

本文引用: 李晓, 马利军, 张晓菊, 等. 非小细胞肺癌患者经支气管内超声引导支气管针穿刺获取的转移淋巴结标本与原发病灶标本中表皮生长因子受体基因突变比较[J]. 新乡医学院学报, 2017, 34(6): 478-481. DOI: 10.7683/xyxyxb.2017.06.006.

【临床研究】

非小细胞肺癌患者经支气管内超声引导支气管针穿刺获取的转移淋巴结标本与原发病灶标本中表皮生长因子受体基因突变比较

李 晓, 马利军, 张晓菊, 马 芸, 张茜茜, 潘金兵
(郑州大学人民医院呼吸与危重症医学科, 河南 郑州 450003)

摘要: **目的** 比较晚期非鳞状非小细胞肺癌(NSCLC)患者经支气管内超声引导支气管针穿刺(EBUS-TBNA)获取的转移淋巴结(LN)标本与原发病灶(PT)标本的表皮生长因子受体(EGFR)突变状态, 评价EBUS-TBNA获取标本用于检测EGFR基因突变的价值。**方法** 对2014年1月至2016年1月郑州大学人民医院收治的72例初治、非鳞状NSCLC患者(Ⅲ期和Ⅳ期)的PT标本与EBUS-TBNA获取的转移LN标本进行EGFR基因突变检测。通过扩增阻滞突变系统(ARMS)法检测EGFR基因突变情况, 比较EGFR基因突变的一致率, 并评估不同EGFR基因突变患者靶向治疗的疾病控制率。**结果** 72例标本中, 34例(47.2%)显示至少1个EGFR基因突变, 其中PT标本33例, 转移LN标本30例; 主要是外显子19缺失和外显子21 L858R突变。PT和转移LN标本EGFR基因突变的一致率为88.9%(64/72)。1例患者的PT和转移LN标本中均有外显子21 L858R突变, 而仅在转移LN标本中检测到T790M突变。EGFR基因突变的病例中有28例患者接受EGFR酪氨酸激酶抑制剂(TKI)治疗, 其疾病控制率为71.4%(20/28, 部分缓解16例, 疾病稳定4例)。PT和转移LN标本中EGFR基因突变一致患者和突变不一致患者的TKI治疗疾病控制率比较差异无统计学意义($\chi^2 = 0.07, P > 0.05$)。**结论** 通过EBUS-TBNA取得的转移LN标本的EGFR基因突变结果与同一患者的PT标本具有较高的一致性, 晚期非鳞状NSCLC患者通过EBUS-TBNA获得的转移LN标本可以用于EGFR突变的检测。

关键词: 非小细胞肺癌; 表皮生长因子受体; 突变; 经支气管超声引导针吸活检; 转移淋巴结

中图分类号: R734.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2017)06-0478-04

Comparison of epidermal growth factor receptor genetic mutation in primary tumor and metastatic lymph nodes acquired by endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration of non-small cell lung cancer

LI Xiao, MA Li-jun, ZHANG Xiao-ju, MA Yun, ZHANG Qian-qian, PAN Jin-bing

(Department of Respiratory and Critical Care Medicine, the People's Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450003, Henan Province, China)

Abstract: **Objective** To compare epidermal growth factor receptor genetic mutation in primary tumor and metastatic lymph nodes acquired via endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration (EBUS-TBNA) in non-squamous, non-small cell lung cancer (NSCLC), in order to evaluate the efficacy of using EBUS-TBNA to obtain the samples in detecting epidermal growth factor receptor (EGFR) genetic mutation. **Methods** Seventy-two treatment-naive, advanced, non-squamous NSCLC patients (stage III and IV) with matched lymph node (LN) specimens obtained by EBUS-TBNA and primary tumor (PT) specimens from January 2014 to January 2016 in the People's Hospital of Zhengzhou University were selected. EGFR genetic mutations were detected in patients with paired specimens through amplification refractory mutation system (ARMS). The concordance rate of EGFR genetic mutations between LN and PT specimens were compared, and the disease control rate between patients with different EGFR genetic mutations was evaluated. **Results** Of the 72 patients, at least one EGFR mutation was detected in 34 cases (47.2%), which included PT ($n = 33$) and LN ($n = 30$) specimens. Major mutations included exon 19 deletion and exon 21 L858R mutation. The concordance rate of EGFR mutations between matched PT and LN specimens was 88.9% (64/72). T790M was detected in LN specimen only in one case with L858R in LN and PT. Moreover, 28 patients with any mutation were treated with EGFR TKI. The disease control rate was 71.4% (20/28, 16 patients with par-

DOI: 10.7683/xyxyxb.2017.06.006

收稿日期: 2017-03-20

基金项目: 河南省科技厅国际合作项目(编号: 14430510022); 郑州市科技局领军人才资助项目(编号: 131PLJRC662)。

作者简介: 李 晓(1982-), 女, 河南商丘人, 博士, 主治医师, 研究方向: 肺部肿瘤。

通信作者: 潘金兵(1974-), 男, 安徽巢湖人, 博士, 主任医师, 研究方向: 呼吸内镜介入治疗; E-mail: 592796813@qq.com。

tial response and 4 patients with stable disease). There was no significant difference in the disease control rate between the concordant mutation patients and the discordant mutation patients ($\chi^2 = 0.07, P > 0.05$). **Conclusion** A high concordance rate of EGFR mutations of PT and matched LN specimens offered by EBUS-TBNA is observed, it demonstrates that LN samples obtained by EBUS-TBNA from advanced non-squamous NSCLC patients can be effectively used for EGFR mutation testing.

Key words: non-small cell lung cancer; epidermal growth factor receptor; mutation; endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration; metastatic lymph node

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)敏感突变的检测在晚期非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)的治疗中有重要的指导作用。临床研究证明,EGFR-TKI对EGFR基因突变阳性患者的治疗有效率约为75%^[1]。肺癌诊断及EGFR基因突变检测的重要环节是获取足够量的组织。在肺癌早期,原发病灶(primary tumor, PT)的组织标本不容易获得,而中晚期失去手术机会的肺癌患者,就更难以获得PT的肿瘤组织学标本;另外,患者支气管镜检查也经常难以获取肿瘤标本。对于这些患者,支气管内超声引导下经支气管镜穿刺(endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration, EBUS-TBNA)获取组织标本就成为EGFR基因检测的必然选择。NAVANI等^[2]报道了成功使用EBUS-TBNA获取标本用于EGFR基因突变的分析,发现其中约90%的患者存在突变。然而,由于取样技术和肿瘤分子状态的差异,肿瘤PT与转移淋巴结(lymph node, LN)之间的基因突变结果存在差异。Meta分析显示,NSCLC原发灶和转移灶EGFR基因型一致率达84%^[3]。目前,大多数研究使用手术切除的PT和转移LN标本来检测肺癌EGFR基因突变状态^[4]。对于晚期不能手术的肺癌患者是否能应用EBUS-TBNA技术对转移LN进行有效的EGFR基因突变检测还不可知。一项小样本研究比较了经EBUS-TBNA获得的转移LN标本和手术切除的PT标本的EGFR基因突变状态,发现PT和转移LN标本的EGFR突变率分别为28.6%和21.4%,主要EGFR基因突变的非一致率为7.1%^[5]。因此,本研究比较了晚期非鳞状NSCLC患者EBUS-TBNA获取的转移LN标本与PT标本EGFR基因突变状态,评估应用EBUS-TBNA获取的转移LN标本检测EGFR基因突变的价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2014年1月至2016年1月郑州大学人民医院收治的72例初治、非鳞状NSCLC患者(Ⅲ期和Ⅳ期)的PT标本与EBUS-TBNA获取的转移LN标本进行EGFR基因突变检测,其中男41例,女31例;有吸烟史者30例;组织学类

型:腺癌70例,大细胞肺癌2例;肿瘤分期:ⅢA期17例,ⅢB期15例,Ⅳ期40例;在PT标本中通过支气管内支气管镜活组织检查获得24例(33.3%),经胸腔穿刺活组织检查获得15例(20.1%),通过手术获得33例(45.8%)。PT标本和转移LN标本行EGFR基因检测的间隔时间小于2个月。所有患者诊断最终以活组织病理检查证实。

1.2 方法

1.2.1 经EBUS-TBNA获取标本 使用BF-UC260FOL8超声支气管镜、EU-C2000超声处理器及21G针(日本奥林巴斯公司)行EBUS-TBNA。将所有抽取样品置于体积分数10%甲醛溶液中固定,石蜡包埋。

1.2.2 EGFR基因突变检测 采用扩增阻滞突变系统(amplification refractory mutation system, ARMS)法检测EGFR基因突变情况,每例组织石蜡包埋标本常规切片提取DNA, -20℃冰箱保存备用。按照EGFR基因突变检测试剂盒说明书(厦门艾德生物医药科技有限公司)进行操作,向15 μL待测DNA、阳性质控品、超纯水中分别加入1.5 μL Tq酶,在涡旋器上混匀离心,将混匀的DNA、阳性质控品、超纯水依次取5 μL加入聚合酶链式反应8联管反应板,离心后使用实时荧光定量聚合酶链式反应仪(德国Stratagene公司)进行扩增及DNA突变检测。

1.2.3 EGFR-TKI治疗 接受EGFR-TKI治疗的患者每日口服吉非替尼250 mg或厄洛替尼150 mg。评估患者TKI治疗3个月后的疾病控制率。

1.2.4 临床疗效评估 根据实体瘤的疗效评价标准进行评估,完全缓解(complete remission, CR):所有靶病灶消失,无新病灶出现,且CEA、CA125等肿瘤标志物水平正常,至少维持4周;部分缓解(partial remission, PR):靶病灶最大径之和减少 $\geq 30\%$,至少维持4周;疾病稳定(stable disease, SD):靶病灶最大直径之和缩小 $< 30\%$,或增大未达 $< 20\%$;疾病进展(progressive disease, PD):靶病灶最大直径之和增加 $\geq 20\%$,或出现新病灶。疾病控制率 = (CR + PR + SD) / 总例数 $\times 100\%$ 。

1.3 统计学处理 应用SPSS 16.0软件进行数据分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t

检验,计数资料采用 χ^2 检验或 Fisher 精确检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EGFR 基因突变情况 72 例标本中,34 例(47.2%)显示至少 1 个 EGFR 基因突变,包括 33 例 PT 和 30 例转移 LN 标本。其中主要是外显子 19 缺失和外显子 21 L858R 突变。转移 LN 标本中存在 19-DEL 突变 14 例, L858R 突变 11 例, 19-DEL、L858R 同时突变 3 例,野生型 18 例, L858R 合并 T790M 突变 1 例, K714N 突变 1 例。

2.2 PT 与转移 LN 标本中 EGFR 基因突变差异

8 例患者 PT 标本与匹配的转移 LN 标本中的 EGFR 基因突变不一致,见表 1。其中,4 例患者 PT 标本发现 EGFR 突变,转移 LN 显示野生型;1 例患者转移 LN 标本中发现 EGFR 突变,PT 标本显示野生型;1 例患者 PT 和转移 LN 标本中 EGFR 检测均显示外显子 19 缺失,同时仅在 PT 标本中检测到 G719S 突变;1 例患者 PT 和转移 LN 标本中均有 L858R 突变,而仅在转移 LN 标本中检测到 T790M 突变,PT 和转移 LN 标本 EGFR 基因突变的一致率为 88.9% (64/72)。另外,29 例 PT 和转移 LN 标本存在一种相同 EGFR 基因突变的患者中,2 例 PT 中存在其他 EGFR 基因突变(19-DEL 突变, G719S 突变),而转移 LN 标本中不存在;1 例转移 LN 标本中发现存在另外的 EGFR 基因突变(T790M),PT 中却未发现。

表 1 非鳞状 NSCLC 患者 EBUS-TBNA 获取的转移 LN 标本与 PT 标本中 EGFR 基因突变差异

Tab.1 Distinction of EGFR genetic mutation between PT samples and LN samples obtained by EBUS-TBNA in non-squamous NSCLC patients

患者 序号	EGFR 基因突变	
	PT 标本	转移 LN 标本
1	19-DEL 突变	野生型
2	L858R 突变	野生型
3	野生型	19-DEL 突变
4	19-DEL 突变;L858R 突变	L858R 突变
5	L858R 突变	L858R 突变;T790M
6	19-DEL 突变;G719S 突变	19-DEL 突变
7	19-DEL 突变	野生型
8	L858R 突变	野生型

2.3 PT 和转移 LN 标本中不同 EGFR 基因突变者 TKI 治疗疾病控制率比较

72 例患者中,34 例存在 EGFR 突变,28 例接受 EGFR-TKI 治疗,疾病控制率为 71.4% (20/28, PR 16 例, SD 4 例)。PT 和转移 LN 标本中 EGFR 基因突变一致者、不一致者疾病控制率分别为 70.0% (14/20, PR 12 例, SD 2 例)

和 75.0% (6/8, PR 4 例, SD 2 例)。PT 与转移 LN 标本 EGFR 突变不完全一致者疾病控制率为 66.7% (2/3, PR 1 例, SD 1 例)。PT 标本中 EGFR 基因突变而转移 LN 标本为野生型的患者疾病控制率为 75.0% (3/4, PR 2 例, SD 1 例)。另外,有 8 例 PT、转移 LN 均为野生型患者拒绝手术及化学治疗,给予 EGFR-TKI 治疗,疾病控制率为 12.5% (1/8, PR 1 例)。PT 和转移 LN 标本中 EGFR 基因突变一致者 TKI 治疗疾病控制率与突变不一致者比较差异无统计学意义($\chi^2 = 0.07, P > 0.05$)。

在 PT 和转移 LN 标本 EGFR 基因突变不完全一致的 3 例患者中,PT 标本 19-DEL 突变、L858R 突变而转移 LN 标本 L858R 突变的患者对 TKI 的反应为 PR;PT 标本 19-DEL 突变、G719S 突变而转移 LN 标本 19-DEL 突变的患者对 TKI 的反应为 PR;PT 标本 L858R 突变而转移 LN 标本 L858R 突变、T790M 突变的患者对 TKI 的反应为 PD。

3 讨论

本研究通过 EBUS-TNBA 技术获取晚期非鳞状 NSCLC 患者的转移 LN 标本,发现晚期非鳞状 NSCLC 患者通过 EBUS-TBNA 获取的转移 LN 标本和 PT 标本 EGFR 基因突变的一致率为 88.9% (64/72)。这种 EGFR 基因突变的高一致率表明对于晚期、非鳞状 NSCLC 患者通过 EBUS-TBNA 获取的转移 LN 标本可以用于检测 EGFR 基因突变,从而进一步选择治疗方案。

通过 EBUS-TBNA 获得的转移 LN 标本在 EGFR 检测中的关键因素是获取标本的体积。本研究行 EBUS-TBNA 时使用的 21G 针,而 21G 针已被证实可以用来获取组织条^[6]。有研究显示,EBUS-TBNA 获得的标本也适用于 EGFR 基因突变检测^[2,7]。同时,EBUS-TBNA 穿刺次数也会影响肿瘤体积,作者根据文献[8]的方法使用 EBUS-TBNA 对每个转移 LN 进行 3 次穿刺。结果显示,PT 和转移 LN 标本 EGFR 基因突变存在高一致率,表明使用 EBUS-TBNA 技术是获取转移 LN 标本行 EGFR 基因突变检测的有效途径。

EGFR 基因突变的差异可能与 EGFR 检测方法有关。ARMS 法具有很高的灵敏度,并已逐渐替代直接测序^[9]。但是,该方法作为评估 EBUS-TBNA 获取的标本在 EGFR 突变检测中的有效性仍需与其他检测方法进行对比研究。

PT 和转移 LN 标本 EGFR 基因突变检测存在差异的另一个潜在原因是肿瘤异质性,即肿瘤的癌细胞群中存在广泛的细胞遗传学和表观遗传变异^[10]。

一些研究已经证明,在同一肿瘤不同部位的 EGFR 基因突变状态存在异质性。BAI 等^[11]分析了 79 例 NSCLC 患者手术肿块不同部位的 EGFR 基因突变,发现 38% 的患者在 EGFR 基因突变中存在异质性。WEI 等^[12]研究发现,在 PT 的不同部位检测到的 EGFR 基因突变高度一致,而转移 LN 中 EGFR 基因突变率低于 PT,这表明转移部位不一定存在与 PT 相同的 EGFR 基因突变。与 PARK 等^[13]的研究结果相似,本研究的结果也显示在 PT 标本中可能会检测到更多的突变。目前,没有研究显示 PT 和转移 LN 标本之间 EGFR 基因突变的不一致性有多大程度与肿瘤内异质性和特异性克隆的转移有关,这仍需要进一步的研究。

SHIMIZU 等^[4]比较了 70 例患者手术标本的 PT 和转移 LN 中 EGFR 基因的突变状态,发现 11 例患者 PT 和转移 LN 标本中的突变一致,10 例患者只有 PT 标本存在突变,而且突变一致组的疾病控制率比仅 PT 突变组更高($P = 0.06$)。说明 PT 和转移 LN 的 EGFR 基因突变状态的一致性与患者对 EGFR-TKI 反应率相关。本研究发现,EGFR 基因突变患者采用 EGFR-TKI 治疗的疾病控制率(71.4%),且 EGFR 基因突变一致者与不一致者对 EGFR-TKI 治疗的疾病控制率比较差异无统计学意义。本研究还观察到 PD 期的 1 例患者存在 T790M 突变,这可能与 EGFR-TKI 耐药相关。有研究者认为,在靶向治疗前 EGFR 即有低拷贝 T790M 突变,而在靶向治疗后因克隆选择而占优势^[14]。本研究结果显示,PT 和转移 LN 标本中 EGFR 基因突变的差异与患者对 EGFR-TKI 的治疗反应率无显著关联,但是 PT 和转移 LN 标本中 EGFR 基因突变检测可以为患者后续治疗提供帮助。

本研究是一项小样本的回顾性研究,有一定局限性。另外,本研究未同一时间进行原发病灶和转移淋巴结的基因检测,可能也会影响结果。因此,需要更大样本多中心的前瞻性研究来进一步探索。

参考文献:

- [1] GAO G, REN S, LI A, *et al.* Epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor therapy is effective as first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer with mutated EGFR; a meta-analysis from six phase III randomized controlled trials[J]. *Int J Cancer*, 2012, 131(5): E822-E829.
- [2] NAVANI N, BROWN J M, NANKIVELL M, *et al.* Suitability of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration specimens for subtyping and genotyping of non-small cell lung cancer; a multicenter study of 774 patients[J]. *Am J Respir Crit Care*, 2012, 185(12): 1316-1322.
- [3] NGUYEN K S H, KOBAYASHI S, COSTA D B. Acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancers dependent on the epidermal growth factor receptor pathway[J]. *Clin Lung Cancer*, 2009, 10(4): 281-289.
- [4] SHIMIZU K, YUKAWA T, HIRAMI Y, *et al.* Heterogeneity of the EGFR mutation status between the primary tumor and metastatic lymph node and the sensitivity to EGFR tyrosine kinase inhibitor in non-small cell lung cancer[J]. *Target Oncol*, 2013, 8(4): 237-242.
- [5] OKADA H, ANAYAMA T, KUME M, *et al.* Comparison of epidermal growth factor receptor mutation analysis results between surgically resected primary lung cancer and metastatic lymph nodes obtained by endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration[J]. *Thorac Cancer*, 2012, 3(3): 262-268.
- [6] YARMUS L B, AKULIAN J, LECHTZIN N, *et al.* Comparison of 21-gauge and 22-gauge aspiration needle in endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration: results of the American college of chest physicians quality improvement registry, education, and evaluation registry[J]. *Chest*, 2013, 143(4): 1036-1043.
- [7] NAKAJIMA T, YASUFUKU K, NAKAGAWARA A, *et al.* Multi-gene mutation analysis of metastatic lymph nodes in non-small cell lung cancer diagnosed by endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration[J]. *Chest*, 2011, 140(5): 1319-1324.
- [8] LEE H S, LEE G K, LEE H S, *et al.* Real-time endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration in mediastinal staging of non-small cell lung cancer; how many aspirations per target lymph node station[J]. *Chest*, 2008, 134(2): 368-374.
- [9] KIM H J, LEE K Y, KIM Y C, *et al.* Detection and comparison of peptide nucleic acid-mediated real-time polymerase chain reaction clamping and direct gene sequencing for epidermal growth factor receptor mutations in patients with non-small cell lung cancer[J]. *Lung Cancer*, 2012, 75(3): 321-325.
- [10] GERLINGER M, ROWAN A J, HORSWELL S, *et al.* Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing[J]. *N Engl J Med*, 2012, 2012(366): 883-892.
- [11] BAI H, WANG Z, CHEN K, *et al.* Influence of chemotherapy on EGFR mutation status among patients with non-small-cell lung cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30(25): 3077-3083.
- [12] WEI B, YANG K, ZHAO J, *et al.* Quantification of EGFR mutations in primary and metastatic tumors in non-small cell lung cancer[J]. *J Exp Clin Canc Res*, 2014, 33(1): 5.
- [13] PARK S, HOLMES-TISCH A J, SHIM Y M, *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]. *J Thorac Oncol*, 2009, 4(7): 809-815.
- [14] MAHESWARAN S, SEQUIST L V, NAGRATH S, *et al.* Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells[J]. *New Engl J Med*, 2008, 359(4): 366-377.