

• 标准与规范 •

中国非小细胞肺癌患者表皮生长因子受体基因突变检测专家共识(2016 版)

中国非小细胞肺癌患者表皮生长因子受体基因突变检测专家组

一、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)基因突变检测的临床意义

EGFR 是一种跨膜受体酪氨酸激酶, 该区域的激活即磷酸化对癌细胞增殖、生长的相关信号传递具有重要意义。因此, EGFR 作为癌症治疗的分子靶标受到普遍关注, 并陆续开发出了吉非替尼(gefitinib)、厄洛替尼(erlotinib)和埃克替尼(icotinib)等 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI)和抗 EGFR 抗体等^[1-4]。

大量研究结果显示, EGFR 基因突变状态是决定 EGFR-TKI 疗效最重要的预测因子。而 EGFR 基因突变的发生率在女性、非吸烟者、腺癌、亚裔人群中发生频率较高。EGFR 基因突变的发生率虽然在腺癌中较高, 但在未分化腺癌、腺鳞癌、小细胞癌(尤其是与腺癌的复合型)等患者中也经常可以检测到 EGFR 基因的突变^[1-22]。

在非小细胞肺癌患者中检测 EGFR 基因的突变状态具有重要的临床意义, 是决定患者是否能够应用 EGFR-TKI 治疗的先决条件。有鉴于此, 日本、欧盟的权威学术机构都已经组织专家制定了各自 EGFR 检测的专家共识。2011 年, 为了我国 EGFR 基因突变检测的规范化、确保检测结果的准确性, 中国非小细胞肺癌患者 EGFR 基因突变检测专家组制定了中国非小细胞肺癌患者 EGFR 基因突变检测专家共识^[23]。

然而在临床应用中, 约 10% ~ 15% 的晚期非小细胞肺癌患者由于肿瘤组织不足或无法获取肿瘤组织而未进行分子检测。一些前瞻性研究表明, 与肿瘤组织相比, 血液循环肿瘤 DNA(ctDNA)中 EGFR 突变检测同样具有较高的特异性, 但敏感度有待提高, ctDNA EGFR 突变阳性患者接受吉非替尼治疗

较标准化疗患者客观缓解率显著提高、无进展生存期显著延长^[24-25]。因此当肿瘤组织难以获取时, ctDNA 检测是突变分析合适的替代选择。基于此, 我们对 2011 版的共识^[23] 进行了更新, 此为更新的 2016 版。

二、EGFR 基因突变检测的一般原则

在进行 EGFR 基因突变检测时, 需要临床医师与病理医师协作与配合, 提高临床医师“EGFR 基因突变常规检测”的意识, 优化检测流程, 缩短检测周期。这样有益于使具有 EGFR 基因敏感突变的患者尽可能从 EGFR-TKI 的治疗中受益。

1. 哪些患者应接受 EGFR 基因突变检测? 在未经选择的中国非小细胞肺癌患者中 EGFR 基因的突变率约为 30%。为使患者尽可能地从最有效的治疗中受益, 只要条件许可, 所有非小细胞肺癌患者和含腺癌成分的其他类型肺癌患者都应当尝试进行 EGFR 基因突变检测。然而, 根据已知的流行病学数据, 不同人群中的突变率有较大差别。以病理类型而言, 腺癌患者的突变率大大高于非腺癌患者, 且亚裔腺癌患者的突变率可高达 50% 左右, 其中不吸烟、女性、非黏液性腺癌患者的突变率更高。以吸烟史而言, 非吸烟患者的突变率也高于吸烟患者, 即使有吸烟史的腺癌患者突变率也达到 30%, 因此对于肺腺癌患者应当常规进行 EGFR 基因突变检测。

2. 对进行 EGFR 基因突变检测实验室的基本要求: 进行 EGFR 基因检测的实验室须建立 PCR 标准实验室, 通过相关机构的认证, 符合中国卫生管理机构和国际的质量标准, 避免检测过程中的污染, 确保检测结果的准确性。工作人员应接受过 PCR 上岗培训, 且技能熟练。该实验室必须每年定期参加质控项目, 如 EMQN(国际)与国家卫生和计划生育委员会病理质量控制与评价中心(国内)室间质评项目。

3. EGFR 基因突变检测过程所需的时间: 对于非小细胞肺癌患者的治疗策略, EGFR 基因突变检

测所需的时间是一个关键因素,临床主管医师需要尽快获得检测结果,以确定患者后续的治疗方案。建议从接到标本及检测申请到出检测结果报告的总过程不超过 7 个工作日。

三、EGFR 基因突变检测标本及其处理

(一) 标本的类型

肿瘤部位手术切除标本、活检组织及细胞学标本均可用于 EGFR 基因突变检测。临床取材方法主要包括手术、纤维支气管镜下活检、经皮肺穿刺活检、胸水、胸腔镜、淋巴结穿刺活检、支气管内超声引导细针穿刺活检(EBUS FNA)等。无法获取足够肿瘤组织及细胞学标本的晚期肺腺癌患者,可用血液标本进行 EGFR 基因突变检测。原发灶或转移灶均适合检测。对于晚期转移肺癌患者或耐药患者推荐行重复活检,及时监测耐药突变。

(二) 组织/细胞标本的处理

无论采用哪种标本(除血液标本外)进行检测,均需保证达到以下的质量标准:

1. 标本的固定:组织标本推荐应用 4% 中性缓冲的甲醛液进行活检和手术切除标本的固定,避免使用含重金属离子的固定液,固定液量 ≥ 10 倍所固定标本的体积。标本从离体到固定时间不宜超过 30 min。活检组织标本一般固定 6~12 h,手术切除标本需固定 6~48 h。细胞学标本(痰液、胸水)固定应采用 95% 乙醇固定液,时间不少于 15 min;当需制成脱落细胞蜡块时,可用 95% 乙醇固定,时间 ≥ 2 h。

2. 组织切片:无论采用哪种标本类型,均应保证包含足够的肿瘤细胞,尽量剔除非肿瘤组织和细胞。推荐肿瘤细胞数量在 200 个以上,肿瘤细胞比例达 50%。应用灵敏度高的方法时可酌情降低。对于肿瘤细胞数量不达标的样本应该重新采集,对特殊情况(如患者无其他标本)者可继续检测,并在报告中注明(参考“DNA 的质量控制”)。一般需切厚度 5~10 μm 的切片 10 张以满足对肿瘤细胞数量的要求,切片时要有措施避免不同病例组织间的交叉污染。上述标本的处理与质量控制应由有经验的病理医师负责,所有标本均应该在尽量短的时间内完成检测。

(三) 血液标本的采集和处理

在血液的采集、运输及储存过程中严防白细胞的裂解及游离 DNA 的降解。为获取最佳的血浆标本用于后续的 EGFR 基因突变分析,建议采集 10 mL 全血,使用常规 EDTA 抗凝采血管(严禁使用肝素抗

凝管),常温(6~30 $^{\circ}\text{C}$)2 h 内,或使用专用常温采血管(含游离 DNA 保护剂及防细胞裂解保护剂),常温 5~7 d 内,充分低温离心 2 次,第一步低速离心 10 min(800~2 000 g),第二步高速(或低速)离心 10 min(2 000~16 000 g),两次离心有利于去除血浆中所有的细胞碎片^[26-27],然后分离出不含细胞成分的血浆,放置于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冻存直至 DNA 抽提,或直接进行 DNA 抽提。

四、EGFR 基因突变检测常用方法

1. 最佳的 DNA 提取方法:DNA 的提取必须使用经中国食品药品监督管理总局(CFDA)批准上市的提取试剂盒。当组织样本较少时,推荐使用简单的吸附柱提取法;当组织比较多时,可以采用针对甲醛固定石蜡包埋组织的 DNA 提取法。血液样本 ctDNA 提取推荐使用经 CFDA 批准的血液专用 ctDNA 提取试剂盒。

2. DNA 的质量控制:DNA 模板的浓度和质量直接影响检测的结果。为了提高检测成功率,建议对提取的 DNA 模板进行质量检测,以确定其符合一定的质量标准。DNA 标本不符合质量检测标准的,原则上不继续进行基因突变检测,特殊情况(如患者无其他可用标本)时可继续开展检测。如果标准的 EGFR 基因突变检测结果是阳性的,该结果可以报告给临床医师;如果 EGFR 基因突变检测的结果是阴性的,应报告为“未检测到突变”并备注由于标本的质量不达标不能排除突变的可能性,建议重新取样检测。

3. EGFR 基因突变检测技术:目前有很多 EGFR 基因突变检测的方法,包括直接测序法、基于即时(real-time)PCR 基础上的方法[如突变扩增阻滞系统(amplification refractory mutation system, ARMS)]、片段长度分析、变性高效液相色谱技术等。这些方法各有优势和劣势,不管使用何种检测方法,均应包括以下敏感及耐药突变。目前指南推荐的 EGFR 敏感突变包括外显子 19 缺失突变(19del)和外显子 21 点突变(L858R),以及双突变(19del/L858R, T790M/19del, T790M/L858R)和一些罕见突变(G719X, L861Q, S768I);另外还应包括两个耐药突变,外显子 20 插入突变(20ins)和外显子 20 点突变(T790M),近 90% 的 EGFR 基因突变是 19 外显子缺失突变(19del)和 21 外显子点突变(L858R)。细胞学标本肿瘤细胞数量及血液标本中 ctDNA 量一般较少,需应用灵敏度高的检测方法,且血液标本限于在有条件的实验室进行检测。未来灵敏度更高的

检测方法,如微滴式数字 PCR (ddPCR) 和二代测序等,待其方法成熟、经临床治疗效果验证并经 CFDA 认证后,将为使用 ctDNA 标本带来更为广阔的应用空间^[28-30]。

4. 检测结果的重复验证:如果发现了新的突变,应当重复进行检测。当测序结果差(使用测序法)时,或者循环阈值接近定义的下限值(使用 ARMS 法),或者不符合其他的质量标准时,也应当重复进行检测。如果检测失败,可以采取以下措施:从新的组织切片中提取 DNA;重新测序或 ARMS 检测;用不同的样品重复检测;与病理医师讨论其他的措施。在重复检测时,最好从组织采样重新开始,复杂的样品可以和主管的临床医师一起讨论。

五、EGFR 基因突变检测报告内容

完整的分子检测报告应包括样本信息、检测项目及方法、检测结果解读、报告签名及日期 4 方面内容。

1. 样本信息:患者的样本编号或病理号,患者的基本信息(姓名、性别、年龄),患者的样本信息(临床诊断、标本来源、活检方法、标本大小和质量、病理诊断类型、病理质控和 DNA 质控信息、接收日期)。

2. 检测项目及方法:检测项目及所使用的方法,检测范围及位点,检测方法的灵敏性及局限性。

3. 检测结果解读:对检测结果进行临床解读,明确指出基因检测结果与靶向治疗的关联。鉴于目前血液标本检测方法的特异性较好而灵敏度有限,建议血液检测结果为阴性时,报告为“未检测到突变”,并补充“基于检测技术和标本原因建议患者取活检标本再次检测”。

4. 报告签名及日期:EGFR 基因检测报告应由检测者及经过培训的医师共同签字、签署报告日期,留下实验室联系方式。其他相关的意见也应当记录下来以便更好地解释检测结果。

中国非小细胞肺癌患者表皮生长因子受体基因突变检测专家组成员(按单位名称汉语拼音字母顺序排列):北京大学医学部病理学系(张波);北京大学肿瘤医院病理科(林冬梅);北京胸科医院病理科(张海青);北京医院病理科(王征);成都军区昆明总医院病理科(杨举伦);第二军医大学附属长海医院病理科(郑建民、朱明华);第三军医大学附属西南医院病理研究所(阎晓初);第四军医大学西京医院病理科(叶菁);福建省肿瘤医院病理科(陈刚);复旦大学附属中山医院病理科(侯英勇);复旦大学附属肿瘤医院病理科(周晓燕);复旦大学医学院病理科(朱虹光);广东省人民医院病理科(刘艳辉);广西壮族自治区人民医院病理科(莫祥兰);哈尔滨医科大学附属第一医院病理科(吴鹤);河

南省人民医院病理科(孔令非);河南省肿瘤医院病理科(马杰);华中科技大学同济医学院同济医院病理科(段亚琦);吉林大学白求恩医学院附属第二医院病理科(高洪文);江苏省人民医院病理科(张智弘);江苏省中医院病理科(章宜芬);解放军总医院病理科(石怀银);空军总医院病理科(任力);南方医科大学南方医院病理科(梁莉);南京军区南京总医院病理科(饶秋、周晓军);上海交通大学附属上海市胸科医院病理科(张杰),肺内科(韩宝惠);上海市肺科医院病理科(武春燕),呼吸科(周彩存);首都医科大学宣武医院病理科(滕梁红);四川大学华西医院病理科(步宏、刘卫平),肿瘤中心胸部肿瘤科(卢铀);天津医科大学肿瘤医院病理科(张丹芳);西安交通大学附属第一医院病理科(张冠军);浙江大学医学院病理科(毛峰嵘);浙江大学医学院附属第一医院病理科(丁伟);浙江大学医学院附属邵逸夫医院病理科(许颂霄);浙江省肿瘤医院病理科(孙文勇);郑州大学附属第一医院病理科(姜国忠、李文才);中国医科大学附属第一医院病理科(邱雪杉、王恩华);中国医学科学院北京协和医学院北京协和医院病理科(刘彤华、梁智勇、曾瑄),呼吸内科(王孟昭);中国医学科学院肿瘤医院病理科(应建明),肿瘤内科(石远凯);中南大学附属湘雅医院病理科(周建华);中日友好医院病理科(笪冀平);中山大学附属第一医院病理科(王连唐);中山大学附属肿瘤医院病理科(邵建永)

参 考 文 献

- Mitsudomi T, Yatabe Y. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene and related genes as determinants of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors sensitivity in lung cancer [J]. Cancer Sci, 2007, 98 (12): 1817-1824. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2007.00607.x.
- Douillard JY, Ostoros G, Cobo M, et al. First-line gefitinib in Caucasian EGFR mutation-positive NSCLC patients: a phase-IV, open-label, single-arm study [J]. Br J Cancer, 2014, 110 (1): 55-62. DOI: 10.1038/bjc.2013.721.
- Rekhtman N, Paik PK, Arcila ME, et al. Clarifying the spectrum of driver oncogene mutations in biomarker-verified squamous carcinoma of lung: lack of EGFR/KRAS and presence of PIK3CA/AKT1 mutations [J]. Clin Cancer Res, 2012, 18 (4): 1167-1176. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2109.
- Tatematsu A, Shimizu J, Murakami Y, et al. Epidermal growth factor receptor mutations in small cell lung cancer [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14 (19): 6092-6096. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0332.
- Mok T, Wu YL, Thongprasert S, et al. Phase III, randomized, open-label, first-line study of gefitinib vs carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients with advanced non-small cell lung cancer (ESMO 2008, LBA2) [J]. Ann Oncol, 2008, 19 (suppl 8): viii.
- 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. DOI: 10.1016/S1470-2045(09)70364-X.
- 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. DOI: 10.1056/NEJMoa0909530.
- [8] Takano T, Fukui T, Ohe Y, et al. EGFR mutations predict survival benefit from gefitinib in patients with advanced lung adenocarcinoma: a historical comparison of patients treated before and after gefitinib approval in Japan [J]. J Clin Oncol, 2008, 26 (34):5589-5595. DOI: 10.1200/JCO.2008.16.7254.
- [9] NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines[®]) Non-Small Cell Lung Cancer Version 2. 2014. [EB/OL]
- [10] Douillard JY, Hirsh V, Mok T, et al. Molecular and clinical subgroup analyses from a phase III trial comparing gefitinib with docetaxel in previously treated non-small cell lung cancer (INTEREST) [J]. J Clin Oncol, 2008, 26 (suppl): Abstr 8001.
- [11] Sekine I, Ichinose Y, Nishiwaki Y, et al. A randomized phase III study to compare the overall survival of gefitinib (IRESSA) versus docetaxel in Japanese patients with previously treated advanced non-small-cell lung cancer [J]. J Thorac Oncol, 2007, 2 (suppl 4, Abstr B3-01): S339-S340.
- [12] Pirker R, Herth FJ, Kerr KM, et al. Consensus for EGFR mutation testing in non-small cell lung cancer: results from a European workshop [J]. J Thorac Oncol, 2010, 5 (10): 1706-1713. DOI: 10.1097/JTO.0b013e3181f1c8de.
- [13] Rikova K, Guo A, Zeng Q, et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer [J]. Cell, 2007, 131 (6): 1190-1203. DOI: 10.1016/j.cell.2007.11.025.
- [14] Davies KD, Doebele RC. Molecular pathways: ROS1 fusion proteins in cancer [J]. Clin Cancer Res, 2013, 19 (15): 4040-4045. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2851.
- [15] Ou SH, Camidge DR, Engelman J, et al. Clinical activity of crizotinib in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) harboring ROS1 gene rearrangement [J]. Ann Oncol, 2012, 23 (Suppl 9): ix389-ix399.
- [16] Camidge DR, Bang YJ, Kwak EL, et al. Activity and safety of crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: updated results from a phase 1 study [J]. Lancet Oncol, 2012, 13 (10): 1011-1019. DOI: 10.1016/S1470-2045(12)70344-3.
- [17] 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, 40 (10): 660-663. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2011.10.004.
- [18] 王立帅, 张瑜, 陆小军, 等. 双环探针特异引物荧光聚合酶链反应法检测非小细胞肺癌表皮生长因子受体基因突变 [J]. 中华病理学杂志, 2011, 40 (10): 667-670. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2011.10.006.
- [19] 赵静, 朱焱, 张丽, 等. 非小细胞肺癌表皮生长因子受体基因突变检测及其临床意义 [J]. 中华病理学杂志, 2011, 40 (10): 671-674. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2011.10.007.
- [20] 张杰, 吴洁, 高慧, 等. 肿瘤表皮生长因子受体基因突变和扩增与临床病理相关性研究 [J]. 中华病理学杂志, 2011, 40 (10): 675-678. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2011.10.008.
- [21] Beasley MB, Milton DT. ASCO provisional clinical opinion: epidermal growth factor receptor mutation testing in practice [J]. J Oncol Pract, 2011, 7 (3): 202-204. DOI: 10.1200/JOP.2010.000166.
- [22] Liang Z, Zhang J, Zeng X, et al. Relationship between EGFR expression, copy number and mutation in lung adenocarcinomas [J]. BMC Cancer, 2010, 10: 376. DOI: 10.1186/1471-2407-10-376.
- [23] 中国非小细胞肺癌患者表皮生长因子受体基因突变检测专家组. 中国非小细胞肺癌患者表皮生长因子受体基因突变检测专家共识 [J]. 中华病理学杂志, 2011, 40 (10): 700-702. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2011.10.014.
- [24] Goto K, Ichinose Y, Ohe Y, et al. Epidermal growth factor receptor mutation status in circulating free DNA in serum: from IPASS, a phase III study of gefitinib or carboplatin/paclitaxel in non-small cell lung cancer [J]. J Thorac Oncol, 2012, 7 (1): 115-121. DOI: 10.1097/JTO.0b013e3182307f98.
- [25] Douillard JY, Ostoros G, Cobo M, et al. Gefitinib treatment in EGFR mutated caucasian NSCLC: circulating-free tumor DNA as a surrogate for determination of EGFR status [J]. J Thorac Oncol, 2014, 9 (9): 1345-1353. DOI: 10.1097/JTO.0000000000000263.
- [26] El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, et al. Circulating cell free DNA: preanalytical considerations [J]. Clin Chim Acta, 2013, 424: 222-230. DOI: 10.1016/j.cca.2013.05.022.
- [27] Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells [J]. N Engl J Med, 2008, 359 (4): 366-377. DOI: 10.1056/NEJMoa0800668.
- [28] Liu X, Lu Y, Zhu G, et al. The diagnostic accuracy of pleural effusion and plasma samples versus tumour tissue for detection of EGFR mutation in patients with advanced non-small cell lung cancer: comparison of methodologies [J]. J Clin Pathol, 2013, 66 (12): 1065-1069. DOI: 10.1136/jclinpath-2013-201728.
- [29] Douillard JY, Ostoros G, Cobo M, et al. Gefitinib treatment in EGFR mutated caucasian NSCLC: circulating-free tumor DNA as a surrogate for determination of EGFR status [J]. J Thorac Oncol, 2014, 9 (9): 1345-1353. DOI: 10.1097/JTO.0000000000000263.
- [30] Goto K, Ichinose Y, Ohe Y, et al. Epidermal growth factor receptor mutation status in circulating free DNA in serum: from IPASS, a phase III study of gefitinib or carboplatin/paclitaxel in non-small cell lung cancer [J]. J Thorac Oncol, 2012, 7 (1): 115-121. DOI: 10.1097/JTO.0b013e3182307f98.

(收稿日期:2016-01-04)

(本文编辑:常秀青)