分析 应用SPSS 13.0统计学软件进行处理。用 χ^2 检验或Fisher精确概率法比较不同性别、吸烟史、临床TNM分期、组织学类型、淋巴结和全身转移等亚组患者中K-Ras和EGFR基因突变率的差异;用二分类Logistic回归分析与K-Ras或EGFR基因突变相关的因素。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 K-Ras和EGFR基因突变状况 21例患者存在K-Ras基因突变,突变率为5.5%。其中13例12密码子Cys突变,3例为12密码子Ala突变,2例12密码子Asp突变,2例12密码子Val突变,1例13密码子Asp突变。146例患者存在EGFR基因突变,突变率为38.3%。其中4例18外显子突变(G719S),52例19号外显子序列缺失突变,3例20外显子序列缺失突变,85例21外显子突变(81例L858R,4例L861Q),2例双突变(1例19号外显子序列缺失突变和20号外显子序列插入突变,1例19号外显子序列缺失突变和20号外显子T790M突变)。无1例患者同时发生EGFR和K-Ras突变。

2.2 K-Ras和EGFR基因突变与临床分期、转移部位的关系 21例K-Ras基因突变患者中,IV期患者最多,其次为IB期和IIIA期,不同分期之间的差异无统计学意义($P > 0.05$)。146例EGFR基因突变患者中,IV期患者最多,其次为IB期和IA期,不同分期之间的差异有统计学意义($P = 0.038$)。在131例发生全身转移的患者中,7例K-Ras基因突

变 其中以肺转移最常见; 59 例 EGFR 基因突变 转移部位以肺、骨、胸膜最常见。见表 1。

表 1 K-Ras 和 EGFR 基因突变与临床分期和全身转移的关系 [例(%)]

因素	n	K-Ras 突变	EGFR 突变
临床分期			
I A	46	2(9. 5)	18(12. 3)
I B	67	5(23. 8)	31(21. 2)
II A	18	1(4. 8)	8(5. 5)
II B	29	1(4. 8)	7(4. 8)
III A	57	4(19. 0)	14(9. 6)
III B	33	1(4. 8)	9(6. 2)
IV	131	7(33. 3)	59(40. 4)
转移部位			
脑	21	1(14. 3)	10(16. 9)
骨	52	3(42. 9)	24(40. 7)
肝	19	1(14. 3)	8(13. 6)
肾上腺	9	1(14. 3)	2(3. 4)
肺	44	5(71. 4)	24(40. 7)
胸膜	51	1(14. 3)	22(37. 3)
其他	17	0(0)	5(8. 5)

2. 3 K-Ras 和 EGFR 基因突变与病理类型的关系

腺癌患者 K-Ras 基因突变率高于非腺癌, 但差异无统计学意义($P = 0. 073$)。浸润性腺癌中以腺泡为主型的 EGFR 突变率高于其他类型, 差异有统计学意义($P < 0. 05$)。见表 2。

2. 4 K-Ras 和 EGFR 基因突变与年龄、性别和吸烟的关系

21 例 K-Ras 基因突变患者中男性 18 例, 女性 3 例; 年龄为($64. 8 \pm 9. 6$) 岁; 有长期吸烟史者 11 例。其中男性 K-Ras 基因突变率明显高于女性, 差异有统计学意义($6. 8\% \text{ vs. } 2. 5\% \text{ } P = 0. 018$); 吸烟者 K-Ras 基因突变率高于无吸烟者, 但差异无统计学意义($8. 6\% \text{ vs. } 4. 0\% \text{ } P = 0. 061$)。146 例 EGFR 基因突变患者中男性 83 例, 女性 63 例; 年龄

表 2 K-Ras 和 EGFR 基因突变与病理类型的关系

变量	n	K-Ras 突变	EGFR 突变
病理类型			
腺癌	281	19(90. 5)	137(93. 8) *
鳞癌	54	0(0)	2(1. 4)
大细胞癌	13	0(0)	1(0. 7)
腺鳞癌	11	1(4. 8)	5(3. 4)
其他类型癌	22	1(4. 8)	1(0. 7)
肺腺癌手术标本病理			
浸润脏层胸膜	59	6(50. 0)	28(38. 9)
淋巴管浸润	36	1(8. 3)	21(29. 2)
原位腺癌	4	0(0)	2(2. 8)
微浸润腺癌	1	0(0)	0(0)
浸润性腺癌			
贴壁为主型	15	2(16. 7)	9(12. 5)
腺泡为主型	63	4(32. 3)	41(56. 9) *
乳头为主型	14	2(16. 7)	5(6. 9)
微乳头为主型	4	0(0)	2(2. 8)
实体为主型伴黏液产生	15	2(16. 7)	4(5. 6)
浸润性腺癌变异型			
浸润性黏液腺癌	5	0(0)	1(1. 4)
未定型	23	2(16. 7)	8(11. 1)

注: * $P < 0. 05$

为($61. 3 \pm 10. 8$) 岁; 有长期吸烟史者 30 例。其中女性、无吸烟者 EGFR 基因突变率分别为 53. 8%、45. 8% , 均分别高于男性和吸烟者的 31. 4%、23. 4% , 差异有统计学意义($P < 0. 001$)。

2. 5 K-Ras 和 EGFR 基因突变的多因素分析

将性别(男、女)、年龄(≤ 65 岁、 > 65 岁)、吸烟与否、病理类型(腺癌、非腺癌) 等因素纳入二分类 Logistic 回归分析模型中, 结果显示腺癌、性别与 EGFR 基因突变密切相关(表 3)。而 K-Ras 基因突变则与任何变量均无关。

表 3 影响 EGFR 基因突变的二分类 Logistic 回归分析

变量	B	RR(95% CI)	P
病理类型(腺癌 vs. 非腺癌)	0. 369	9. 620(4. 665 ~ 19. 836)	< 0. 001
性别(女性 vs. 男性)	0. 242	2. 037(1. 269 ~ 3. 270)	0. 003
年龄(≤ 65 岁 vs. > 65 岁)	0. 240	1. 219(0. 761 ~ 1. 953)	0. 409
吸烟(否 vs. 是)	0. 287	0. 617(0. 352 ~ 1. 084)	0. 617

3 讨论

NSCLC 确诊时约 85% 以上的患者失去了行根治性手术治疗的机会,因此化疗在中晚期 NSCLC 治疗中占据主要地位,但一线含铂的两药化疗方案仅使患者获得 8~11 个月的中位生存期,疗效非常有限。临床试验结果表明 EGFR-TKIs 具有生物利用度高、选择性强、耐受性好、不良反应轻微等优点,且具有显著的抗肿瘤活性^[2],因此 EGFR-TKIs 已作为一线药物用于治疗 EGFR 突变阳性的 NSCLC。K-Ras 基因是 EGFR 下游的关键调节分子,但 K-Ras 基因突变与 NSCLC 患者对 EGFR-TKIs 治疗的原发耐药有关^[3]。Raponi 等^[5]报道 NSCLC 中 K-Ras 基因突变对 EGFR-TKIs 治疗有效的阴性预测值为 97%,因此 K-Ras 基因突变可用于排除 NSCLC 患者的 EGFR-TKIs 治疗,在高 K-Ras 突变的人群中,K-Ras 基因突变可作为行 EGFR-TKIs 治疗前的常规检测指标。

本研究中,EGFR 突变率为 38.3%,共检测到 6 种突变,其中以 21 外显子 L858R 突变最常见,比例超过 50%,其次为 19 外显子缺失突变,其他的突变类型比例不足 10%,且发现 2 例双突变。本研究中 EGFR 突变率要明显高于欧洲(24%)^[6]的相关研究,稍高于 Kim 等^[7]报道的韩国 EGFR 突变率(35%),与国内其他机构的研究结果类似^[8]。据国内文献报道,EGFR 基因突变存在显著的地域差异,如台湾地区的 EGFR 基因突变以外显子 21 为主,广东地区以外显子 19 为主,而北京地区二者之间无明显差异^[9-11]。我们的研究结果则不同,可能因为本研究中的病例部分来源于外省所致。但各地区 EGFR 突变类型是否与种族特征及致癌因素如吸烟、雾霾、油烟等有关,值得深入研究。本研究中 EGFR 突变位点基本均为敏感性突变位点,仅 1 例含有耐药突变(20 号外显子 T790M 突变),且该病例为双突变患者,与 EGFR-TKIs 在亚裔人群中有较高有效率是一致的。而本研究中 K-Ras 突变集中于 12 密码子,仅 1 例位于 13 密码子,与国内研究^[8]及韩国的研究(8%)^[12]类似,明显低于欧洲和美国的 K-Ras 突变率^[16]。在本研究中,未发现同 1 例患者出现 EGFR 与 K-Ras 两种突变,与它们的分子生物学特征一致。EGFR 与 K-Ras 突变的总阳性率接近 45%,与国外的报道类似,提示在肺癌的发病机制中,除 EGFR 通路外,尚存在其他的突变机制有待深

入研究,如 HER-2、ALK 和 ROS1 突变等。

本研究分析了 NSCLC 及行肺切除手术且病理为腺癌患者的 EGFR 突变与临床病理特征之间的关系后发现,腺癌,尤其腺泡状为主型腺癌较其他类型 NSCLC 患者的突变率更高,这与刘标等^[13]的报道不同,后者研究显示 EGFR 突变最常见于贴壁为主型、乳头为主型和微乳头为主型腺癌。而在综合年龄、性别、吸烟史、腺癌等危险因素进行二分类多因素 Logistic 回归分析后发现,除腺癌外,仅发现性别是影响 EGFR 突变的临床因素,女性患者的 EGFR 突变率更高,差异有显著统计学意义,这与既往的研究结果相符^[14],但未发现吸烟是危险因素。进一步使用 Logistic 回归分析行肺癌肺切除手术且病理为腺癌患者 EGFR 与性别、年龄、吸烟史、腺癌类型、胸膜浸润、淋巴管内癌栓形成的关系,发现仅腺泡癌与 EGFR 突变有关,但女性、吸烟未能发现与 EGFR 突变相关。综合以上考虑未能明确的原因可能为进行回归分析的临床因素的数量太少,或者因为女性虽未主动吸烟,但普遍存在被动吸烟,因此吸烟不是主要的危险因素。据此,我们推测女性、非吸烟的 NSCLC 患者 EGFR 高突变率,可能与女性的生活方式如接触油烟等有关,性别本身可能尚不是最主要的影响因素。而女性虽然吸烟率低,但均不同程度存在被动吸烟,因此吸烟亦不是最主要的影响因素,尚需要纳入更多的临床危险因素进行分析。

另外,本研究发现女性 K-Ras 突变高发未能被多因素 Logistic 回归分析证实,其他临床危险因素及病理特征与 K-Ras 的相关性均无统计学意义。分析原因可能为本研究中 K-Ras 突变患者仅 21 例,病例数太少。在其他的研究中^[15],同样未能发现 K-Ras 突变与临床危险因素及病理特征的相关性。综合考虑是由于中国整体人群 K-Ras 突变率较低,尚需要扩大病例数、增加危险因素等进行深入研究。

综上所述,EGFR 突变在国内 NSCLC 人群中远较欧美常见,与腺癌、尤其腺泡为主型腺癌相关;而 K-Ras 突变少见,二者不同时出现于 1 例患者,但 K-Ras 突变的相关因素不明,尚需要积累大样本数据进一步分析国人肺癌群体中 EGFR 和 K-Ras 突变与临床病理特征之间的相关性,以合理应用 EGFR-TKIs。

参考文献

- [1] Molina JR, Yang P, Cassivi SD, et al. Non-small cell lung

- cancer: epidemiology , risk factors , treatment , and survivorship [J]. *Mayo Clin Proc* 2008 83(5) : 584 - 594.
- [2] Tiseo M , Rossi G , Capelletti M , et al. Predictors of gefitinib outcomes in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) : Study of a comprehensive panel of molecular markers [J]. *Lung Cancer* , 2010 , 67(3) : 355 - 360.
- [3] Martin PI , Leighl NB , Tsao MS , et al. KRAS mutations as prognostic and predictive markers in non-small cell lung cancer [J]. *J Thorac Oncol* 2013 8(5) : 530 - 542.
- [4] Guan JL , Zhong WZ , An SJ , et al. KRAS mutation in patients with lung cancer: a predictor for poor prognosis but not for EGFR-TKIs or chemotherapy [J]. *Ann Surg Oncol* , 2013 , 20(4) : 1381 - 1388.
- [5] Raponi M , Winkler H , Dracopoli NC. KRAS mutations predict response to EGFR inhibitors [J]. *Curr Opin Pharmacol* , 2008 8(4) : 413 - 418.
- [6] Lindeman NI , Cagle PT , Beasley MB , et al. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists , International Association for the Study of Lung Cancer , and Association for Molecular Pathology [J]. *J Thorac Oncol* , 2013 8: 823 - 859.
- [7] Kim WS , Choi YD , Seo JW , et al. Epidermal growth factor receptor mutation analysis of non-small cell lung cancer in South Korea: summary from a nationwide survey [J]. *J Lung Cancer* , 2010 9(Suppl 2) : 38.
- [8] 孙蕾娜 栾焕玲 臧凤琳 , 等. 中国人非小细胞肺癌 EGFR 和 KRAS 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.
- [9] Huang SF , Liu HP , Li LH , et al. High frequency of epidermal growth factor receptor mutations with complex patterns in non-small cell lung cancers related to gefitinib responsiveness in Taiwan [J]. *Clin Cancer Res* , 2004 , 10(24) : 8195 - 8203.
- [10] 陈慧娟 喻长顺 李洪波 , 等. 广东地区非小细胞肺癌 EGFR 基因的突变研究 [J]. *分子诊断与治疗杂志* , 2011 , 3(1) : 29 - 32.
- [11] 冯 勤 李向红 陈 钊 , 等. 非小细胞肺癌表皮生长因子受体基因突变检测及其与临床病理特征的相关性 [J]. *中华病理学杂志* 2011 , 10: 660 - 663.
- [12] Sun JM , Hwang DW , Ahn JS , et al. Prognostic and predictive value of KRAS mutations in advanced non-small cell lung cancer [J/OL]. *PLoS One* , 2013 [2013-09-10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3665805/>.
- [13] 刘 标 时姗姗 王 璇 , 等. 2011 年肺腺癌新分类在评估组织学类型与分子学改变相关性中的意义 [J]. *中华病理学杂志* 2012 41(8) : 505 - 510.
- [14] Shigematsu H , Gazdar AF. Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers [J]. *Int J Cancer* 2006 118(2) : 257 - 262.
- [15] Riely GJ , Kris MG , Rosenbaum D , et al. Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma [J]. *Clin Cancer Res* , 2008 , 14(18) : 5731 - 5734.
- [16] 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.

收稿日期: 2014 - 04 - 26; 修回日期: 2014 - 07 - 10