·综　　述·

# 非小细胞肺癌表皮生长因子受体基因突变的研究进展

王理扬 综述，姚文秀 审校
（四川省肿瘤医院肿瘤内二科，成都 610041）

**关键词**：癌，非小细胞肺；受体，表皮生长因子；基因；突变
doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.28.036　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1671-8348(2011)28-2897-03

肺癌是目前发病和病死率最高的恶性肿瘤，其中75%～80%是非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer，NSCLC)。随着表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor，EGFR)酪氨酸激酶信号通路与非小细胞肺癌发生发展等相关研究的不断深入，EGFR酪氨酸激酶成为NSCLC治疗及研究的重要靶分子。EGFR的酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitors，TKI)药物，在NSCLC中治疗中显示出很好的抗肿瘤疗效。2004年4～5月，美国的两个研究小组分别在《新英格兰医学杂志》和《科学》上发文报道了EGFR基因突变和吉非替尼疗效间的相关性[1-2]，吸引了肺癌研究领域所有学者的眼球，很快EGFR基因研究热遍全球。

## 1　NSCLC的EGFR基因突变种类

EGFR基因突变在NSCLC比较常见，突变均位于胞内部分的酪氨酸激酶(tyrosine kinase，TK)结构域，目前报道的EGFR基因突变共有数百个。突变集中在EGFR的18～21外显子，其突变比例分别为4.7%、44%、9.3%和45%，这些外显子是编码EGFR-TK结构域的主要部位。

目前已确认的常见的有意义的突变有如下几个：19外显子上的突变主要是缺失突变(E19del)，包括单纯的缺失突变或缺失突变合并错义突变。19外显子上的突变均位于K745附近，而K745是ATP结合的关键部位。缺失突变几乎均引起酪氨酸激酶域中LREA 4个氨基酸残基的缺失，这一序列在脊椎动物中高度保守。21外显子上的突变均为错义突变，多数突变为发生在858位的L突变为R(L858R)，此突变位点紧邻激酶活化环(activation loop)中高度保守的DFG模体。在所有突变中以21外显子上的L858R和19外显子的缺失突变(E19del)，二者最常见，约占EGFR突变的90%，都与小分子TKI的敏感度相关。20外显子790位的T突变为M(T790M)，是导致肿瘤对吉非替尼和厄洛替尼继发耐药的原因。

## 2　NSCLC的EGFR基因突变的临床特征

目前的研究表明EGFR突变与性别、种族、吸烟、病理类型有关，突变在腺癌、女性、非吸烟者及东亚人中发生率高。

早期的研究发现，在NSCLC中EGFR基因突变几乎仅见于腺癌，其他病理类型少有突变病例出现[3-4]。近期的前瞻性的IPASS研究亦证实[5]，突变在腺癌出现的概率高。腺癌的分化程度与EGFR基因突变率有一定的关系，分化较好的腺癌(包括高分化和中分化的腺癌)比分化差的腺癌有更高的突变率[6]。

在EGFR基因突变发现之前，已经有研究发现，和白种人相比，吉非替尼在中国和日本NSCLC患者中有更好的疗效[7-8]。在与吉非替尼疗效相关的EGFR基因突变发现后，随着来自中国大陆、中国台湾、韩国和日本关于肺癌患者EGFR基因突变情况报道的增加，进一步证实这种疗效的差别与EGFR基因突变率的人种或地域的差异是一致的。目前得到大多数学者认可：作为最常见的EGFR突变-外显子19缺失(E19del)和外显子21L858R突变，见于近10%～15%的白种人NSCLC患者和30%～40%的亚洲患者。

EGFR基因突变主要发生在不吸烟患者。Pao等的研究中将吸烟总量少于100支定为不吸烟，在15例不吸烟肺癌患者中EGFR突变率为47%，而随机选取的81例患者中的突变率仅5%[9]。此后的研究进一步证实了此现象[6,10]。显然，EGFR基因突变不是烟草中的致癌物所致，对其深入研究可能为预防此类肺癌提供新的方法。

关于性别是否是EGFR基因突变的影响因素有一定争议。多个研究的单因素分析中女性肺癌患者的突变率较高。由于女性患者多不吸烟，且腺癌的比例较高，是否是独立影响因素，有研究者持不同意见。Kosaka等[6]采用logistic回归分析了性别、吸烟状况、病理类型这3种因素对突变率的影响，结果仅吸烟状态和腺癌是突变的独立影响因素，突变率与性别无关。来自Miller等[11]的报道同样发现139例吉非替尼治疗的患者中男性和女性的疗效无差别。

临床流行病学特征的研究主要目的是寻找到对EGFR-TKI有较好疗效的人群，从疗效与特定人群的关系中探寻EGFR-TKI治疗肺癌的分子机制。在明确了EGFR突变与小分子TKI的关系后，临床特征多用于无法取得病理标本患者的疗效预估，选择合适的人群则EGFR的突变率相对较高，可作为是否存在突变的辅助参考依据。

## 3　NSCLC的EGFR基因突变的临床意义

**3.1　EGFR-TK基因突变与小分子TKI治疗NSCLC疗效的关系**　虽然EGFR基因突变发生率在亚洲及欧美NSCLC患者之间有明显差异，但EGFR基因突变与小分子TKI治疗NSCLC有密切相关已得以公认。EGFR突变E19del和L858R的预测作用已经明确。携带这些突变基因的患者对厄洛替尼或吉非替尼的反应明显较佳。初期回顾性研究显示，使用厄洛替尼或吉非替尼后肿瘤缓解的患者大约90%携带突变，而未缓解者则无突变[1-2]。随后的回顾性研究已证明，携带EGFR突变的细支气管肺泡腺癌患者，接受单药治疗后客观缓解率近80%，中位无进展生存期为13个月[12]。

近年来多个前瞻性研究充分证实了EGFR突变对EGFR-TKI的疗效预测作用，EGFR突变患者无论是用厄洛替尼还是吉非替尼治疗，有效率都比较高(55%～73%)，无进展生存1年左右，中位生存期也比较长[5,13-15]。近期一份Meta分析显示，所有人群中，EGFR突变预测TKI单药的特异性和敏感性分别为78%和86%，东亚人群中预测的特异性和敏感性均为81%，西方白种人群分别为77%和91%[16]。可见，在东方人和西方人群中，EGFR突变对TKI疗效的预测价值是一样的。

目前，较多研究者认可EGFR突变是吉非替尼和厄洛替

尼治疗晚期NSCLC的疗效预测因子，推荐对初治的晚期NSCLC患者进行EGFR突变的检测，并根据检测结果决定患者的治疗策略。而对于早期和局部晚期的NSCLC，目前的证据尚不能确定EGFR突变是否可以作为吉非替尼或厄洛替尼的疗效预测因子。

**3.2 EGFR基因突变与对TKI耐药的关系** 尽管存在EGFR-TK突变的NSCLC患者对小分子TKI反应良好，但最终都出现了耐药。目前认为这类患者出现耐药很大程度与出现了EGFR基因二次突变有关。20外显子的T790M突变出现在大约50%的EGFR-TKI获得性耐药患者中[17-19]。

临床前研究也支持上述临床发现，提示T790M突变是潜在的耐药机制。转染T790M到对吉非替尼敏感的肺癌细胞也出现了对吉非替尼耐药[20]。目前还不清楚T790M突变导致耐药的机制。一种解释是，耐药的原因是突变导致EGFR结构发生变化，使TKI与其结合出现位阻效应[17,21-23]。另一种解释是T790M增加了酪氨酸激酶对ATP的亲和力，从而减小了ATP竞争性药物的作用[24]。

目前已知除了T790突变外，尚有多种机制影响获得性耐药。如EGFR旁路TK信号通路异常(c-Met扩增)，EGFR下游信号分子变异导致PTEN失活等均与获得性耐药相关。

## 4 NSCLC的EGFR酪氨酸激酶结构域基因突变的检测方法

EGFR基因突变检测对于临床医生进行肺癌的个体化治疗具有重要的参考价值。关于EGFR基因突变检测的方法，目前仍然没有一种标准化的方法用于临床，但多聚酶链式反应(polymerase chain reaction，PCR)技术是进行核酸扩增和基因检测的基础方法，目前几乎所有基因突变检测的细胞和分子诊断技术都是建立在PCR基础之上的。

**4.1 直接测序法** 目前，直接测序法仍然是检测EGFR基因突变使用最多的方法，对突变的检测相对准确、完美，是确定碱基的种类和位置的最终检测法。在一项有3 101例患者的系统分析中，直接测序法预测EGFR-TKI单药治疗EGFR突变患者的疗效的敏感性为78%，特异性高达88%[16]。但需要获取肿瘤组织、分离肿瘤细胞、提取核酸和进行测序，所需时间长，而且对取材和技术要求都比较严格。因此应用于临床仍受到一定程度的限制。

**4.2 特异性位点的多聚合酶链式反应** EGFR基因突变模式相当复杂，外显子19的碱基缺失和外显子21的错义突变是两种最主要的突变类型，占了突变类型的90%以上，因此被视为突变的两个"热点"。Ohnishi等[25]采用特异性突变的多聚酶链式反应(mutation-specific PCR)、Asano等[26]采用突变体富集PCR法(mutant-enriched PCR)、Nagai等[27]采用核酸肽锁核酸(peptide nucleic acid-locked nucleic acid，PNA-LNA)等各自不同的方法，检测EGFR基因的两个突变"热点"。IPASS研究[5]采用的是突变扩增系统(amplification refractory mutation system，ARMS)。上述几种特异性位点的多聚酶链式反应对EGFR基因特异性突变的检测尽管不需要测序，但必须借助凝胶电泳技术对PCR产物的性质做出判断，也只能针对已知的突变位点设计特异引物进行检测。

**4.3 荧光实时聚合酶链式反应** 荧光实时PCR是近几年迅速发展起来的一种新技术，它完全脱离了凝胶电泳技术，避免了有毒操作，且操作更加简便、灵敏度更高。该技术借助于荧光信号来检测PCR产物，主要包括双标记探针法、分子信标法、DNA双链非特异性内嵌染料法。应用荧光实时PCR检测EGFR基因突变，并不需要检测突变的基因组DNA的具体含量，仅需要检测样本是否具有扩增信号即可，这就使得整个检测过程更加简单。

**4.4 高效液相色谱法** 高效液相色谱的基本原理是利用不同物质在流动相和固定相中分配系数差异而得到分离。在高效液相色谱基础上引入temperature-modulated heteroduplex analysis(TMHA)概念即为变性高效液相色谱法。Bai等[28]用变性高效液相色谱法对晚期NSCLC患者配对癌组织和血浆中的EGFR突变情况进行了研究。

**4.5 聚合酶链式反应-单链构象多态性分析** 聚合酶链式反应-单链构象多态性分析(PCR single-strand conformation polymorphism，PCR-SSCP)是一种比较经典的基因突变检测的方法。用PCR-SSCP法检测小于200 bp的PCR产物时，突变检出率可达70%～95%，而片段大于400 bp时检出率仅为50%左右，该法可能会存在1%的假阳性率。该法可以对未知的突变进行检测，较DNA测序法有更高的灵敏度。然而，PCR-SSCP需要平行的标准对照，受实验条件影响较大，同时也只能做定性的判断，对于突变机制的研究受益不大。

**4.6 其他方法** 其他常见的方法还有：毛细管电泳、限制性片段长度多态性、碱基切割序列扫描、DNA芯片法。

纵观以上所有方法，相对于直接测序，其他分子生物学方法尽管灵敏度和/或特异性有所提高，但只能针对EGFR基因一些已知的常见的突变进行，不能去检测罕见或未知的突变(除外PCR-SSCP)。同时，大多数方法仍对组织的取材要求较高。此外，有的方法，需要特殊的仪器设备，因而仍然不能在临床上进行大范围推广。由于目前PCR试剂尚未被正式批准，有些检测方法还需要特殊仪器设备，推荐直接测序法作为目前EGFR突变检测的常用方法。

综上所述，NSCLC组织存在EGFR基因突变预示了其对EGFR-TKI的敏感性。对患者的个体化治疗是优化肺癌分子治疗的核心，而对患者的EGFR基因检测是选择合理化治疗的关键。随着研究的深入，EGFR基因突变的检测方法可能会更简便、标准，TKI治疗的目标人群可能进一步明确，TKI的耐药机制亦可能了解。未来还可能是采用多基因检测，将系列基因检测的结果很好地指导临床，为肺癌个体化治疗服务，为肺癌患者造福。

## 参考文献：


[1] Lynch TJ，Bell DW，Sordella R，et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib[J]. N Engl J Med，2004，350(21)：2129-2139.

[2] Paez JG，Janne PA，Lee JC，et al. EGFR mutations in lung cancer：correlation with clinical response to gefitinib therapy[J]. Science，2004，304(5676)：1497-1500.

[3] Mitsudomi T，Kosaka T，Yatabe Y. Biological and clinical implications of EGFR mutations in lung cancer[J]. Int J Clin Oncol，2006，11(3)：190-198.

[4] Tokumo M，Toyooka S，Kiura K，et al. The relationship between epidermal growth factor receptor mutations and clinicopathologic features in non-small cell lung canceer[J]. Clin Cancer Res，2005，11(3)：1167-1173.

[5] 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.

[6] Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, et al. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications[J]. Caner Res, 2004, 64(24): 8919-8923.

[7] Mu XL, Li LY, Zhang XT, et al. Gefitinib-sensitive mutations of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase domain in Chinese patients with non-small-cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(12): 4289-4294.

[8] Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, et al. Multi-institutional randomized phase Ⅱ trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial)[J]. J Clin Oncol, 2003, 21(12): 2237-2246.

[9] 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 USA, 2004, 101(36): 13306-13311.

[10] Yang SH, Mechanic LE, Yang P, et al. Mutations in the tyrosine kinase domain of the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(6): 2106-2110.

[11] Miller VA, Kris MG, Shah N, et al. Bronchioloalveolar pathologic subtype and smoking history predict sensitiVity to gefitinb in advanced non-small-cell lung cancer[J]. J Clin Oncol, 2004, 22(6): 1103-1109.

[12] Miller VA, Riely GJ, Zakowski MF, et al. Molecular characteristics of bronchioloalveolar carcinoma and adenocarcinima, bronchioloalveolar carcinoma subtype, predict response to erlotinib[J]. J Clin Oncol, 2008, 26(9): 1472-1478.

[13] Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR[J]. N Engl Med, 2010, 362(25): 2380-2388.

[14] Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutation of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomized phase 3 trial[J]. Lancet Oncol, 2010, 11(2): 121-128.

[15] Rosell R, Moran T, Queralt C, et al. Screening for epidermal growth factor mutations in lung cancer[J]. N Engl J Med, 2009, 361(10): 958-967.

[16] Dahabreh IJ, Linardou H, Siannis F, et al. Somatic EGFR mutation and gene copy gain as predictive biomarkers for response to tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(1): 291-303.

[17] Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, et al. EGFR mutation and resistance of non-small cell lung cancer to gefitinib[J]. N Engl J Med, 2005, 352(8): 786-792.

[18] Balak MN, Gong Y, Riely GJ, et al. Novel D761Y and common secondary T790M mutations in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas with acquired resistance to kinase inhibitors[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(21): 6494-6501.

[19] Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, et al. Analysis of epidermal growth factor receptor gene mutation in patients with non-small cell lung cancer and acquired resistance to gefitinib[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(19): 5764-5769.

[20] Greulich H, Chen TH, Feng W, et al. Oncogenic transformation by inhibitor-sensitive and-resistant EGFR mutants [J]. PLoS Med, 2005, 2(11): e313.

[21] Kumar A, Petri ET, Halmos B, et al. Structure and clinical relevance of the epidermal growth factor receptor in human cancer[J]. J Clin Oncol, 2008, 26(10): 1742-1751.

[22] Kwak EL, Sordella R, Bell DW, et al. Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(21): 7665-7670.

[23] Pao W, Wang TY, Riely GJ, et al. KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib[J]. PLoS Med, 2005, 2(1): e17.

[24] Yun CH, Mengwasser KE, Toms AV, et al. The T790 mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(6): 2070-2075.

[25] Ohnishi H, Ohtsuka K, Ooide A, et al. A simple and sensitive method for detecting major mutations within the tyrosine kinase domain of the epidermal growth factor receptor gene in non-small-cell lung carcinoma[J]. Diagn Mol Pathol, 2006, 15(2): 101-108.

[26] Asano H, Toyooka S, Tokumo M, et al. Detection of EGFR gene mutation in lung cancer by mutant-enriched polymerase chain reaction assay[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(1): 43-48.

[27] Nagai Y, Miyazawa H, Tanaka T, et al. Genetic heterogeneity of the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer cell lines revealed by a rapid and sensitive detection system, the peptide nucleic acid-locked nucleic acid PCR clamp[J]. Cancer Res, 2005, 65(16): 7276-7282.

[28] 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]. J Clin Oncol, 2009, 27(16): 2653-2659.


(收稿日期:2011-04-18　修回日期:2011-05-20)