论著

文章编号:1000-5404(2013)14-1520-04

非小细胞肺癌血浆 EGFR 突变与肿瘤标志物水平的关系

肖 何,王 阁,王 东,杨镇洲,杨宇馨 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心)

[摘要] **目的** 探讨非小细胞肺癌外周血游离 DNA 样本 EGFR 突变率与临床基线特征和血清肿瘤标志物表达水平的关系。**方法** 收集本院确诊为非小细胞肺癌 166 例。利用 PCR 和变性高效液相色谱法分析 EGFR19 和 21 外显子突变。其中 89 例同时利用多肿瘤标志物蛋白芯片检测系统检测癌胚抗原(CEA)、糖类抗原 125(CA125)、糖类抗原 153(CA153)等血清肿瘤标志物,分析突变率与临床基线特征和肿瘤标志物表达水平的关系。**结果** 166 例非小细胞肺癌中,EGFR 总突变率 19.9%。女性突变率显著高于男性($P=0.037$)。腺癌突变率高于其他组织学类型,但未达到显著水平($P=0.096$)。CEA、CA153 中高表达患者 EGFR 突变率显著高于低表达者($P=0.048$,$P=0.017$),CA199 高表达患者仅有高于中低表达者的趋势($P=0.093$)。多变量 Logistic 分析表明,组织学类型为腺癌,CA153、CEA 中、高表达与 EGFR 突变率相关。**结论** 对于晚期非小细胞肺癌,血浆 EGFR 突变率与血清肿瘤标志物表达水平明显相关。其标志物水平可作为进一步判断 EGFR 突变优势群体的因素。

[关键词] 非小细胞肺癌;表皮生长因子;血浆游离 DNA;突变;肿瘤标志物
[中图法分类号] R730.43;R734.2 [文献标志码] A

Relationship between plasma EGFR mutation and serum levels of tumor markers in non-small cell lung cancer

Xiao He, Wang Ge, Wang Dong, Yang Zhenzhou, Yang Yuxin (Cancer Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the relationship of epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation in plasma free DNA with clinical characteristics of baseline as well as serum expression levels of tumor markers in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** One hundred and sixty-six patients with pathologically confirmed NSCLC hospitalized in our department from June 2011 to June 2012 were enrolled in this study. Their clinical data and peripheral blood samples were collected. PCR and denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) were performed to detect EGFR mutations in exons 19 and 21 in the free DNA from the 166 samples of peripheral blood. The serum levels of 12 tumor makers, such as carcinoembryonic antigen (CEA), carbohydrate antigen (CA) 125, CA153 and so on, were analyzed with multi-tumor markers protein biochip detective system in 89 patients simultaneously. The relationships of EGFR mutation with the patients' clinical characteristics at baseline and with corresponding serum levels of tumor makers were analyzed. **Results** The total mutation rate of EGFR was 19.9% in 166 NSCLC patients, with that in females significantly higher than that in males ($P=0.037$). Though the rate was higher in adenocarcinoma than the other histological types, no significant difference was seen among them ($P=0.096$). The mutation rate was significantly higher in the patients with moderate and high serum levels of CEA and CA153 than those with mild expression levels ($P=0.048$, $P=0.017$). However, the rate was also high in those with high expression of CA199 than those with moderate and mild expression though without significant difference ($P=0.093$). Multivariable Logistic regression showed that adenocarcinoma, and moderate and high expression of CEA and CA153 were significantly correlated with EGFR mutation. **Conclusion** The mutation rate of EGFR is

[通信作者] 王 阁,电话:(023)68757171,E-mail: wangge70@hotmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130329.1016.011.html(2013-03-29)

significantly related with the serum levels of tumor markers in late NSCLC, and the serum levels can be a potential indicator to determine the EGFR mutation.

[**Key words**] non-small cell lung cancer; epidermal growth factor receptor; plasma free DNA; mutation; tumor markers

Corresponding author: Wang Ge, E-mail: wangge70@hotmail.com

自2004年Lynch等[1]报道了表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)激活突变与酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI)治疗缓解的药理机制以来,EGFR酪氨酸激酶区(tyrosine kinase, TK)激活突变与晚期非小细胞肺癌小分子TKI疗效的关系成为临床研究的热点。多项临床实验表明,EGFR19缺失突变和21外显子L858R置换突变是非小细胞肺癌TKI治疗获益的重要预测因子[2-4]。特别是对于一线TKI治疗,IPASS、WJTOG3405等Ⅲ期临床实验均表明,治疗前EGFR突变情况是选择治疗策略的重要因素[5-6]。变性高效液相色谱法(denaturing high-performance liquid chromatography, DHPLC)与突变检测的"金标准"直接测序法相比,具有快速、高通量、费用低廉等优点,其检测限可达3%~5%[7-8]。对于晚期非小细胞肺癌,国内外多项研究表明,从外周血检测EGFR突变率与配对石蜡样本直接测序法检测有较高符合率[8-10]。并且,国内已有研究者应用DHPLC法建立了晚期非小细胞肺癌患者血浆EGFR19、21外显子两个激活突变与TKI治疗缓解及长期疗效的关系[9-10]。本研究应用DHPLC法检测重庆地区经治后复发或转移的晚期非小细胞肺癌患者外周血EGFR19外显子缺失突变和21外显子L858R置换突变情况,并分析突变与临床基线特征及血清肿瘤标志物的关系。

1 材料与方法

1.1 患者资料

收集2011年6月至2012年6月在本院肿瘤中心住院肺癌患者外周血样本166例,所有患者经病理学证实为非小细胞肺癌。对EGFR19外显子缺失突变和21外显子L858R置换突变与基线临床特征进行分析。其中89例患者同时检测了12种血清肿瘤标志物。

1.2 EGFR突变分析和肿瘤标志物检测

EGFR突变检测样本全为外周血血浆游离DNA,EGFR突变采用变性高效液相色谱法,由北京市表观生物技术有限公司完成。12种肿瘤标志物采用湖北数康公司全自动化学发光检测分析,在本院肿瘤中心实验室完成。

1.3 统计学分析

采用SPSS 20.0统计软件,EGFR突变与基线特征构成比采用χ^2检验、χ^2连续性校正法或Fisher确切概率法。基线特征和血清肿瘤标志物表达水平与EGFR突变率的关系采用χ^2检验或Fisher确切概率法以及Logistic回归分析。

2 结果

2.1 患者资料

166例非小细胞肺癌患者,其中男性124例,女性42例;平均年龄61岁;临床分期ⅡA~ⅢA期42例,ⅢB~Ⅳ期124例;腺癌105例,92例有吸烟史。总共检测到突变33例,EGFR总突变率19.9%,其中19外显子缺失突变11例,21外显子L858R点突变22例。同时具有血清肿瘤标志物结果的89例亚组基线水平与总体无显著差异($P>0.05$)。

166例EGFR突变与基线关系分析中,EGFR突变率仅与性别存在显著相关性。女性突变率显著高于男性突变率($\chi^2=4.328$, $P=0.037$)。腺癌突变率高于非腺癌突变率,但差异无统计学意义($\chi^2=2.771$, $P=0.096$)。在89例亚组中,EGFR突变总共19例,突变率21.3%。女性突变率高于男性,腺癌突变率高于非腺癌,但差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

表1 血浆EGFR突变率与基线特征的关系

临床病理参数		总体			亚组		
		n	突变数[例(%)]	*P*	*n*	突变数[例(%)]	*P*
年龄(岁)	<65	104	21(20.2)	0.896	52	12(23.1)	0.637
	≥65	62	12(19.4)		37	7(18.9)	
性别	男	124	20(16.1)	0.037	70	13(18.6)	0.362
	女	42	13(31.0)		19	6(31.6)	
组织学类型	非腺癌	61	8(13.1)	0.096	35	4(11.4)	0.066
	腺癌	105	25(23.8)		54	15(27.8)	
吸烟史	有	92	17(18.5)	0.614	54	10(18.5)	0.418
	无	74	16(21.6)		35	9(25.7)	
分期	ⅡA~ⅢA	42	9(21.4)	0.771	16	4(25.0)	0.955
	ⅢB~Ⅳ	124	24(19.4)		73	15(20.5)	

2.2 突变与肿瘤标志物表达水平的关系

89例患者12种血清肿瘤标志物血清水平统计描述见表2。将标志物血清水平高于相应中位数的病例定为该种标志物中高水平,高于75%分位数的病例定为高水平。在12种肿瘤标志物中,与非小细胞肺癌相关的有CEA、CA125、CA153、CA199、CA242。只有CEA、CA153的中、高表达患者EGFR突

变率显著高于低表达者($\chi^2=3.911$, $P=0.048$; $\chi^2=5.681$, $P=0.017$),CA199 高表达患者仅有高于中、低表达者的趋势($\chi^2=2.826$, $P=0.093$)。见表3。

表2 12种血清肿瘤标志物表达水平

标志物	均值	标准差	25%分位数	中位数	75%分位数	最小值	最大值
CEA(ng/mL)	13.11	19.58	1.93	4.82	12.07	0.51	90.53
CA125(U/mL)	69.12	112.05	10.75	22.23	57.29	4.24	651.19
CA153(U/mL)	11.91	13.59	4.43	7.68	13.98	0.50	93.14
CA199(U/mL)	37.32	81.71	6.13	10.94	22.48	2.00	475.32
CA242(U/mL)	23.08	50.22	2.95	5.57	10.09	1.16	200.00
Ferritin(ng/mL)	187.38	117.07	87.36	157.71	273.17	16.03	568.45
NSE(ng/mL)	3.77	3.67	1.68	2.34	3.84	1.00	19.09
βHCG(mIU/mL)	0.79	0.97	0.16	0.42	1.03	0.04	4.49
AFP(ng/mL)	8.31	12.83	1.56	3.55	10.46	0.24	84.97
PSA(ng/mL)	0.78	0.97	0.15	0.42	1.03	0.04	4.49
fPSA(ng/mL)	0.28	0.32	0.03	0.18	0.38	0.02	1.44
HGH(ng/mL)	0.48	0.99	0.01	0.18	0.54	0.01	7.76

表3 血清肿瘤标志物表达水平与EGFR突变的关系

标志物	表达水平	n	突变数[例(%)]	P	表达水平	n	突变数[例(%)]	P
CEA	≥12.07	22	6(27.3)	0.630	≥4.82	43	13(30.2)	0.048
(ng/mL)	<12.07	67	13(19.4)		<4.82	46	6(13.0)	
CA125	≥57.29	22	4(18.2)	0.906	≥22.23	44	11(25.0)	0.406
(U/mL)	<57.29	67	15(22.4)		<22.23	45	8(17.8)	
CA153	≥13.98	21	4(19.0)	1.000	≥7.68	44	14(31.8)	0.017
(U/mL)	<13.98	68	15(22.1)		<7.68	45	5(11.1)	
CA199	≥22.48	22	8(36.4)	0.093	≥10.94	44	12(27.3)	0.177
(U/mL)	<22.48	67	11(16.4)		<10.94	45	7(15.6)	
CA242	≥10.09	21	6(28.6)	0.536	≥5.57	44	12(27.3)	0.177
(U/mL)	<10.09	68	13(19.1)		<5.57	45	7(15.6)	

2.3 Logistic 回归构建预测突变模型

选择上述 χ^2 检验 $P<0.1$ 者和两个重要临床参数(性别和组织学类型)作为二分类变量,以突变与否作为因变量,分别进行单变量 Logistic 回归分析,结果见表5。仅 CA153 和 CEA 回归系数的似然比假设检验有统计学意义。性别和组织学类型是重要的临床参数,因此这5个变量全作为候选变量,进行逐步向前回归,以 $P<0.15$ 作为变量入选标准,以 $P>0.2$ 作为变量排除标准。初步主效应模型见表6。其中,CA153 中、高表达是与 EGFR 突变最相关因素,其次为组织学类型和 CEA 中、高表达。判断 EGFR 突变优势人群的传统临床参数包括腺癌、女性、不吸烟等。在该研究群体中,Logistic 回归模型表明,腺癌且 CA153 和 CEA 大于中位浓度与 EGFR 突变相关。腺癌群体中,CA153 和 CEA 均大于中位浓度患者 EGFR 突变率约是小于中位浓度 EGFR 突变率的 8.31 倍,$OR=8.31$,95% CI(1.71, 40.23)。而在这89例中,实际优势比 $OR=6.00$ (8/8)/(2/12)。

表5 单变量 Logistic 回归分析结果

变量	回归系数(β)	标准误(SE)	OR(95% CI)	P
CA153 中、高表达	1.317	0.574	3.733(1.211, 11.505)	0.015 5
CEA 中、高表达	1.061	0.549	2.889(0.984, 8.481)	0.046 2
CA199 高表达	1.068	0.552	2.909(0.985, 8.590)	0.057 0
组织学类型	1.092	0.612	2.981(0.898, 9.892)	0.057 4
性别	0.705	0.581	2.024(0.648, 6.320)	0.235 5

表6 多变量逐步 Logistic 回归分析结果

变量	回归系数(β)	标准误(SE)	OR(95% CI)	P
CA153 中、高表达	1.272	0.595	3.567(1.111, 11.456)	0.033
组织学类型	1.085	0.640	2.959(0.845, 10.368)	0.090
CEA 中、高表达	0.845	0.576	2.329(0.754, 7.196)	0.142

3 讨论

本研究 EGFR 总体突变率只有 19.9%,低于同样用外周血游离 DNA 和 DHPLC 方法检测报道的 34.3%[9] 和 35.4%[10]。前者总样本 230 例,后者 744 例。尽管为单中心研究,由于样本量大,更能代表国内大多数肿瘤中心晚期非小细胞肺癌外周血 EGFR 突变率。最近,Bai 等[11]发现一线化疗可显著降低外周血 EGFR突变率。264 例ⅢB~Ⅳ期非小细胞肺癌患者一线两个化疗周期后,外周血 EGFR 突变率从治疗前 34.5%下降到治疗后 23.1%。本研究群体几乎所有患者接受了一线或二线化疗,可能是总体突变率较低的原因。

在没有根据基线特征选择患者的前期临床研究中,EGFR 突变率仅为 12.1%~14.8%[12-13]。在 IPASS 研究中,基于临床特征选择患者其总体突变率高达 59.7%,总群体 TKI 治疗的客观缓解率为 43.0%,而在突变亚组中,TKI 治疗客观缓解率达 71.2%[5]。在完全由 EGFR 突变患者构成的病例群体一线 TKI 治疗相似研究中,TKI 治疗客观缓解率为73.7%,与 IPASS 突变亚组非常接近[14]。因此,检测 EGFR 突变是患者接受 TKI 治疗受益的重要预测因素。传统的初步判断潜在突变的临床标准为女性、腺癌、不吸烟、亚裔人群等。该研究表明,血清肿瘤标志物表达水平与突变相关。通过 Logistic 回归分析,在传统的临床标准女性和腺癌基础上增加了两个因素,即 CEA 和 CA153 中、高表达。在 89 例群体中,总体突变率 21%(19/89),女性腺癌突变率 31%(5/16),而通过 CEA、CA153 及腺癌筛选,突变率增加到 50%(8/16),尽管与女性腺癌群体突变率无显著差异($\chi^2=1.166$, $P=0.280$)。

由于突变检测方法灵敏度的限制,起始基因组DNA质量是决定分析成功的关键。在病理标本情况下,可通过简单的HE染色,收集富含肿瘤细胞的区域作为基因组提取的起始材料。但是对于血浆样本,并没有判断游离DNA来源的标志物。晚期肺癌由于肿瘤负荷大,大量肿瘤细胞的坏死和凋亡其基因组DNA释放到血液循环中,因此在以组织配对样本突变作为标准下,血浆游离DNA样本检测突变有较高的灵敏度(68.4%),而对早期肺癌却非常低(14.8%)[10]。对于二、三线治疗患者,其肿瘤突变性质和肿瘤负荷都较初诊时有所变化。而血清肿瘤特异性表达标志物水平可作为反映肿瘤负荷的指标,间接地反映了血浆游离DNA的来源。事实上,在89例群体中,Mann Whitney *U*检验表明,突变亚群CA153水平有高于野生型亚群的趋势(中位值:10.61 U/mL *vs* 6.76 U/mL, $t=1.912$, $P=0.056$),而完全与分期无关($P=0.627$)。

由于样本数量的限制,以及总体突变比例较小的缘故,使得多项假设检验的*P*值未达到显著性,本研究也并未用独立验证集检验该预测模型的效能。Logistic回归中,保留*P*值未到达统计学意义的因子是为了与EGFR突变群体传统临床因素比较。实际上,在严格的0.05显著水平上,只有CA153与突变有关($P=0.022$)。这恰好说明了经治后的非小细胞肺癌群体与初诊群体在EGFR突变优势临床特征上的不同。近来,细胞角蛋白19片段(cytokeratin 19 fragment,CYFRA21-1)和鳞状细胞癌抗原(squamous cell carcinoma antigen,SCCAg)与CEA一起,在非小细胞肺癌诊断,晚期肺癌一线化疗疗效评估等方面有越来越多的研究,并且显示出较高的诊断价值和化疗疗效预测判断作用[15-17]。本研究血清标志物未分析细胞角蛋白19片段和鳞状细胞癌抗原的表达情况,将这两个因素加入预测模型可能会得到更稳健的结果。

参考文献:

[1] Lynch T J, Bell D W, 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] Shepherd F A, Rodrigues-Pereira J, Ciuleanu T, *et al*. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer[J]. N Engl J Med, 2005, 353(2): 123-132.

[3] 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) [corrected][J]. J Clin Oncol, 2003, 21(12): 2237-2246.

[4] Kris M G, Natale R B, Herbst R S, *et al*. Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial[J]. JAMA, 2003, 290(16): 2149-2158.

[5] Mok T S, Wu Y L, Thongprasert S, *et al*. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma[J]. N Engl J Med, 2009, 361(10): 947-957.

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

[7] Chin T M, Anuar D, Soo R, *et al*. Detection of epidermal growth factor receptor variations by partially denaturing HPLC[J]. Clin Chem, 2007, 53(1): 62-70.

[8] Kimura H, Suminoe M, Kasahara K, *et al*. Evaluation of epidermal growth factor receptor mutation status in serum DNA as a predictor of response to gefitinib (IRESSA)[J]. Br J Cancer, 2007, 97(6): 778-784.

[9] Bai H, Mao L, Wang H S, *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.

[10] Huang Z, Wang Z, Bai H, *et al*. The detection of EGFR mutation status in plasma is reproducible and can predict the efficacy of EGFR-TKI dynamically[J]. Thoracic Cancer, 2012, 3(4): 334-340.

[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] Kim E S, Hirsh V, Mok T, *et al*. Gefitinib versus docetaxel in previously treated non-small-cell lung cancer (INTEREST): a randomised phase Ⅲ trial[J]. Lancet, 2008, 372(9652): 1809-1818.

[13] Hirsch F R, Varella-Garcia M, Bunn P A Jr, *et al*. Molecular predictors of outcome with gefitinib in a phase Ⅲ placebo-controlled study in advanced non-small-cell lung cancer[J]. J Clin Oncol, 2006, 24(31): 5034-5042.

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

[15] Nisman B, Biran H, Heching N, *et al*. Prognostic role of serum cytokeratin 19 fragments in advanced non-small-cell lung cancer: association of marker changes after two chemotherapy cycles with different measures of clinical response and survival[J]. Br J Cancer, 2008, 98(1): 77-79.

[16] Wang J, Zhang N, Li B, *et al*. Decline of serum CYFRA21-1 during chemoradiotherapy of NSCLC: a probable predictive factor for tumor response[J]. Tumor Biol, 2011, 32(4): 689-695.

[17] 许崇安, 刘佳丽, 邢丽丽, 等. 血清细胞角蛋白19在预测进展期非小细胞肺癌患者化疗疗效及预后中的临床意义[J]. 中国肺癌杂志, 2010, 13(10): 954-961.

(**收稿**:2012-12-24;**修回**:2013-03-12)

(编辑 汪勤俭)