

[文章编号] 1000-2200(2010)08-0788-04

· 临床医学 ·

非小细胞肺癌表皮生长因子受体 P848L 突变及其功能研究

郑翠侠¹, 韩兵¹, 周翔², 张荣新³, 万欢英², 臧旺福², 陈中元²

[摘要] **目的:**检测一组中国非小细胞肺癌(non-small-cell lung cancer, NSCLC)患者的表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)突变情况,探讨检出的1例EGFR突变类型P848L的功能特征。**方法:**收集55例手术或活检确诊的NSCLC标本,抽提细胞DNA,对EGFR的1~27号外显子进行筛查以检出突变情况;利用EGFR野生型全长基因载体,通过定点诱变技术构建出P848L突变型,进一步构建出P848L突变与T790M突变的双重突变体,分别转入293T细胞,观察细胞EGFR磷酸化活性及EGFR靶向抑制剂吉非替尼对其磷酸化的抑制作用。**结果:**共发现8例NSCLC携带EGFR突变,均为腺癌患者,占非吸烟腺癌患者的34.78%(8/23);其中1例NSCLC患者携带P848L突变体的细胞对吉非替尼的抑制反应与野生型相近,低于经典型突变体;当引入T790M形成双重突变后,对吉非替尼的反应性显著下降。**结论:**EGFR激活突变在非吸烟的肺腺癌患者具有较高的发生率,而在鳞状细胞癌等类型未发现;P848L突变不能增强吉非替尼对EGFR受体酪氨酸磷酸化的抑制效应,在携带P848L突变的EGFR基因上,引进耐药的T790M突变,能完全抑制其对吉非替尼的敏感性。

[关键词] 癌,非小细胞肺;表皮生长因子受体;突变;P848L

[中国图书资料分类法分类号] R 734.2 [文献标识码] A

Epidermal growth factor receptor P848L mutation and its function in non-small-cell lung cancer

ZHENG Cui-xia¹, HAN Bing¹, ZHOU Xiang², ZHANG Rong-xin³, WAN Huan-ying², ZANG Wang-fu², CHEN Zhong-yuan²

(1. Department of Respiration, The 9th People's Hospital of Shanghai, Shanghai 200011; 2. Department of Respiration,

Ruijin Hospital, Shanghai 200025; 3. Department of Oncosurgery, The First Affiliated Hospital of

Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the mutation status of epidermal growth factor receptor (EGFR) in Chinese non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients, and after detected a rare mutant type of EGFR, P848L, to further study its functional feature. **Methods:** Fifty-five NSCLC samples were enrolled in the study. The total DNA was extracted, then the 1-27 exons were sequenced for the detection of mutation. The P848L mutant EGFR construct and then the T790M mutation was generated by introducing a point mutation into the wildtype EGFR vector using a site-directed mutagenesis kit. **Results:** There were 8 cases of mutations being detected, all the mutation-harboring patients were non-smoker with pathologic type of adenocarcinoma. *In vitro* study demonstrated that the P848L mutant had a similar response to gefitinib treatment, and P848L and T790M double mutant did respond to gefitinib. **Conclusions:** EGFR mutations occurred in only non-smoker patients with lung adenocarcinoma in this series. P848L mutant EGFR has a similar response as the wildtype to gefitinib treatment, while double mutated with T790M diminished the response completely.

[Key words] carcinoma, non-small-cell lung; epidermal growth factor receptor; mutation; P848L

非小细胞肺癌(non-small-cell lung cancer, NSCLC)的形成与多基因功能异常有关,是一种渐进性的具有异质性的疾病,其中表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)过表达或突变是一个重要的因素,并且在NSCLC的预后和治疗中起着重要的作用^[1]。研究^[2]表明,EGFR突变在亚裔、女性、非吸烟者以及肺腺癌患者中有较高的发生率,可达25%左右,而高加索人群及非特异性人

群的EGFR突变发生率仅约为9%。在EGFR突变的NSCLC中,约85%的突变类型为第19号外显子的缺失突变和第21号外显子L858R替代突变,即所谓的经典型突变。这类突变的EGFR自身磷酸化活性增强,可以不依赖外源性配体结合而形成自体磷酸化,即所谓组成性活化,并介导下游的信号转导,引起细胞增殖和抗凋亡能力增强。但携带经典EGFR突变的NSCLC患者,对靶向治疗药物小分子酪氨酸激酶抑制剂(TKI)治疗具有显著的疗效^[3-4],甚至获得临床完全缓解。然而对于其他少见类型的EGFR突变功能研究甚少。我们对一组NSCLC患者的肿瘤标本进行EGFR突变筛查,发现8例突变,并对其中1例少见的突变类型P848L替代突变的功能进行深入研究,现作报道。

[收稿日期] 2010-03-15

[作者单位] 1. 上海市第九人民医院呼吸科, 200011; 2. 上海瑞金医院呼吸科, 200025; 3. 蚌埠医学院第一附属医院肿瘤外科, 233004

[作者简介] 郑翠侠(1966-),女,硕士,主任医师。

1 资料与方法

1.1 一般资料 55 例肺癌患者的标本来自上海瑞金医院(28 例)和蚌埠医学院第一附属医院(27 例)的手术或活检标本,其中男 46 例,年龄 41~74 岁,女 9 例,年龄 40~71 岁。组织类型为鳞状细胞癌 25 例,腺癌 24 例,小细胞肺癌 3 例,大细胞癌、低分化癌、神经内分泌瘤各 1 例。

1.2 试验材料与试剂 293T 细胞(中科院细胞库),Lipofectamine 2000(Invitrogen 公司),PCR 扩增仪(ABI 公司),定点诱变试剂盒(QuikChange XL, Stratagene 公司),吉非替尼(Tocris 公司),总 EGFR 抗体、磷酸化 EGFR 抗体,(pY1068)(Cellsignaling 公司),磷酸酶抑制剂(Sigma 公司),野生型及 L858R 和 delE746-A750 突变型 EGFR 全长基因由纽约 Memorial Sloan-Kettering 癌症中心 William Pao 教授惠赠。

1.3 方法

1.3.1 EGFR 突变筛查 用酚氯仿法提取 -80 °C 保存的肺癌组织 DNA,通过 PCR 扩增 EGFR 基因的 1~27 号外显子,扩增产物经碱性磷酸酶与核酸外切酶纯化后送测序,测序结果与 GeneBank 中的 EGFR 序列比对。

1.3.2 EGFR 突变体的构建 利用野生型 EGFR 为模板,使用定点诱变试剂盒构建 EGFR-P848L 突变体,再以 EGFR-P848L 为模板定点诱导 T790M 突变产生双重突变质粒。P848L 诱变的前向引物为:GTA CTG GTG AAA ACA CTG CAG CAT GTC AAG ATC,后向引物为:GAT CTT GAC ATG CTG CAG TGT TTT CAC CAG TAG; T790M 诱变的前向引物为:ACC GTG CAG CTC ATC T CAG CTC ATG CCC TTC,后向引物为:GAA GGG CAT GAG CTG CAT GAT GAG CTG CAC GGT。诱变后产物均经过测序

鉴定。

1.3.3 细胞培养及质粒转染 293T 细胞使用含有 10% 胎牛血清,100 μ L/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素和 2 mmol/L 谷氨酰胺的 DMEM 培养。将 EGFR 野生型和各种突变型表达质粒分别转染 293T 细胞,48 h 后换无血清饥饿液培养 16 h,加入不同浓度梯度(0.002、0.02、0.2、2 mmol/L)的吉非替尼培养 3 h,然后加入表皮生长因子(EGF)(100 ng/ml)刺激 30 min。

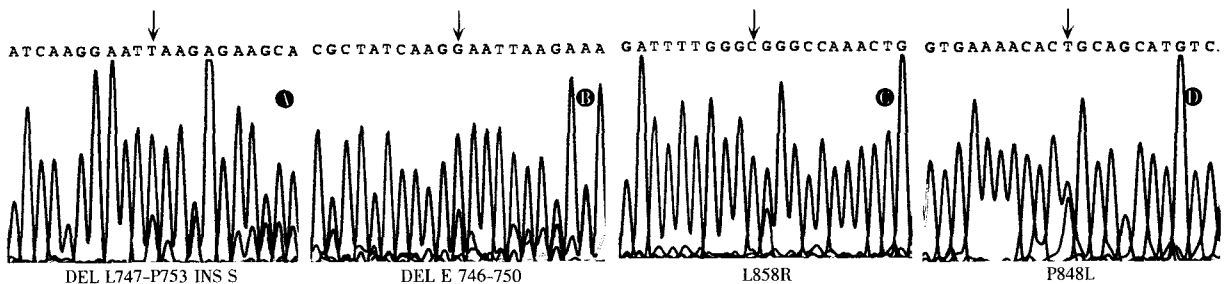
1.3.4 Western blot 检测总 EGFR 和磷酸化 EGFR 的表达 EGF 刺激 30 min 后收集细胞,使用 RIPA 缓冲液中加入蛋白酶抑制剂以及磷酸酶抑制剂抽提蛋白。蛋白经 10% SDS-PAGE 电泳后转移到硝酸纤维素膜上,室温封闭 1 h 后加一抗孵育过夜,用磷酸化 EGFR 抗体检测磷酸化 EGFR;用 EGFR 抗体检测总 EGFR, β -actin 抗体检测 β -actin。第 2 天二抗室温孵育 1 h 后显色压片。

2 结果

2.1 EGFR 突变检出率及突变类型 通过筛查发现 8 例(8/55,14.5%)EGFR 突变,均为非吸烟的肺癌患者,具体突变类型见表 1 和图 1;其中经典型突变 7 例,另 1 例为 21 号外显子 2543 位核苷酸的 C>T 转换,导致编码蛋白第 848 位脯氨酸被亮氨酸替代(P848L),是一种少见的突变类型。

表 1 8 例 NSCLC 患者 EGFR 突变类型

核苷酸改变	氨基酸改变	n[百分率(%)]
2573T>G	L858R	5(9.1)
DEL 2240~2257	DEL747~753 INS S	1(1.8)
2543C>T	P848L	1(1.8)
DEL 2235~2249	DEL 746~750	1(1.8)
合计	—	8(14.5)



A、B、C 为已知对 TKI 敏感的“经典突变”型;D 为 P848L 型

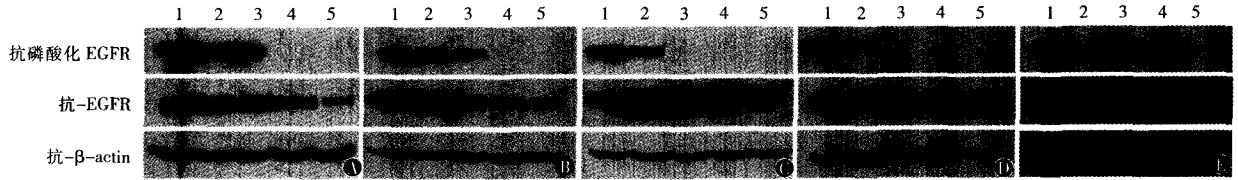
图 1 4 种 EGFR 突变类型

2.2 EGFR P848L 突变体的功能 通过将 EGFR 野生型和各种突变型表达质粒分别转染 293T 细胞观

察 EGFR 对于吉非替尼的敏感性。结果显示,EGFR P848L 与野生型 EGFR 对于吉非替尼的反应性相

当,0.02 mmol/L 的吉非替尼不能抑制 EGFR 的自身磷酸化,只有当吉非替尼浓度增加到 0.2 mmol/L 时才能抑制 EGFR 的自身磷酸化(图 2A、2B)。但是吉非替尼浓度为 0.02 mmol/L 时就可以完全抑制

经典型突变的自身磷酸化(图 2C、2D)。当 EGFR P848L 突变体中引入 T790M 形成双重突变后可以明显降低 EGFR 对吉非替尼的敏感性(图 2E)。



1-5 分别为 0、0.002、0.02、0.2、2 mmol/L 吉非替尼;A:WT 型;B:P848L 型;C:L858R 型;D:Del E746-A750;E:P848L&T790M

图 2 吉非替尼对野生型和各种突变型 EGFR 磷酸化的抑制作用

3 讨论

靶向治疗是继细胞毒药物后新发展起来的一种治疗肿瘤的方法,包括肿瘤特异性单克隆抗体、新生血管阻断及细胞周期调控的干预等,其中针对 EGFR 通路的小分子靶向治疗取得了显著成功。

早在 20 世纪 80 年代就有学者^[5-6]提出通过抑制 EGFR 治疗肿瘤,但是直到最近几年才发展起针对 EGFR 治疗的药物应用于临床。这些药物包括两大类,单克隆抗体和小分子 TKI,TKI 特异性作用于 EGFR 酪氨酸激酶的 ATP 结合域,因此阻断 EGFR 自身磷酸化激活,最终抑制细胞增殖,促进细胞凋亡^[7]。针对 EGFR 的小分子 TKI 伊马替尼对慢性粒细胞性白血病的治疗取得了划时代的成功^[8-9]。随后又发现携带 EGFR 体细胞突变的 NSCLC 患者对靶向治疗药物有显著的疗效,引发了广泛的研究热情。大量研究^[2]结果显示,EGFR 突变在亚裔非吸烟的女性肺癌患者中发生率较高,而且携带 EGFR 突变的患者接受 TKI 治疗反应性极好,能显著抑制肿瘤发展并改善患者的生活质量及生存期。本研究所收集的中国人群中,EGFR 的突变全部发生于腺癌患者。部分可获得随访资料的患者显示,携带 EGFR 突变的患者对吉非替尼治疗反应良好,提示在检测到 EGFR 是否突变的前提下,选择性地给予 TKI 治疗可能会获得更好的疗效。

既往文献^[1-3]报道 EGFR 的体细胞突变主要集中在 18~21 号外显子,随后的一些研究着重筛查 18~24 号外显子的突变情况。为了排除其他可能的突变类型,我们筛查了 EGFR 的第 1~28 号全部外显子。所幸发现的突变类型仍集中在以前所发现的区域,且突变类型及其频率分布也与之前的类似,即大部分为经典型体细胞突变,1 例为 EGFR 少见的 P848L 突变类型。我们通过体外构建携带 P848L 突变的质粒,通过转染细胞,观察在 TKI 存在条件下

EGFR 的自身磷酸化活性,结果显示 P848L 突变体对 TKI 的敏感性与野生型相似,比经典型突变的敏感性差。而最近研究^[2]报道,在 1 例携带 P848L 突变的肺癌患者,给予 TKI 治疗,效果不明显。这些结果和我们的体外研究结果相似。我们的研究结果提示,不是带有 EGFR 基因突变的患者,均对 TKI 治疗有效,必须对发现新的突变位点进行体外功能研究,才能明确携带新的 EGFR 基因突变的患者是否对 TKI 治疗敏感。

多数针对 NSCLC 的研究^[10-12]结果显示,在平均 10 个月的反应期以后,大部分敏感的患者对 TKI 治疗产生耐药性,其最常见的原因是继发性 T790M 突变。体外研究^[13]表明,持续接触吉非替尼的肺癌细胞可产生 T790M 突变。T790M 突变的 EGFR 分子立体构型发生改变,影响到 EGFR 分子与 TKI 的结合位点的空间构像,使 TKI 与 EGFR 的亲和力显著下降,从而引起对 TKI 的耐药。在我们的研究中,EGFR-P848L 突变体引入 T790M 形成二重突变体后,细胞对 TKI 的敏感性下降,说明 T790M 突变对 TKI 治疗的继发性耐药可能具有普遍性的意义,而阐明突变的机制、克服 T790M 突变问题将可能给 TKI 治疗 NSCLC 产生突破性的意义。最近已经有研究人员发现不可逆结合并抑制 EGFR-T790M 突变的小分子物质,相关文章^[14]发表于 Nature 杂志。这给我们以启示:EGFR 继发性耐药不会是 TKI 治疗前景的终结,进一步深入研究对 TKI 或其他信号通路干预对 NSCLC 的治疗前景值得关注。

[参 考 文 献]

- [1] 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.
- [2] Sequist LV, Joshi VA, Jänne PA, et al. Response to treatment and survival of patients with non-small cell lung cancer undergoing somatic EGFR mutation testing [J]. Oncologist, 2007, 12 (1): 90 - 98.

(下转第 793 页)

通过蒂部的静脉交通网回流,没有必要结扎静脉。本组采用结扎小隐静脉的方法,术后皮瓣成活良好。

3.3 优缺点 优点:(1)皮瓣设计简单。以外踝与跟腱的中点到腓窝的中点为皮瓣的轴心线,皮瓣以该线为轴心线设计在小腿的中下 1/3,两侧不超过小腿前后正中中线;有时设计皮瓣也无须多普勒超声探测动脉穿支,只须将皮瓣的蒂部设计在外踝上 7 cm 就能保证皮瓣的血供。(2)游离皮瓣简单,在皮瓣的近端横行切开皮肤后,很容易找到小隐静脉和腓肠神经,将它们缝合于皮肤并包含在皮瓣中,游离的平面也容易找到,只要在深筋膜的深层游离即可,这就能保证皮瓣的血供。(3)皮瓣转移后对供区的影响也小,不牺牲主要的血管和组织;术后供区的外形尚可,同时皮瓣转移后也不臃肿;术后随访的病例外形可,也不影响穿鞋。缺点:(1)由于该皮瓣有多层血供,目前对于其设计的最大面积没有定论,尚须进一步研究;(2)对于足跟部的修复还不太满意,因为不能满足功能需要;(3)术后皮瓣的感觉重建问题也需要进一步的研究,因为吻合神经后其感觉恢复的功能也不全^[8]。

该皮瓣适合于修复胫前下 1/3、足踝部、足跟、足背软组织的缺损,尤其是伴有骨外露、肌腱外露的创面,术后能够达到很好的效果。在应用该皮瓣修复创面时,要减少并发症的发生,如皮瓣坏死、创面修复后的感觉重建不满意、修复的创面面积受限制、

外形不满意等,我们应该掌握好适应证,手术中操作细致,特别是对皮瓣蒂部的处理,以免破坏皮瓣的血供,导致皮瓣坏死。

[参 考 文 献]

- [1] 李朝阳,宋朝晖,郭智龙,等. 腓肠神经营养血管逆行岛状皮瓣的临床应用[J]. 中国医学美容, 2008, 17(5): 633 - 634.
 - [2] Masquelet AC, Romana MC, Wolf G. Skin island flaps supplied by the vascula raxis of the sensitive superficial nerves; anomic study and clinical experience in the leg[J]. *Plast Reconstr Surg*, 1992, 89(6): 1115 - 1121.
 - [3] 王和驹,吕国坤,王书成,等. 带腓肠神经伴行血管蒂逆行岛状皮瓣的临床应用[J]. 中华显微外科杂志, 1996, 19(2): 82 - 84.
 - [4] Taylor GI, Doyle M, MaCarten G. The Doppler probe for planning flaps: anatomical study and clinical applications[J]. *Br J Plast Surg*, 1990, 43(1): 1 - 16.
 - [5] 张文庆,张勋辉,余屯德,等. 皮神经营养血管逆行岛状皮瓣修复小腿远端及足踝部创面[J]. 中国矫形外科杂志, 2007, 15(6): 472 - 473.
 - [6] 李宝山,章雪松,邹豪杰. 腓肠神经营养血管逆行岛状皮瓣的基础及临床应用研究进展[J]. 实用外科杂志, 2009, 21(4): 215 - 217.
 - [7] 白宇,陆生林,农德毅,等. 腓肠神经营养血管逆行岛状皮瓣修复足跟部软组织缺损[J]. 中华显微外科杂志, 2007, 30(3): 220 - 221.
 - [8] 师红立,舒衡生,方广文. 腓肠神经营养血管逆行岛状皮瓣治疗足踝部软组织缺损 38 例报告[J]. 中国矫形外科杂志, 2009, 17(8): 584 - 586.
-
- (上接第 790 页)
- [3] 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.
 - [4] Paez JG, Jänne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy[J]. *Science*, 2004, 304(5676): 1497 - 1500.
 - [5] Sato JD, Kawamoto T, Le AD, et al. Biological effects in vitro of monoclonal antibodies to human EGFR[J]. *Mol Biol Med*, 1983, 1(5): 511 - 529.
 - [6] Harari PM. EGFR inhibition strategies in oncology[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2004, 11(4): 689 - 708.
 - [7] Noble ME, Endicott JA, Johnson LN. Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure[J]. *Science*, 2004, 303(5665): 1800 - 1805.
 - [8] Mauro MJ, Druker BJ. STI571: a gene product-targeted therapy for leukemia[J]. *Curr Oncol Rep*, 2001, 3(3): 223 - 227.
 - [9] Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia[J]. *N Engl J Med*, 2001, 344(14): 1031 - 1048.
 - [10] Pao W, Miller VA, Politi KA, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain[J]. *PLoS Med*, 2005, 2(3): e73.
 - [11] Kwak EL, Sordella R, Bell DW, et al. Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(21): 7665 - 7670.
 - [12] Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib[J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(8): 786 - 792.
 - [13] Ogino A, Kitao H, Hirano S, et al. Emergence of epidermal growth factor receptor T790M mutation during chronic exposure to gefitinib in a non small cell lung cancer cell line [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(16): 7807 - 7814.
 - [14] Zhou W, Ercan D, Chen L, et al. Novel mutant-selective EGFR kinase inhibitors against EGFR T790M[J]. *Nature*, 2009, 462(7276): 1070 - 1074.