

· 基础研究 ·

高通量测序技术检测非小细胞肺癌相关驱动基因的突变

严晓娣¹, 史国振², 毛旭华^{3*}

¹南通大学附属医院肿瘤放疗科, 江苏 南通 226001; ²江苏大学附属宜兴医院心胸外科, ³检验科, 江苏 无锡 214200

[摘要] 目的:探讨高通量测序技术在非小细胞肺癌驱动基因检测中的应用。方法:应用 Ion Torrent 高通量测序平台,检测 150 例非小细胞肺癌(non-small-cell lung cancer, NSCLC)患者 EGFR、KRAS、BRAF、NRAS、Her-2 和 PIK3CA 基因突变,并利用 Sanger 测序法和微滴式数字 PCR(droplet digital PCR, ddPCR)法检测 150 例 NSCLC 患者 EGFR 基因突变,对结果进行对比分析。结果:EGFR、KRAS、BRAF、NRAS、Her-2 和 PIK3CA 基因突变检出率分别为 51.33%(77/150)、7.33%(11/150)、1.33%(2/150)、1.33%(2/150)、2.00%(3/150)和 4.67%(7/150)。57 例标本未检出任何基因突变,84 例标本检出单个驱动基因发生突变。9 例标本检出 2 个及以上驱动基因发生突变。Sanger 测序法检测 EGFR 基因突变,突变检出率为 38.67%(58/150),与高通量测序法比较,差异有统计学意义($\chi^2=4.862, P=0.027$),高通量测序法的灵敏度为 98.28%,特异度为 78.26%。ddPCR 法突变检出率为 50.00%(75/150),与高通量测序法比较,差异无统计学意义($\chi^2=0.053, P=0.818$),阳性一致率为 82.67%,阴性一致率为 80.00%,总一致率为 81.33%。结论:高通量测序法更适合应用于 NSCLC 诊疗,Sanger 测序法和 ddPCR 法可作为有益的补充。

[关键词] 非小细胞肺癌;驱动基因突变;高通量测序;Sanger 测序;微滴式数字 PCR

[中图分类号] R734.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2021)02-193-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20210207

High-throughput sequencing of driver gene mutations in non-small cell lung cancer

YAN Xiaodi¹, SHI Guozhen², MAO Xuhua^{3*}

¹Department of Tumor Radiotherapy, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001; ²Department of Cardiothoracic Surger, ³Department of Laboratory, Affiliated Yixing People's Hospital of Jiangsu University, Wuxi 214200, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to investigate the value of detecting driver gene mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients using next-generation sequencing (NGS) technology. **Methods:** Somatic mutations in 150 NSCLC patients including EGFR, KRAS, BRAF, NRAS, Her-2 and PIK3CA were detected by Ion torrent personal genome machine (PGM). Sanger sequencing and ddPCR was used to test and verify the results of EGFR gene mutations. **Results:** According to NGS results, mutations were detected in EGFR (51.33%, 77/150), KRAS (7.33%, 11/150), BRAF (1.33%, 2/150), NRAS (1.33%, 2/150), Her-2 (2%, 3/150) and PIK3CA (4.67%, 7/150). There were 57 samples without any somatic mutations in all genes, 84 samples had one or more mutations in single gene, while 9 samples harboured mutations in two or more genes. The overall detection rate of EGFR mutation by NGS and Sanger sequencing was 51.33% (77/150) and 38.67% (58/150). The difference between the two methods was statistically significant ($\chi^2=4.862, P=0.027$). Compared to Sanger sequencing, the sensitivity and specificity of NGS assays was 98.28% and 78.26%, respectively. The overall detection rate of EGFR mutation by NGS and ddPCR was 51.33% (77/150) and 50% (75/150). There was no significant difference between the two methods ($\chi^2=0.053, P=0.818$). Compared to ddPCR, the positive concordance rate was 82.67%, the negative consistency rate was 80%, and the total concordance rate was 81.33%. **Conclusion:** Next-generation sequencing technology is more suitable for the diagnosis and treatment of NSCLC. Sanger sequencing and ddPCR can be useful supplements.

[Key words] non-small cell lung cancer; driver gene mutation; high-throughput sequencing; Sanger sequencing; droplet digital PCR

[J Nanjing Med Univ, 2021, 41(02): 193-197]

[基金项目] 江苏大学临床医学科技发展基金(JLY2018 0004)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: jsyxmao@163.com

肺癌是世界范围内发病率和病死率最高的恶性肿瘤之一^[1]。据中国癌症统计报告,中国2015年有429万例肺癌新发病例,281万例肺癌死亡病例^[2-3]。肺癌患者中约80%为非小细胞肺癌(non-small-cell lung cancer, NSCLC),60%~70%的NSCLC患者首诊时已处于中晚期^[4],失去了手术治疗机会。近年来以表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)-酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI)为代表的靶向治疗取得飞速发展。研究表明,EGFR、KRAS、BRAF、NRAS、PIK3CA和Her-2等基因的突变状态与NSCLC患者TKI靶向治疗的疗效、肿瘤转移以及预后相关^[5-7]。因此,全面准确地检测相关基因显得尤为重要。

目前常用的基因检测方法主要有Sanger测序法、高通量测序技术、实时荧光定量PCR法、微滴式数字PCR技术(droplet digital PCR, ddPCR)等。Sanger测序法被认为是基因检测的“金标准”,但其操作步骤繁琐、耗时长、检测灵敏度不高。高通量测序技术具有海量检测分析能力,能够一次检测多个基因的多个突变位点序列,节省肿瘤样本DNA。ddPCR技术是一种新发展起来的检测方法,其具有更高的精度和灵敏度,且可绝对定量。

本研究应用个性化基因组测序(personal genome machine, PGM)平台,对150例NSCLC患者EGFR、KRAS、BRAF、NRAS、Her-2和PIK3CA基因突变状态进行检测并分析,同时采用Sanger测序及ddPCR技术对150例NSCLC患者EGFR基因突变状态进行检测并加以对比分析。

1 材料和方法

1.1 标本

病例纳入标准:①病理证实为NSCLC;②年龄大于18岁;③有可测量病灶(CT测得长径 ≥ 10 mm);④心电图、血常规、肝肾功能、骨髓功能基本正常;⑤患者及家属知情并同意。病例排除标准:①造血功能严重障碍者,肝肾功能严重损害者;②精神病患者;③怀孕或哺乳期妇女。按照病例纳入及排除标准收集江苏大学附属宜兴医院和南通大学附属医院2016年5月—2018年6月就诊患者160例作为研究对象。肿瘤组织标本来源于研究病例穿刺或术后福尔马林固定石蜡包埋样本。本研究所有患者均知情同意,并经医院医学伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 DNA提取

采用QIAamp DNA FFPE Tissue Kit试剂盒(批号157050679,凯杰公司,德国),按照试剂盒说明书操作,提取DNA。采用Qubit[®] 2.0 fluorometer dsDNA HS assay Kit试剂盒(批号1871944,赛默飞世尔公司,美国)检测提取DNA的浓度和纯度。琼脂糖凝胶电泳检测DNA的片段化程度。

1.2.2 高通量测序技术检测EGFR、KRAS、BRAF、NRAS、Her-2和PIK3CA基因突变

DNA采用Agencourt[®] AMPure[™] XP beads(贝克曼库尔特公司,美国)进行纯化。采用肺癌文库制备试剂盒(赛默飞世尔公司,美国),按照说明书操作,进行扩增、片段化,连接接头和条码,从而获得DNA文库。采用Ion PGM Template OT2 Reagents 200试剂盒(批号4481107,赛默飞世尔公司,美国),按照说明书操作,利用Ion OneTouch仪器进行油包水PCR反应,Ion OneTouch ES仪器进行模板富集。采用Ion PGM[™] Sequencing Supplies 200 v2测序试剂盒(批号4482007,赛默飞世尔公司,美国),上机测序,要求测序平均深度 $> 1\ 000$ 倍,测序区域均一度 $> 95\%$ 。采用Iontorrent variant caller plugin v4.0软件分析结果。

1.2.3 Sanger测序法检测EGFR基因突变

运用PCR仪扩增EGFR基因18~21外显子目的片段,引物参考文献[8]。采用Cycle-Pure Kit纯化试剂盒(批号D6492-02, Omega Biotek公司,美国),按照说明书操作纯化PCR产物。采用Big Dye Terminator v3.1 kit(批号1705129,赛默飞世尔公司,美国)进行测序反应,纯化,运用ABI 3500Dx基因测序仪进行测序。

1.2.4 ddPCR法检测EGFR基因突变

采用美国Bio-Rad公司QX200 Droplet Digital PCR系统,按照商用试剂盒Prime PCR[™] ddPCR[™] Mutation Detection Assay Kit(批号1863107、1863103、1863104、1863105、1863106,美国Bio-Rad公司)说明书操作,检测EGFR基因18外显子p.G719S,19外显子p.E746_A750del,20外显子p.T790M,21外显子p.L858R和p.L861Q位点突变状态。阳性判定:“ch1+ch2-”区的点 ≥ 3 个。

1.3 统计学方法

采用SPSS 19.0统计学软件进行分析,定性资料组间比较采用卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高通量测序法检测基因突变在 NSCLC 患者中的分布

本研究入组 160 例 NSCLC 患者,提取其组织标本 DNA。经检测 10 例标本 DNA 质量不符合实验要求,对其余 150 例标本进行检测。其中男 87 例,女 63 例;年龄 <60 岁 57 例,≥60 岁 93 例;病理类型为腺癌 109 例,鳞癌 34 例,腺鳞癌 2 例,其他 5 例;高-中分化 61 例,低分化 89 例;TNM 分期 I ~ II 期 52 例;III ~ IV 期 98 例。150 例标本进行高通量测序检测,结果显示,EGFR、KRAS、BRAF、NRAS、Her-2 和 PIK3CA 基因突变检出率分别为 51.33% (77/150)、7.33% (11/150)、1.33% (2/150)、1.33% (2/150)、2.00% (3/150) 和 4.67% (7/150)。57 例标本未检出任何基因突变,84 例标本检出单个驱动基因发生突变,9 例标本检出 2 个及以上驱动基因发生突变。

6 种驱动基因中,EGFR 基因突变检出率最高,77 例标本共检出 86 个 EGFR 基因突变,其中有 9 例患者检出 EGFR 基因双位点复合突变。EGFR 基因突变位点集中在 EGFR 基因 19 外显子缺失突变和 21 外显子 L858R 位点突变,分别占 33.72% (29/86) 和 45.35% (39/86),具体结果见表 1。KRAS 基因突变集中在 12、13 密码子,其中 12 密码子占 91.67% (11/12),1 例患者 12 密码子检出 G12C 和 G12V 两个不同位点复合突变。2 例 BRAF 基因突变分别为 V600E 和 L618F 位点突变。2 例 NRAS 基因突变分别为 G12D 和 D33E 位点突变。3 例 Her-2 基因突变均为 P761H 位点突变。PIK3CA 基因突变分别为 E542K、E545K 和 H1047L 位点突变,其中 1 例患者检出 E542K 和 E545K 两个不同位点复合突变,具体结果见表 2。

2.2 高通量测序法、Sanger 测序法和 ddPCR 法检测 EGFR 基因突变的比较

150 例标本采用金标准 Sanger 测序法检测 EGFR 基因突变,突变检出率为 38.67% (58/150),与高通量测序法突变检出率 [51.33% (77/150)] 比较,差异有统计学意义 ($\chi^2=4.862, P=0.027$)。高通量测序法灵敏度为 98.28%,特异度为 78.26%。

150 例标本采用 ddPCR 法检测 EGFR 基因突变,突变检出率为 50.00% (75/150),与高通量测序法比较,差异无统计学意义 ($\chi^2=0.053, P=0.818$)。阳性一致率为 82.67%,阴性一致率 80.00%,总一致率为 81.33%。3 种不同方法的具体比较见表 3。

表 1 高通量测序法检测 EGFR 基因突变

Table 1 EGFR mutations detected by high-throughput sequencing

外显子	EGFR 突变位点	突变例数	
18	c.2125G>A, (p.E709K)	2	
	c.2155G>A, (p.G719S)	4	
19	c.2186G>C, (p.G729A)	1	
	c.2245G>C, (p.E749Q)	1	
	c.2248G>C, (p.A750P)	2	
	c.2260A>G, (p.K754E)	1	
	c.2127_2129del, (p.E709_T710delinsD)	2	
	c.2235_2249del, (p.E746_A750del)	6	
	c.2236_2244del, (p.E746_R748del)	3	
	c.2236_2249del, (p.E746_A750del)	1	
	c.2236_2250del, (p.E746_A750del)	5	
	c.2236_2256del, (p.E746_S752del)	1	
20	c.2237_2251del, (p.E746fs)	1	
	c.2238_2252del, (p.E746_T751delinsE)	4	
	c.2239_2256del, (p.L747_S752del)	2	
	c.2240_2257del, (p.L747_P753delinsS)	4	
	c.2369C>T, (p.T790M)	1	
	c.2341T>A, (p.C781S)	1	
	21	c.2471G>C, (p.G824A)	1
		c.2500G>T, (p.V834L)	1
		c.2573T>G, (p.L858R)	39
		c.2582T>A, (p.L861Q)	1
c.2588G>A, (p.G863D)		2	

表 2 高通量测序法检测 KRAS、BRAF、NRAS、Her-2 和 PIK3CA 基因突变

Table 2 KRAS, BRAF, NRAS, Her-2 and PIK3CA mutations detected by high-throughput sequencing

基因	突变位点	突变例数
KRAS	c.34G>T, (p.G12C)	3
	c.34G>A, (p.G12C)	1
	c.35G>A, (p.G12D)	4
	c.35G>T, (p.G12V)	2
	c.35G>C, (p.G12A)	1
	c.37G>T, (p.G13C)	1
BRAF	c.1799T>A, (p.V600E)	1
	c.1854G>T, (p.L618F)	1
NRAS	c.35G>A, (p.G12D)	1
	c.99T>G, (p.D33E)	1
Her-2	c.2282C>A, (p.P761H)	3
PIK3CA	c.1624G>A, (p.E542K)	2
	c.1633G>A, (p.E545K)	3
	c.3140A>T, (p.H1047L)	3

表3 Sanger测序法、ddPCR法和高通量测序法特点比较
Table 3 The characteristics comparison of ddPCR, Sanger sequencing and high-throughput sequencing

特点	Sanger测序	ddPCR	高通量测序
定量检测	不能定量检测	可绝对定量	可定量检测
检测灵敏度	10%	0.04%~0.10%	1%
检测范围	已知和未知突变,可提供基因序列信息	已知特定突变,无法提供基因序列信息	已知和未知突变,可提供基因序列信息
检测周期	2~3 d	1 d	3~5 d
检测通量	低通量	低通量	高通量

3 讨论

随着高通量测序技术的不断发展,以其为技术基础的基因检测在NSCLC诊疗中的应用日益广泛。本研究选择了NSCLC诊疗中相关的6个驱动基因进行高通量测序检测,并分析其在我国NSCLC患者中的变异情况。

EGFR基因突变是NSCLC最常见的突变基因,本研究EGFR基因突变的检出率为51.33%,与以往的研究报道相符^[9-10]。检出的EGFR基因突变以常见的19外显子缺失突变和21外显子L858R位点突变为主,同时也检测到罕见位点突变。文献报道,EGFR基因18外显子G719S罕见位点突变对TKI治疗敏感,但其敏感性不及常见突变,同时厄洛替尼比吉非替尼在罕见突变方面有更好的疗效^[11]。18外显子E709X罕见位点突变与G719S罕见位点突变相比,敏感性更低^[12]。21外显子L861Q罕见位点突变同18外显子G719S罕见位点突变一样表现出不及常见突变的敏感性^[12]。20外显子T790M位点突变经大量研究证实是耐药位点^[12,13]。本研究中有9例患者检出EGFR基因双位点复合突变,有研究指出,罕见突变的复合突变其疗效要优于单一罕见突变^[12,14]。本研究中尚有部分罕见突变未见报道或相关证据不足,还需进一步研究。

本研究中KRAS基因突变检出率与文献报道相吻合^[15]。文献报道KRAS基因突变以G12C和G12V突变位点最为常见^[15],而本研究与之不同,G12D位点突变检出最多。Zer等^[16]学者的研究表明,G12C/G12V位点突变患者经TKI治疗后预后差,而G12D/G12S位点突变患者可以从TKI治疗中获益。本研究检测到的2例BRAF基因突变,1例为经典的V600E位点突变,另1例为L618F位点罕见突变。研究表明,NRAS基因突变在NSCLC中的发生频率

极低,3号外显子上61号密码子突变最常见,其次是2号外显子上的12号密码子突变^[17]。本研究检出NRAS基因12号密码子G12D位点突变及D33E罕见位点突变,由于样本量较小,并未检出61号密码子突变。Song等^[18]研究指出NSCLC中Her-2基因突变以插入突变最为常见,其次为P761H位点突变。本研究与之不同,检出的3例突变均为P761H位点突变,未检出插入突变,具体原因还需进一步分析。本研究中PIK3CA基因突变检出率为4.67%,与此前的研究相符^[19]。除1例标本检出PIK3CA基因2个不同位点的复合突变外,其余6例突变均和其他驱动基因以复合突变的形式存在,该特征与Scheffler等^[7]学者的研究一致。

近年来国内外的研究发现,肿瘤驱动基因可以以复合突变的形式存在^[17,20],本研究也得到相同的结论,共发现9例标本存在驱动基因复合突变,这提示某些NSCLC的形成可能不单是一个驱动基因的作用,而是多个驱动基因共同作用的结果。

本研究通过对EGFR基因突变的检测,分析比较了Sanger测序法、ddPCR法和高通量测序法3种不同的方法。高通量测序法与基因检测金标准Sanger测序法相比较,EGFR基因突变检出率大幅提升,差异有统计学意义。高通量测序法检测灵敏度明显高于Sanger测序法,但研究中发现1例标本Sanger测序法检出19外显子缺失突变,但高通量测序法却并未检出,猜测可能是高通量测序法生物信息学软件分析结果时产生错误。高通量测序法与新技术ddPCR法检测EGFR基因突变,检出率差异无统计学意义。理论上ddPCR法检测EGFR基因突变应有更高的突变检出率,但实践中ddPCR法商用检测试剂盒仅能检测少数已知的热点突变,部分罕见和未知突变无法检测,导致突变检出率并不高。综合来看,高通量测序法拥有更高的检测通量和突变检出率,并可同时检测多个基因,更适合应用于NSCLC诊疗。Sanger测序法和ddPCR法可作为有益的补充。

虽然高通量测序技术应用于NSCLC诊疗过程中仍有诸多问题亟待解决,但随着高通量测序技术的不断发展,持续降低成本,缩短检测周期及提高准确性,将更广泛地应用于肿瘤尤其是NSCLC的临床诊断及个体化治疗中。

[参考文献]

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of inci-

- dence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6):394-424
- [2] CHEN W, ZHENG R, BADDE P D, et al. Cancer statistics in China[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2):115-132
- [3] 罗娟,周晓,程志祥. FoxO1在非小细胞肺癌中的研究进展[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(8):1161-1166
- [4] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2016[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(1):7-30
- [5] TOMASINI P, SERDJEBI C, KHOBTAN, et al. EGFR and KRAS mutations predict the incidence and outcome of brain metastases in non-small cell lung cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(12):E2132
- [6] SMIT E. BRAF mutations in non-small-cell lung cancer[J]. *J Thorac Oncol*, 2014, 9(11):1594-1595
- [7] SCHEFFLER M, BOS M, GARDIZI M, et al. PIK3CA mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC): genetic heterogeneity, prognostic impact and incidence of prior malignancies[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(2):1315-1326
- [8] 王卓,井昶雯,曹海霞,等. 高分辨率熔解曲线分析技术检测EGFR基因突变方法的建立及其初步临床应用[J]. *中国肿瘤外科杂志*, 2014, 6(4):236-239
- [9] SHI Y, AU J S, THONGPRASERT S, et al. A prospective, molecular epidemiology study of EGFR mutations in Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology (PIONEER) [J]. *J Thorac Oncol*, 2014, 9(2):154-162
- [10] 程亚楠,叶英楠,董莉,等. 靶向高通量测序在非小细胞肺癌中的临床应用[J]. *中国肿瘤临床*, 2018, 45(11):582-588
- [11] OTSUKA T, MORI M, YANO Y, et al. Effectiveness of tyrosine kinase inhibitors in Japanese patients with non-small cell lung cancer harboring minor epidermal growth factor receptor mutations: results from a multicenter retrospective study (HANSHIN Oncology Group 0212) [J]. *Anticancer Res*, 2015, 35(7):3885-3891
- [12] 冷娇,李代蓉. 非小细胞肺癌EGFR罕见突变与EGFR-TKI靶向治疗的研究进展[J]. *重庆医学*, 2018, 47(28):3700-3705
- [13] 于芹,姜达,李颖. T790M突变的非小细胞肺癌研究现状与前景[J]. *中国肺癌杂志*, 2017, 20(3):199-204
- [14] KEAM B, KIM D W, PARK J H, et al. Rare and complex mutations of epidermal growth factor receptor, and efficacy of tyrosine kinase inhibitor in patients with non-small cell lung cancer[J]. *Int J Clin Oncol*, 2014, 19(4):594-600
- [15] 刘蕾,魏素菊. KRAS突变的非小细胞肺癌的研究进展[J]. *中国肺癌杂志*, 2018, 21(5):419-423
- [16] ZER A, DING K, LEE S M, et al. Pooled analysis of the prognostic and predictive value of KRAS mutation status and mutation subtype in patients with non-small cell lung cancer treated with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors[J]. *J Thorac Oncol*, 2016, 11(3):312-323
- [17] 廖兴辉,许春伟,王文娟,等. 非小细胞肺癌患者RAS基因突变临床特征和预后分析[J]. *肿瘤学杂志*, 2018, 24(7):676-681
- [18] SONG Z, YU X, SHI Z, et al. HER2 mutations in Chinese patients with non-small cell lung cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(47):78152-78158
- [19] 郑晓彬,吴标,庄武,等. 非小细胞肺癌患者中PIK3CA基因突变的临床特征和预后[J]. *临床与病理杂志*, 2017, 37(5):960-966
- [20] SCHMID S, GAUTSCHI O, ROTHSCHILD S, et al. Clinical outcome of ALK-positive non-small cell lung cancer (NSCLC), patients with de novo EGFR or KRAS co-mutations receiving tyrosine kinase inhibitors (TKI) [J]. *J Thorac Oncol*, 2017, 12(4):681-688

[收稿日期] 2020-07-08