

靶向测序技术对铂类耐药卵巢癌多基因检测分析*

雷雨¹, 于娇², 何莉¹, 段宝军¹, 白俊^{1**}

(1. 陕西省人民医院 肿瘤内科, 陕西 西安 710068; 2. 陕西省人民医院 放疗科, 陕西 西安 710068)

[摘要] 目的: 了解铂类耐药晚期卵巢上皮癌患者癌症相关的50个基因突变状态。方法: 使用高通量测序技术, 选择美国国立综合癌症网络(NCCN)提出的与肿瘤用药、致癌基因通路及肿瘤检测相关的50个基因、256个热点突变位点进行检测, 分析铂类耐药卵巢上皮癌患者50个基因的突变状态, 包括基因突变类型、突变率、错义突变数和错义突变发生率。结果: 15例标本的50个基因的检测中, 17个基因发生突变, 突变率32%, 每个标本平均有7.47个突变, 其中PDGFRA、RET是最常见基因突变类型; 在17个基因112个突变中, 共检出错义突变16个, 缺失突变4个, 错义突变中TP53发生率为68.75% (12/16), PIK3CA、KRAS、SMAD4、EGFR各检出1个错义突变, 缺失突变中均为TP53基因突变; 7例标本中检出EGFR 9个突变, 8例同义突变, 1例错义突变, 其中EGFR基因错义突变为外显子21 L858R。结论: 铂类耐药卵巢上皮癌中TP53基因突变可能是最常见的错义和缺失突变, EGFR外显子21L858R突变使用埃克替尼有效, 提示对于晚期卵巢癌EGFR敏感基因突变, 可尝试行EGFR-TKIs治疗。

[关键词] 卵巢肿瘤; 癌基因; 突变; 高通量基因检测; 组织病理

[中图分类号] R737.31; R361.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2017)07-0799-04

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.07.013

Analysis of Targeted Sequencing Technology on Multiple Gene Detection of Platinum Resistant Ovarian Cancer

LEI Yu¹, YU Jiao², HE Li¹, DUAN Baojun¹, BAI Jun¹

(1. Department of Oncology, Shaanxi People's Hospital, Xi'an 710068, Shaanxi, China; 2. Department of Radiotherapy, Shaanxi People's Hospital, Xi'an 710068, Shaanxi, China)

[Abstract] Objective: To understand 50 gene mutation status related to patients with platinum resistant critical stage ovarian epithelial cancer. **Methods:** Adopting high-throughput sequencing technology to detect 50 genes, 256 hot-spot mutant sites related to antitumor drugs, oncogene pathways, and tumor detection proposed by NCCN; analyzing 50 gene mutation status related to patients with platinum resistant critical stage ovarian epithelial cancer, including mutant types, mutation rate, missense mutations number and its incidence rate. **Results:** Of all 50 genes detection of 15 samples, 17 genes were mutated, the mutation rate was 32%; average 7.47 mutations in each sample, which PDGFRA and RET are the most common mutations. Of all the 112 mutations in 17 genes, 16 missense mutations and 4 deletion mutations were detected. The missense mutation TP53 incidence rate is 68.75% (12/16), and one missense mutation is detected in PIK3CA, KRAS, SMAD4 and EGFR. Deletion mutations were all TP53 gene mutation. 9 EGFR mutations were detected in 7 samples, among which 8 samples were synonymous mutations and 1 sample was missense mutation. The EGFR missense mutations locus was exon 21 L858R. **Conclusion:** TP53 mutation might be the most common missense and deletion mutations in platinum resistant ovarian epithelial cancer. The effective use of Icotinib in EGFR exon

*[基金项目] 陕西省科技厅基金资助项目(2015YX-7)

**通信作者 E-mail: Baijun123@sina.com

网络出版时间: 2017-07-13 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20170713.2305.025.html>

21L858R showed the use of EGFR-TKIs treatment could be possible for the sensitive gene mutation in critical stage ovarian cancer.

[**Key words**] ovarian cancer; oncogene; mutation; high throughput gene detection; tissue pathology

卵巢癌是女性生殖系统常见的恶性肿瘤之一,发病率及死亡率分别位居女性恶性肿瘤的第 8 位及第 7 位^[1]。我国每年约有 5.21 万卵巢癌新发病例,死亡病例为 2.25 万,是威胁女性健康的重要疾病之一^[2]。卵巢癌中约 85%~90% 是上皮性癌,而约 2/3 患者初诊时已处于晚期,预后极差。晚期卵巢癌的标准治疗包括分期/减瘤手术和以铂类为基础的个体化化疗。一线紫衫类和铂类联合化疗的有效率高达 80% 以上,但多数在治疗后出现进展,其中铂类耐药复发卵巢癌治疗有效率低、生存期短,是治疗的难点。肿瘤实质上是一种基因病,肿瘤的发生、发展、转移、恶化都与基因突变有着密切联系,根据肿瘤的基因状态选择和研发相应靶向药物是当前肿瘤研究的热点。卵巢上皮癌是一组具有高度异质性肿瘤^[3],但对于继发铂类耐药卵巢癌的基因状态,目前尚无相关研究。高通量测序技术的兴起以及测序成本的大幅降低为个体化医疗的实现提供了极大的便利,相较于传统的 Sanger 测序或者聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 方法,高通量测序可以实现同时多基因、多样本、精细化检测^[4],本研究使用高通量测序技术,选择美国国立综合癌症网络 (national comprehensive cancer network, NCCN) 提出的与肿瘤用药、致癌基因通路及肿瘤检测相关的 50 个基因、256 个热点突变位点进行检测,了解铂类耐药卵巢癌患者的相关癌症 50 个基因突变状态,为基因用药选择及研发新药物提供方向。

1 材料与方法

1.1 标本

2013 年 1 月~2015 年 12 月晚期卵巢上皮癌 15 份。入组标本:(1) 诊断卵巢上皮癌明确;(2) 使用铂类过程中出现疾病进展或铂类治疗结束 6 月内出现疾病进展;(3) 判定铂类耐药后新鲜穿刺组织,病理证实为癌组织,肿瘤新鲜组织要求 > 25 mg,约黄豆大小,未坏死肿瘤组织比例大于 50%。

1.2 方法

(1) 采用 QIAamp DSP Virus Spin Kit 试剂盒对组织和白细胞进行 DNA 提取;(2) DNA 定量 (Qu-

bit 2.0), 样本中 DNA 的 qubit 定量浓度 > 50 mg/L;(3) 使用 KAPA Biosystems 方法建库;(4) CA50 panel: *ALK*、*BRAF*、*EGFR*、*KIT*、*KRAS*、*PDGFRA*、*PIK3CA*、*ABL1*、*AKT1*、*APC*、*ATM*、*CDH1*、*CDKN2A*、*CSF1R*、*CTNBN1*、*ERBB2*、*ERBB4*、*FBXW7*、*FGFR1*、*FGFR2*、*FGFR3*、*FLT3*、*GNAS*、*HNF1A*、*HRAS*、*IDH1*、*JAK3*、*KDR*、*MET*、*MLH1*、*MPL*、*NOTCH1*、*NPM1*、*NRAS*、*PTEN*、*PTPN11*、*RBI*、*RET*、*SMAD4*、*SMARCB1*、*SMO*、*SRC*、*STK11*、*TP53*、*VHL*、*EZH2*、*GNA11*、*GNAQ*、*IDH2*、*JAK2*;(5) 样品上机深度测序(测序仪: Ion Torrent Proton);(6) 使用北京圣谷同创科技发展有限公司的 SV-ctDNAfilter 进行背景突变过滤;(7) 对突变点进行汇总。

2 结果

2.1 组织 DNA 标本的突变状态

在对 15 例标本的 50 个基因检测中,17 个基因发生突变,突变率 32%,每个标本平均有 7.47 个突变(表 1),其中 *PDGFRA*、*RET* 是最常见基因突变类型。15 例标本中均检出上述 2 个基因突变,其他常见基因突变分别是 *TP53* (12/15)、*FGFR3* (11/15)、*APC* (8/15)、*EGFR* (7/15)、*HRAS* (5/15),而 *SMO*、*ALK*、*KRAS*、*PIK3CA*、*ATM*、*KDR*、*MET*、*SMAD4*、*STK11*、*KIT* 则发生率较低(图 1)。15 例标本中,最常见的突变类型是单核苷酸变异 (single nucleotide variation, SNV),其标本突变率是 94.6%,而插入缺失 (insertion and deletion, Indel) 突变率为 3.6%,多核苷酸变异 (multiple nucleotide polymorphism, SNP) MNP 突变率为 1.8%。

2.2 错义突变情况

在 17 个基因 112 个突变中,共检出错义突变 16 个。*TP53* 发生率为 68.75 (12/16),*PIK3CA*、*KRAS*、*SMAD4*、*EGFR*、*KDR* 各检出 1 个错义突变。在 *TP53* 错义突变中,8 个突变位于外显子 4,2 个突变位于外显子 5,1 个位于外显子 7。*TP53* 外显子 4 错义突变均为 c.215C > G (p. P72R),外显子 5 错义突变分别为 c.527G > T (p. C176F) 和 c.524G > A (p. R175H),外显子 7 错义突变为 c.713G > T (p. C238F)。*PIK3CA* 错义突变为外显子 9

c. 1633G > A (p. E545K), *KRAS* 错义突变为外显子 2 c. 35G > A (p. G12D), *SMAD4* 错义突变为外显子 8 c. 1082G > A (p. R361H), *EGFR* 错义突变为外显子 21 c. 2573T > G (p. L858R), *KDR* 错义突变为外显子 11 c. 1416A > T (p. Q472H)。

2.3 缺失突变情况

在 17 个基因 112 个突变中,共检出缺失突变 4 个,均为 *TP53* 基因,分别发生于外显子 4、5、7、8,具体为:外显子 4 c. 314delG p. 105fs, 外显子 5 c. 472_480del9 p. 158_160, 外显子 7 c. 723delC

p. C242fs, 外显子 8 c. 875 887del13 p. 292fs。

2.4 EGFR 突变情况

在 15 例标本中检出 *EGFR* 9 个突变,8 例同义突变,1 例错义突变。同义突变 7 个位于 20 外显子,1 个位于 15 外显子。1 个错义突变位于 21 外显子。具体突变类型为:外显子 20 c. 2361G > A (p. Q787 Q), 外显子 15 c. 1839C > A (p. A613A)。1 例错义突变为外显子 21 c. 2573T > G (p. L858R)。

表 1 15 例晚期卵巢上皮癌患者突变基因和突变状态

Tab. 1 Mutation gene and mutation status of 15 critical stage ovarian epithelial cancer

基因名称	样本号														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
PDGFRA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
RET	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
TP53	1	1 2	3	2	1	1 2	1	1	1	1			2		1
FGFR3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					1
APC	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					1
EGFR	1							1	1	1	1	1	1		
HRAS	1	1			1			1							1
SMO								1					1	1	
ALK				1											1
KRAS										1		1			
PIK3CA				1											
ATM	1														
KDR											1				
MET						1									
SMAD4										3		1			
STK11									1						
KIT				1											

注:1 为 SNV,2 为 Indel,3 为 MNP

3 讨论

本研究使用高通量测序技术,对 15 例铂类耐药卵巢上皮癌患者标本的 50 个基因进行检测,共发现 17 个基因共 112 个突变,上述突变中,多数为同义突变,同义突变率为 82.14%,错义及缺失突变率为 17.86%。*TP53* 基因突变占到所有病例的 80%,并且为最常见的错义及缺失突变基因。我们知道 *TP53* 基因是重要的抑癌基因,其代表产物通过保护细胞内的 DNA 来维持基因组的遗传稳定

性,突变的 *TP53* 基因在较晚期和进展型的肿瘤组织中常见,因此 *TP53* 被称为细胞的“关卡”基因^[5-6]。动物模型中引入突变 *TP53*,肿瘤的生长和转移更迅速,提示 *TP53* 突变具有促进上皮性、间质性肿瘤细胞浸润和转移的获得性功能^[7-8]。*TP53* 基因突变在卵巢上皮癌不同类型中差异明显,在高级别浆液性卵巢癌中显著升高^[3],是划分卵巢癌预后分组的重要指标^[9-10]。本研究中,*TP53* 基因错义及缺失突变显著高于其他突变类型,该突变是化疗前即存在还是在治疗中由于基因不稳定选择性获得,值得进一步明确。

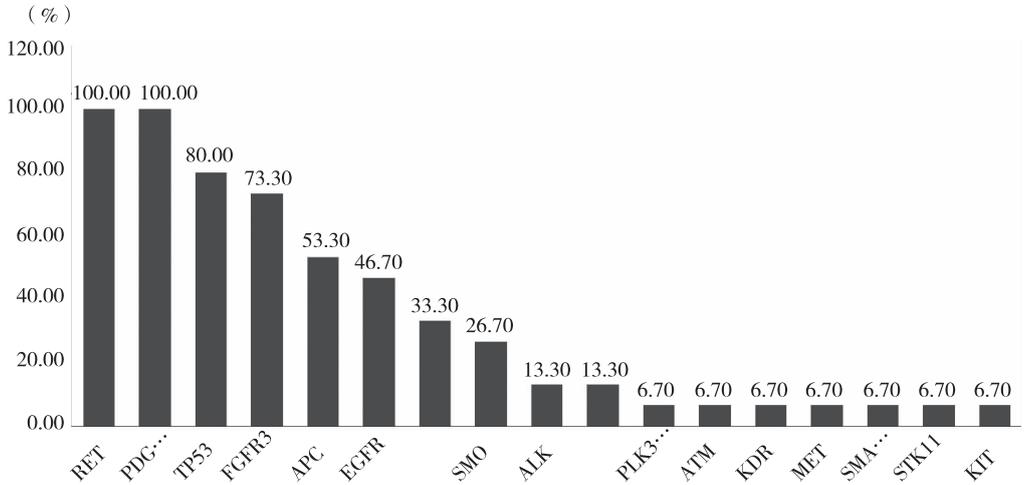


图 1 15 例晚期卵巢上皮癌患者基因突变率

Fig. 1 Mutation rate of 15 critical stage ovarian epithelial cancer

目前市场上还没有针对 *TP53* 基因突变的药物,但已有对相关药物的临床研究,并取得了一些成果,如在针对该突变信号通路方面,因为 *TP53* 缺陷肿瘤细胞 DNA 损伤修复依赖 G2 阻滞,Wee1 蛋白激酶作为 G2/M 期检查点关键激酶,通过特异性阻断该分子从而协同增强 DNA 损伤药物作用, *AZD1775* 作为 Wee1 激酶抑制剂在 II 期临床中显示在 *TP53* 突变的卵巢癌中其和化疗联合相较单纯化疗的优势^[11],同时 ganetespib^[12] 和小分子抑制剂 *APR-246*^[13] 在前期研究中显示其具有影响突变 *P53* 蛋白功能并增强化疗药物杀伤作用。

在本研究中出现 1 例 *EGFR* 外显子 21 L858R 的错义突变,该突变在非小细胞肺癌中属于敏感基因突变(如 G719X、19del、L858R、L561Q)具有使用 *EGFR*-TKIs 药物指证,但对于卵巢癌上皮癌是否可以使用没有文献报道。1 例 *EGFR* 外显子 21 L858R 的错义突变的患者年龄 64 岁,病理类型高级别浆液性卵巢癌,基因突变状况见表 1 标本 13,在 *EGFR* 突变中同时含有外显子 15、20、21 外显子突变,其中外显子 15、20 为同义突变,该患者于 2014 年 5 月使用埃克替尼进行治疗,1 月后疗效评价为 PR, PFS11 月。当疾病进展后重新穿刺行 50 基因检测, *EGFR* 外显子 15、21 突变未再检出,仅检出外显子 20 同义突变;而 *TP53* 由外显子 5 的缺失突变,变为外显子 4 的错义突变,余基因突变状态同前。1 例 *EGFR* 外显子 21 L858R 的错义突变的病例提示对于晚期卵巢癌 *EGFR* 敏感基因突变,可尝试行 *EGFR*-TKIs 治疗,该结果同“篮子”试验

的结果一致。同时动态观察基因状态变化,显示晚期卵巢癌基因状态的不稳定,提示肿瘤治疗过程中需要通过组织活检或“液体活检”(采取循环肿瘤 DNA)^[14] 的方式实时监测肿瘤的基因状态,及时调整治疗。

高通量测序技术为进一步识别驱动基因,选择及开发特异性靶向药物,从而提供个体化治疗提供了可能。本研究采用高通量基因测序手段对 15 例晚期铂类耐药患者的组织学进行检测,初步了解了上述患者的基因状态,为进一步了解上述群体驱动基因状态,为选择后续靶向治疗的选择及药物研究提供了依据。

4 参考文献

[1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. *Ca A Cancer Journal for Clinicians*, 2015 (2):87-108.

[2] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *Ca A Cancer Journal for Clinicians*, 2016(2):115-132.

[3] Network TCGA. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma[J]. *Nature*, 2011(7):609-615.

[4] Simbolo M. Next-generation sequencing for genetic testing of familial colorectal cancer syndromes[J]. *Hered Cancer Clin Pract*. 2015(6):392-395.

[5] Vaseva AV, Moll UM. The mitochondrial p53 pathway [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2009(5):414-420.

(下转第 807 页)

- (2):183-185.
- [6] 吴松远, 温静雅. 联合检测血清 CEA、CA125、NSE 与 CYFRA21-1 在肺癌诊断中的临床意义[J]. 实用临床医药杂志, 2014(19):67-70.
- [7] Peng Y-F, Huang J, Chen G-J, et al. Significance of serum neuron-specific enolase before treatment in predicting brain metastases and prognosis of advanced non-small cell lung cancer[J]. Chinese Journal of Oncology, 2015(7):508-511.
- [8] Chu XB, Hou WA, Song ZQ, et al. Diagnostic values of SCC, CEA, Cyfra21-1 and NSE for lung cancer in patients with suspicious pulmonary masses: a single center analysis[J]. Cancer Biology & Therapy, 2011(12):995-1000.
- [9] Sigari B, Mohsenpour B, Nikkhoo B, et al. Determination of the best prognostic value of serum tumor markers in patients with suspected lung cancer in an Iranian population [J]. Clinical Laboratory, 2014(1):23-27.
- [10] 朱琳, 郭广宏. 血清 CEA、CYFRA21-1、NSE、SCC 和 ProGRP 联合检测在肺癌诊断中的价值[J]. 标记免疫分析与临床, 2016(11):1237-1241.
- [11] Wang YZ, Piao XH, Zhang WL, et al. The concentration of CYFRA 21-1, NSE and CEA in cerebro-spinal fluid can be useful indicators for diagnosis of meningeal carcinomatosis of lung cancer[J]. Cancer Biomarkers, 2013(2):123-130.
- [12] 洪军, 孙爱军. 血清 CEA、CA125、CYFRA21-1、NSE 联合检测在肺癌诊断中的应用价值[J]. 河北医药, 2014(5):697-699.
- [13] 王文涛, 张国俊. CEA、CYFRA21-1、NSE、CA125 联合检测在肺癌诊断中的价值[J]. 中国实验诊断学, 2014(2):224-226.
- [14] 孙艳华, 孙钧, 郑继伟. 血清 CEA、NSE、SCC-Ag 与 CYFRA21-1 联合检查对肺癌的诊断价值[J]. 武警医学, 2014(7):660-662.
- [15] Chen YX, Zhang C, Huang KN, et al. Effects of thoracic paravertebral block on postoperative analgesia and serum level of tumor marker in lung cancer patients undergoing video-assisted thoracoscopic surgery[J]. Chinese Journal of Lung Cancer, 2015(2):104-109.
- (2017-03-18 收稿, 2017-06-25 修回)
中文编辑: 刘平; 英文编辑: 周凌

(上接第 802 页)

- [6] Olivier M, Langerod A, Carrieri P, et al. The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer[J]. Clinical Cancer Research An Official Journal of the American Association for Cancer Research, 2006(4):1157-1167.
- [7] Caulin C, Nguyen T, Lang GA, et al. An inducible mouse model for skin cancer reveals distinct roles for gain-and loss-of-function p53 mutations[J]. Yearbook of Dermatology & Dermatologic Surgery, 2007(7):1893-1901.
- [8] Doyle B, Morton JP, Delaney DW, et al. p53 mutation and loss have different effects on tumorigenesis in a novel mouse model of pleomorphic rhabdomyosarcoma[J]. Journal of Pathology, 2010(2):129-137.
- [9] Skfirnisdóttir I, Seidal T, Sorbe B. A new prognostic model comprising p53, EGFR, and tumor grade in early stage epithelial ovarian carcinoma and avoiding the problem of inaccurate surgical staging[J]. International Journal of Gynecological Cancer, 2004(2):259-270.
- [10] Graeff PD, Crijns APG, Jong SD, et al. Modest effect of p53, EGFR and HER-2 | neu on prognosis in epithelial ovarian cancer: a meta-analysis[J]. British Journal of Cancer, 2009(1):149-159.
- [11] Laing N, Lai Z, Barrett JC, et al. Abstract 337: Genetic analysis of tumors from a phase II trial evaluating AZD1775, carboplatin and paclitaxel in patients with TP53-mutant ovarian cancer[J]. British Journal of Cancer, 2016(4):337-339.
- [12] Liu H, Xiao F, Serebriiskii IG, et al. Network analysis identifies an HSP90-central hub susceptible in ovarian cancer[J]. Clinical Cancer Research An Official Journal of the American Association for Cancer Research, 2013(18):5053-5067.
- [13] Lehmann S, Bykov VJ, Ali D, et al. Targeting p53 in vivo: a first-in-human study with p53-targeting compound APR-246 in refractory hematologic malignancies and prostate cancer[J]. Journal of Clinical Oncology Official Journal of the American Society of Clinical Oncology, 2012(29):3633-3639.
- [14] Lebofsky R, Decraene C, Bernard V, et al. Circulating tumor DNA as a non-invasive substitute to metastasis biopsy for tumor genotyping and personalized medicine in a prospective trial across all tumor types[J]. Mol Oncol, 2015(4):783-790.
- (2017-03-11 收稿, 2017-06-23 修回)
中文编辑: 刘平; 英文编辑: 赵毅