

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2016.10.017

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2016.10.017

两种突变特异性抗体用于肺腺癌EGFR基因突变的评价

卢建平¹, 师怡^{2,3}, 何银珠², 陈宝珍², 王晓江², 周冬梅¹, 许春伟^{1,2}, 陈刚^{1,2,3}

(福建医科大学教学医院, 福建省肿瘤医院, 1. 病理科; 2. 分子病理室, 福州 350014;

3. 福建省肿瘤转化医学重点实验室, 福州 350014)

[摘要] 目的: 验证EGFR 19delE746-A750和21L858R突变抗体的灵敏度和特异性以及免疫组织化学与RT-PCR方法的一致性, 并探讨免疫组化在肺腺癌EGFR基因突变状态评价中的应用。方法: 采用免疫组织化学方法对139例经过RT-PCR验证EGFR基因突变状态的病例进行检测。并采用SPSS19.0软件对两种方法的检测结果进行一致性分析。结果: 与RT-PCR结果相比, EGFR delE746-A750和L858R突变抗体的总体敏感性为78.5%, 特异性为93%。分别分析EGFR delE746-A750和L858R特异抗体, 前者的敏感性和特异性分别是64.3%和97.8%, 后者为90.3%和95.2%。采用SPSS19.0软件进行Kappa检验显示免疫组化和RT-PCR的结果高度一致。结论: EGFR delE746-A750和L858R突变抗体具有良好的灵敏度和特异性, 结合全自动免疫组化仪进行EGFR基因突变检测是一种经济便捷可靠的方法。

[关键词] 肺腺癌; EGFR突变; 免疫组织化学

Evaluation of EGFR mutations in lung adenocarcinoma with two mutation specific antibodies

LU Jianping¹, SHI Yi^{2,3}, HE Yinzhu², CHEN Baozhen², WANG Xiaojiang², ZHOU Dongmei¹,
XU Chunwei^{1,2}, CHEN Gang^{1,2,3}

(1. Department of Pathology; 2. Department of Molecular Pathology Laboratory, Fujian Provincial Cancer Hospital, Teaching Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350014; 3. Fujian Provincial Key Laboratory of Translational Cancer Medicine, Fuzhou 350014, China)

Abstract **Objective:** To verify the sensitivity and specificity of the two EGFR mutation antibodies: 19delE746-A750 and 21L858R, and to discuss the application of immunohistochemistry in evaluating the EGFR mutations in lung adenocarcinoma. **Methods:** 139 cases were detected by immunohistochemistry which the EGFR mutation status were verified by RT-PCR firstly, then analysis the consistency of the results by software SPSS19.0. **Results:** Compared to the results of RT-PCR, the overall sensitivity and specificity of EGFR delE746-A750 and L858R mutation antibodies were 78.5% and 93%. The sensitivity and specificity of EGFR delE746-A750 mutation antibodies was 64.3% (former) vs. 90.3% (the latter), and the sensitivity and specificity of EGFR

收稿日期 (Date of reception): 2016-07-06

通信作者 (Corresponding author): 陈刚, Email: naichengang@126.com

基金项目 (Foundation item): 国家临床重点专科建设项目 (2013), 福建省卫生系统中青年骨干人才培养项目 (2015-ZQN-JC-08)。This work was supported by National Clinical Key Specialty Construction Program (2013), Health System Talent Training Project for Young and Middle-aged in Fujian Province (2015-ZQN-JC-08), P. R. China.

L858R mutation antibodies was 97.8% (former) vs. 93% (the latter). The results of immunohistochemical and RT-PCR were highly consistent analysed by SPSS19.0. **Conclusion:** The EGFR delE746-A750 and L858R mutation antibodies have a good sensitivity and specificity, combined with automatic immune-histochemical method for EGFR mutation detection which is economical and convenient and reliable.

Keywords lung adenocarcinoma; EGFR mutation; immunohistochemistry

肺癌确诊时大部分已属中晚期, 不宜手术治疗, 化疗效果近数十年来也没有显著提高。近几年随着肿瘤分子机制的研究不断深入, 发现了多个可用于治疗非小细胞肺癌的特异性靶点, 从而开启了肺癌个体化治疗的新时代。其中表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是目前最主要的靶点之一。2004年, Paez等和Lynch等^[1-2]首先报道了酪氨酸激酶抑制剂对EGFR发生激活突变的患者具有显著的疗效, 且女性、非吸烟、腺癌患者、亚洲人更容易发生EGFR激活突变。临床实验表明以吉非替尼和厄洛替尼为代表的TKIs治疗敏感性与EGFR基因突变显著相关。EGFR发生突变的患者中, 大约有75%对TKI治疗有反应。因此对EGFR基因突变的检测是患者能否采用TKI进行靶向治疗的重要依据。EGFR基因突变主要发生在胞内TK区域的前四个外显子上(18-21)^[1-2], 目前发现的TK区域突变有30多种, 其中外显子19的缺失突变(delE746-A750)和外显子21上的替代突变(L858R)约占突变的90%^[3], 因此又叫经典突变或热点突变, 而19外显子的突变率(45%~50%)高于21外显子(35%~45%)^[4-6]。目前检测EGFR基因突变的主要方法有直接测序法和RT-PCR法。近两年, 随着EGFR基因经典突变特异性抗体的出现, 使得传统的免疫组化方法也成为可能的检测方法之一。本文主要采用了RT-PCR方法和免疫组化方法, 对不同克隆号的抗体检测结果进行比较, 旨在验证突变抗体的特异性和敏感性, 探讨免疫组化在肺腺癌EGFR基因突变状态评价中的应用。

1 资料与方法

1.1 标本来源

选取福建省肿瘤医院2010年至2013年手术切除、支气管镜活检的肺癌石蜡包埋标本共139例。其中, 男性61例, 女性78例。平均年龄58.7岁(33~79岁)。手术切除标本117例, 小标本22例。未见淋巴结转移131例, 淋巴结转移8例。高、中分化腺癌92例, 低、未分化腺癌47例。以上病例均采用RT-PCR方法和免疫组化方法进行EGFR不同

位点突变的检测。本研究经成员单位医院学伦理委员会批准, 所有患者均知情同意。

1.2 试剂与仪器

一抗NaspinA、TTF-1、CK5/6、p63、CD56、Syn、CgA均购自福州迈新公司; 全自动免疫组化仪BENCHMARK-XT为美国罗氏公司产品; 石蜡标本组织DNA提取试剂盒购于德国Qiagen公司; EGFR外显子19和21的基因突变检测试剂盒由厦门艾德公司提供; RT-PCR仪为StratageneMx3000P。

1.3 RT-PCR 检测

基因组DNA提取取5~10片4 μm厚肿瘤细胞石蜡切片, 按试剂盒操作说明书提取基因组DNA。ND1000分光计测定DNA浓度, 纯度要求OD260/280在1.8~2.0之间为合格标本。实时荧光定量法分析EGFR19和21外显子基因突变 实时荧光定量PCR反应体系包括: 5~10 pM特异性引物, 20 pM双环探针, 模板15 ng、Master Mix及Taq酶和水。反应循环参数为: 95 °C 2 min使DNA双链打开; 95 °C 25 s, 64 °C 20 s, 72 °C 20 s, 循环15次进行扩增; 93 °C 25 s, 60 °C 35 s, 72 °C 20 s, 循环3次以收集荧光信号。每次试验均设定各突变的阴、阳性对照及外控对照孔。结果判读: 以阴性对照扩增曲线的最高点为准设定阈值。Ct值<26的样本判定为阴性样本; Ct≥29的样本判定为阳性样本; 26≤Ct<29的样本则计算该样品的ΔCt值。若该样品的ΔCt值小于相对应的ΔCt Cut-off值, 则仍判定为阳性; 反之则为阴性。19-del和L858R的ΔCt Cut-off值为11。

1.4 免疫组织化学染色

采用Roche/Ventana公司的EGFR19外显子delE746-A750缺失突变抗体(Roche, Lot: D00268, 即用型)和21外显子L858R点突变抗体(Roche, Lot: C11941, 即用型)。免疫组化染色在Roche全自动免疫组化仪BMKXT上进行。抗体修复时间及孵育时间参考厂家抗体说明书。DAB

检测系统使用Roche/Ventana公司的Optiview DAB Detection Kit(Roche, Lot: D04629)。

1.5 染色评分标准

按照细胞质和(或)细胞膜染色强度以及阳性细胞数量进行评分: 细胞无阳性着色或 $\leq 10\%$ 的癌细胞弱着色被认为是阴性表达; $>10\%$ 的癌细胞弱、中等或强着色均认为是阳性表达。免疫组织化学染色结果评估时采用双盲法处理, 评估病理医师不知道相关病例EGFR基因突变的PCR结果。两位病理医生独立阅片, 结果有异议时再次讨论, 共同分析, 统一判断。

1.6 统计学处理

采用SPSS19.0软件对两种方法的实验结果进行Kappa检验。Kappa <0.4 表示两种实验方法的结果一致性不好, Kappa >0.7 两种实验方法的结果一致性好, $0.4 \leq \text{Kappa} \leq 0.7$ 时越趋于0.7, 说明趋于一致。

2 结果

在139例标本中, 经RT-PCR验证的EGFR19外显子突变阳性的标本46例, 其中E746-A750缺失突变42例, 其他位点突变4例; 21外显子L858R突变阳性标本51例; 野生型标本42例。免疫组织化学方法检测delE746-A750和L858R的突变阳性标本数量分别为27例和46例(表1)。与RT-PCR结果相比, EGFRdelE746-A750和L858R突变抗体的总体敏感性为78.5%(73/93), 特异性为93%(39/42)。两种方法检测结果的一致性分析及单独对19外显子delE746-A750和21外显子L858R的突变特异性抗体结果分析如下:

2.1 RT-PCR 与 IHC 方法对 19 外显子

del E746-A750和21外显子L858R检测结果一致性分析: 采用SPSS19.0进行一致性分析, 两种实验方法检测19外显子delE746-A750结果的Kappa值为0.619, 检测21外显子L858R结果的Kappa值为0.827。表明两种实验方法的结果高度一致, 其中21外显子L858R的检测结果一致性要优于19外显子delE746-A750。

2.2 第 19 外显子 delE746-A750 缺失突变特异性抗体实验结果

经免疫组化检测发现, 19外显子delE746-A750缺失突变抗体阳性染色主要定位在胞膜和胞浆, 不同病例显示出染色存在强、中及弱的差别(图1A-C), 且同一病例不同区域的癌细胞染色强度不一, 存在异质性。42例RT-PCR结果已知delE746-A750突变阳性病例中有27例免疫组化检测阳性, 4例19外显子其他位点突变的病例免疫组化结果均为阴性。42例野生标本中, 1例免疫组化检测阳性。19外显子敏感性64.3%(27/42), 特异性97.8%(45/46)。

2.3 第 21 外显子 L858R 突变特异性抗体实验结果

经免疫组化检测发现, 21外显子L858R突变抗体阳性染色主要定位在胞膜和胞浆, 不同病例显示出染色存在强、中及弱的差别(图1D-F), 且同一病例不同区域的癌细胞染色强度不一, 存在很强的异质性。51例RT-PCR结果阳性病例中有46例免疫组化检测阳性。42例野生标本中, 2例免疫组化检测阳性。21外显子敏感性90.3%(46/51), 特异性95.2%(40/42)。

表1 139例标本EGFR基因外显子19和外显子21的RT-PCR及免疫组化检测结果对比

Table 1 The comparison results of EGFR gene exon 19 and exon 21 by RT-PCR and immunohistochemical detection results in 139 tissues

RT-PCR	例数	免疫组化		
		L858R	E746_750 del	wt-EGFR
E746_750del	42	0	27	15
E19del其他类型	4	0	0	4
L858R	51	46	0	5
wt-EGFR	42	2	1	39
合计	139	48	28	63

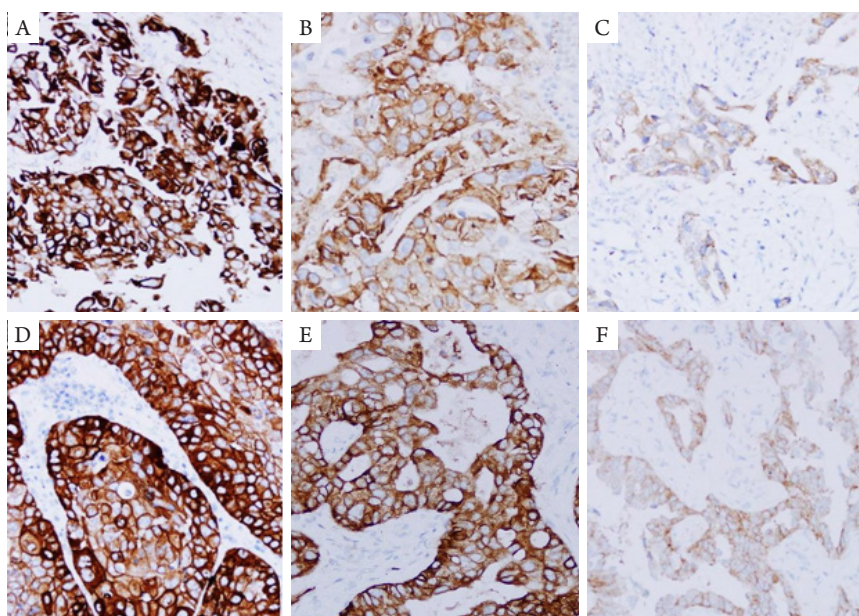


图1 免疫组化方法对EGFR突变的评价

Figure 1 The evaluation of immunohistochemical method for EGFR mutations

(A-C)外显子21 L858R突变特异抗体结果: 强>中>弱(MaxVision, × 400); (D-F)外显子19 del E746-A750突变特异抗体结果: 强>中>弱(MaxVision, × 400)。

(A-C) The result of the exon 21 L858R mutations specific antibody: Strong>Middle>Weak (MaxVision, × 400); (D-F) the result of the exon 19 del E746-A750 mutations specific antibody: Strong>Middle>Weak (MaxVision, × 400).

3 讨论

EGFR-TKI靶向药物对EGFR基因突变的肺腺癌患者在临床取得良好疗效, 近来对EGFR基因突变的检测也越来越广泛。研究^[7]显示亚洲人种肺腺癌中EGFR基因突变的比例高达40%, 远高于北美和欧洲20%的突变率, 因此准确而快速的检测显得尤为重要。

目前最常用的EGFR基因突变检测方法是RT-PCR和直接测序。这两种方法都是基于基因水平的检测, 具有很好的灵敏度和特异性, 但自身的缺点也限制了他们的普及与推广。比如需要建设规范化的PCR实验室及培训专门的技术人员; 设备昂贵; 检测时间长, 费用高, 需要考虑患者的承受能力; 结果受标本的影响较大等等^[8-9]。而免疫组化方法在病理科或实验室属于常规开展技术, 费用较低, 患者易于接受。同时全自动免疫组化技术, 实现了保证质控的前提下检测时间大大缩短。同时一些穿刺标本或胸腹水标本, 由于癌细胞数量较少, 目标DNA量达不到分子检测要求, 不能进行RT-PCR检测, 可能漏诊。而免疫组化则不受癌细胞数量的限制, 可特异性标记出阳性细胞从而有助于病理医生更好地做出判断。

继Yu等^[10]报道了采用EGFR delE746-A750和L858R的突变抗体评价EGFR突变状态后, 国内外学者也进行了相关研究。绝大部分研究采用的都是美国CST(Cell Signaling Technology)公司的突变抗体, 免疫组化一般采用手工或半自动仪器进行。文献^[11-17]报道该抗体敏感性为38%~100%, 特异性为62.5%~100%。本研究采用Roche/Ventana即用型抗体, 所有抗体和检测试剂均通过FDA认证, 可用于体外诊断。整个检测在Roche/Ventana BenchMark XT上全自动进行。抗体的总体敏感性和特异性分别为78.5%和93%。分别分析EGFR基因del E746-A750和L858R特异抗体, 前者的敏感性和特异性分别是64.3%和97.8%, 后者为90.3%和95.2%。该结果与樊祥山等^[17]报道很接近(78.5% : 83.1%和93% : 95.7%)。其中第19外显子的敏感性略有差异(64.3% : 72.0%)。与Cooper等^[12]报道相比, L858R特异抗体敏感性和特异性相近(90.3% : 85.7%和95.2% : 98.5%), delE746-A750抗体特异性相近(97.8% : 98%), 但敏感性有较大差别(64.3% : 100%)。总体来看, 两个不同公司的抗体在敏感性与特异性上差别不大。就本研究而言, 19外显子特异抗体的敏感性要远低于21外显子(64.3% : 90.3%), 特异性方面则略高

(97.8% : 95.2%)。原因可能是19外显子突变类型较多, 而且突变率较高, 而免疫组化只检测delE746-A750位点的突变, 而未检测到19del其他类型突变, 所以敏感性方面较低, 与张晴等^[16]研究对比, 19和21特异抗体的特异性存在较大的差别(97.8% : 77.6%和95.2% : 62.5%), 本研究结果均高于张晴等。分析原因可能有两点, 一是检测方法不同, 全自动免疫组化机采用高温修复, 抗原修复时间较长, 一抗孵育时间则较短。而手工法采用高压修复, 时间较短, 一抗孵育时间则较长。不同处理可能会导致抗原不同程度的表达。二是结果的判读方法不同, 不同医生之间判读的差异容易导致结果的差异。

值得一提的是, 本研究中4例19外显子delE746-A750以外的突变病例, 采用delE746-A750抗体检测均为阴性, 初步显示了该抗体良好的特异性。42例RT-PCR验证的野生型标本中, 有2例大标本L858R抗体呈弱阳性着色。1例小标本delE746-A750抗体呈强阳性着色。重复IHC检测仍然阳性。究其原因, 可能是小标本中癌细胞数量较少, 未达到RT-PCR方法的检测灵敏度。而如樊祥山等^[17]所分析, 是否免疫组化标记的弱阳性为“假阳性”还有待进一步的研究证实。

与以往的大部分研究相比, 本研究采用的SP111和SP125克隆号(即用型)抗体, 其灵敏度和特异性结果与其相近, 而且即用型的抗体使用时更加方便可靠。采用SPSS19.0软件对免疫组织化学和RT-PCR的实验结果进行一致性分析发现, 两种方法的结果高度一致。因此, 免疫组化法可以用于EGFR基因突变的临床筛查。但影响免疫组化的主观因素也不可小视。本研究采用FDA认证通过的抗体及仪器全自动进行检测, 极大地减少了人为误差; 同时, 随着研究的发展与深入, 建立统一的判读标准, 减少因判读标准的不一致而导致的结果差异也尤为重要。本研究结果表明, 采用全自动免疫组化法进行EGFR基因突变检测是一种经济便捷可靠的方法。

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. Sharma SV, Bell DW, Settleman J, et al. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(3): 169-181.
4. Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, et al. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2005, 97(5): 339-346.
5. Marchetti A, Martella C, Felicioni L, et al. EGFR mutations in non-small-cell lung cancer: analysis of a large series of cases and development of a rapid and sensitive method for diagnostic screening with potential implications on pharmacologic treatment[J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(4): 857-865.
6. Sequist LV, Bell DW, Lynch TJ, et al. Molecular predictors of response to epidermal growth factor receptor antagonists in non-small-cell lung cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(5): 587-595.
7. Li AR, Chitale D, Riely GJ, et al. EGFR mutations in lung adenocarcinomas: clinical testing experience and relationship to EGFR gene copy number and immunohistochemical expression[J]. *J Mol Diagn*, 2008, 10(3): 242-248.
8. Rekhtman N, Brandt SM, Sigel CS, et al. Suitability of thoracic cytology for new therapeutic paradigms in non-small cell lung carcinoma: high accuracy of tumor subtyping and feasibility of EGFR and KRAS molecular testing[J]. *J Thorac Oncol*, 2011, 6(3): 451-458.
9. da Cunha Santos G, Saieg MA, Geddie W, et al. EGFR gene status in cytological samples of nonsmall cell lung carcinoma: controversies and opportunities[J]. *Cancer Cytopathol*, 2011, 119(2): 80-91.
10. Yu J, Kane S, Wu J, et al. Mutation-specific antibodies for the detection of EGFR mutations in non-small-cell lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(9): 3023-3028.
11. Kitamura A, Hosoda W, Sasaki E, et al. Immunohistochemical detection of EGFR mutation using mutation-specific antibodies in lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(13): 3349-3355.
12. Cooper WA, Yu B, Yip PY, et al. EGFR mutant-specific immunohistochemistry has high specificity and sensitivity for detecting targeted activating EGFR mutations in lung adenocarcinoma[J]. *J Clin Pathol*, 2013, 66(9): 744-748.
13. Wen YH, Brogi E, Hasanovic A, et al. Immunohistochemical staining with EGFR mutation-specific antibodies: high specificity as a diagnostic marker for lung adenocarcinoma[J]. *Mod Pathol*, 2013, 26(9): 1197-1203.
14. Sholl LM, Xiao Y, Joshi V, et al. EGFR mutation is a better predictor of response to tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung carcinoma than FISH, CISH, and immunohistochemistry[J]. *Am J Clin Pathol*, 2010, 133(6): 922-934.
15. Brevet M, Arcila M, Ladanyi M. Assessment of EGFR mutation status

- in lung adenocarcinoma by immunohistochemistry using antibodies specific to the two major forms of mutant EGFR[J]. *J Mol Diagn*, 2010, 12(2): 169-176.
16. 张晴, 张杰. 肺腺癌表皮生长因子受体基因突变特异性抗体的应用[J]. *中华病理学杂志*, 2013, 42(3): 168-172.
ZHANG Qing, ZHANG Jie. Mutation-specific antibodies for detection of epidermal growth factor receptor mutations in patients with lung adenocarcinoma[J]. *Chinese Journal of Pathology*, 2013, 42(3): 168-172.
17. 樊祥山, 刘标, 余波, 等. 免疫组织化学标记检测肺腺癌表皮生长因子受体基因E746-A750缺失和L858R点突变的临床应用[J]. *中华病理学杂志*, 2013, 42(3): 173-177.
FAN Xiangshan, LIU Biao, YU Bo, et al. Using epidermal growth factor receptor mutation-specific antibodies of delE746-A750 and L858R in lung adenocarcinomas[J]. *Chinese Journal of Pathology*, 2013, 42(3): 173-177.

本文引用: 卢建平, 师怡, 何银珠, 陈宝珍, 王晓江, 周冬梅, 许春伟, 陈刚. 两种突变特异性抗体用于肺腺癌EGFR基因突变的评价[J]. *临床与病理杂志*, 2016, 36(10): 1552-1557. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2016.10.017

Cite this article as: LU Jianping, SHI Yi, HE Yinzhu, CHEN Baozhen, WANG Xiaojiang, ZHOU Dongmei, XU Chunwei, CHEN Gang. Evaluation of mutations of *EGFR* gene in lung adenocarcinoma with two mutation specific antibodies[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2016, 36(10): 1552-1557. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2016.10.017