

• 临床经验与技术交流 •

非小细胞肺癌十基因突变联合检测分析

代洁, 左卓, 郭鹏, 谭化蛟, 廖琼[△]

610041 成都, 四川省肿瘤医院·研究所, 四川省癌症防治中心, 电子科技大学医学院 病理科

[摘要] 目的: 探讨运用扩增阻滞突变系统 (amplification refractory mutation system, ARMS) 法检测 *EGFR*、*ALK*、*ROS1*、*RET*、*KRAS*、*NRAS*、*PIK3CA*、*BRAF*、*HER2* 和 *MET* 十基因在非小细胞肺癌的突变情况, 分析其与临床病理的关系, 探索十基因突变联合检测的临床应用价值。方法: 收集 2019 年 5 月至 2019 年 10 月在四川省肿瘤医院病理确诊为非小细胞肺癌患者 406 例, 其中石蜡包埋样本 400 例, 细胞涂片 6 例, 采取柱提法提取 DNA 和 RNA, 突变检测采用 ARMS 法。结果: 非小细胞肺癌十基因联合检测的总突变频率为 73.2% (297/406), 各驱动基因突变分布为: *EGFR*: 51.0% (207/406)、*KRAS*: 9.6% (39/406)、*ALK* 融合: 6.2% (25/406)、*ROS1* 融合: 2.5% (10/406)、*RET* 融合: 2.2% (9/406)、*NRAS*: 0.2% (1/406)、*PIK3CA*: 2.2% (9/406)、*BRAF*: 1.0% (4/406)、*HER2*: 2.2% (9/406)、*MET* 14 号外显子跳跃: 0.7% (3/406)。肺腺癌 *EGFR* 突变频率高于肺鳞癌; 女性患者 *EGFR* 与 *HER2* 20ins 突变频率高于男性, 男性患者 *KRAS* 突变频率高于女性; 年龄低于 60 岁的患者 *ROS1* 突变频率高于 60 岁以上的患者。十基因突变率在原发灶和转移灶之间无差异, 冰冻后样本突变检出率高于其他类型样本。另外在 30 例样本中检出双突变, 突变类型为 18 种, 突变率达到 7.4%; 57% 的双突变样本来源于初诊患者, 没有观察到独特的组织病理特征。双突变患者在年龄和病理组织学分型上与单突变患者无差异, 但易发生于女性患者。结论: ARMS 法非小细胞肺癌十基因联合检测可一次获得更多基因突变信息, 为分子靶向用药提供更加全面的指导信息, 对于临床取材量少标本意义重大, 多基因联合检测提供的共突变信息能够更全面地指导临床治疗。

[关键词] 非小细胞肺癌; 驱动基因; 双突变; 靶向治疗; ARMS

[中图分类号] R734.2; R446.8 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1674-0904.2020.12.012

引文格式: Dai J, Zuo Z, Guo P, et al. Combined detection and analysis of ten driver gene mutations in non-small cell lung cancer[J]. J Cancer Control Treat, 2020, 33(12): 979-987. [代洁, 左卓, 郭鹏, 等. 非小细胞肺癌十基因突变联合检测分析[J]. 肿瘤预防与治疗, 2020, 33(12): 979-987.]

Combined Detection and Analysis of Ten Driver Gene Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer

Dai Jie, Zuo Zhuo, Guo Peng, Tan Huajiao, Liao Qiong

Department of Pathology, Sichuan Cancer Hospital & Institute, Sichuan Cancer Center, School of Medicine, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610041, Sichuan, China

Corresponding author: Liao Qiong, E-mail: nicolg@163.com

[Abstract] **Objective:** To study the relationship between mutations of driver genes including *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *RET*, *KRAS*, *NRAS*, *PIK3CA*, *BRAF*, *HER2*, *MET* and the clinicopathologic characteristics of non-small cell lung cancer (NSCLC) using amplification refractory mutation system (ARMS), and evaluate the clinical-application value of combined detection of ten driver gene mutations. **Methods:** A total of 400 paraffin embedded samples and 6 smear cases were collected from patients with NSCLC in Sichuan Cancer Hospital from May 2019 to October 2019. Column-based protocol was used for the extraction of DNA and RNA, and the mutation was detected by ARMS fluorescence quantitative PCR. **Results:** The total mutation frequency of ten genes in NSCLC was 73.2% (297/406). The mutation frequency of each driver gene were 51.0% (*EGFR*, 207/406), 9.6% (*KRAS*, 39/406), 6.2% (*ALK* fusion, 25/406), 2.5% (*ROS1* fusion, 10/406), 2.2% (*RET* fusion, 9/406), 0.2% (*NRAS*, 1/406), 2.2% (*PIK3CA*, 9/406), 1.0% (*BRAF*, 4/406), 2.2% (*HER2*, 9/406) and 0.7% (*MET* 14 exon jump, 3/406), respectively. Mutation frequency of *EGFR* in lung adenocarcinoma was significantly higher than that in lung

[收稿日期] 2020-04-29 [修回日期] 2020-06-08

[通讯作者] [△]廖琼, E-mail: nicolg@163.com

squamous cell carcinoma; higher prevalence of *EGFR* mutation and *HER2* 20ins were identified in female patients than in male patients, in contrast, *KRAS* mutation was more likely to occur in male patients than in female patients; and the mutation frequency of *ROS1* in patients younger than 60 years old was higher than those older than 60 years old. No difference in the ten-gene mutation rate was found between the primary focus and the metastatic focus, but the mutation frequency of frozen samples was higher than that of other samples. In addition, 30 co-mutation samples were detected, with 18 types and a mutation rate of 7.4%. We also found 57% of the co-mutation samples were from treatment-naive patients, no unique histopathological feature was observed in co-mutation samples. There were no differences in age and histopathology between patients with co-mutation and those with single mutation; however, the co-mutation was prone to occur in female patients. **Conclusion:** Combined detection of ten driver genes in NSCLC patients using ARMS can obtain more gene mutation information of tumor samples in a single rung, providing a more comprehensive analysis of genetic status for molecular-targeted therapy, especially those with insufficient clinical samples. The co-mutation information provided by the combined test can guide clinical treatment more comprehensively.

[Key words] Non-small cell lung cancer; Driver gene; Co-mutation; Targeted therapy; ARMS

肺癌是全世界发病率和死亡率均为最高的肿瘤^[1]。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)是我国肺癌的主要病理类型,占肺癌患者总数的80%~85%,5年生存率低于15%^[2]。50%肺癌患者确诊时已是晚期,传统的治疗方法总体预后较差^[3]。随着肿瘤分子生物学的发展,针对NSCLC常见驱动基因(如*EGFR*、*ALK*、*ROS1*、*RET*、*BRAF*、*HER2*和*MET*等)靶向治疗药物奥希替尼、克唑替尼、卡博替尼、曲美替尼、达拉非尼、阿法替尼等上市,肺癌患者中位生存期明显延长,疗效得到显著改善^[4-5]。因此,传统的单基因检测已经不能满足肺癌患者的需求,需要一次性对NSCLC多个驱动基因进行同时检测,以指导个性化的肺癌靶向治疗。有鉴于此,本研究收集406例NSCLC患者样本,采用ARMS法进行*EGFR*、*ALK*、*ROS1*、*RET*、*KRAS*、*NRAS*、*PIK3CA*、*BRAF*、*HER2*和*MET*十基因联合检测,评估各基因的突变频率,分析其与临床病理特征间的关系,以期临床医生合理选择治疗方案、实施个体化治疗提供有力的证据。

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集2019年5月至2019年10月四川省肿瘤医院病理确诊为NSCLC、同时有足够的肿瘤细胞进行后续分子病理检测的样本406例,其中福尔马林固定石蜡包埋组织400例,细胞涂片6例;男性216例,女性190例;患者年龄35~89岁,中位年龄为62岁;肺腺癌357例,鳞癌37例,腺鳞癌8例,未分类4例;原发灶317例,转移灶86例,未明确3例。样本类型包含细胞学样本、冰冻后组织、穿刺样本和手术切除样本,其中细胞学31例(细胞块25例、细胞涂片6例)、冰冻后组织148例、穿刺样本145例、

手术切除样本47例和未明确(外院会诊组织)35例。

1.2 肿瘤组织DNA、RNA的提取及ARMS法荧光定量PCR检测

肿瘤组织石蜡样本进行连续切片,切片厚度8 μm,根据肿瘤大小取3~5片置于1.5 mL EP管内,细胞涂片直接刮片,每个肿瘤样本总共收集2管,分别用于DNA和RNA的提取。组织DNA、RNA提取试剂盒、*EGFR*、*ALK*、*ROS1*、*RET*、*KRAS*、*NRAS*、*PIK3CA*、*BRAF*、*HER2*联合检测试剂盒和*MET*突变检测试剂盒均为厦门艾德公司生产,具体操作步骤严格参照试剂盒说明书进行,本实验室荧光定量PCR仪为Stratagene Mx3000P, DNA和RNA浓度由Merinton SMA4000分光光度计测定。

1.3 统计学方法

采用SPSS 17.0软件进行统计学分析基因突变与患者年龄、性别、组织学类型、是否转移、标本类型等临床病理的相关性,卡方检验、Pearson卡方检验及Fisher精确检验分析是否具有统计学意义,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NSCLC中驱动基因突变的分布

406例标本中,十种驱动基因的总突变率为73.2%(297/406)。*EGFR*总突变率为51.0%(207/406),在十种基因中突变频率最高,*KRAS*基因突变率为9.6%(39/406),位居第二,*ALK*融合频率为6.2%(25/406),居第三位,*ROS1*融合、*RET*融合、*NRAS*、*PIK3CA*、*BRAF*、*HER2*和*MET*14号外显子跳跃突变率分别为2.5%(10/406)、2.2%(9/406)、0.2%(1/406)、2.2%(9/406)、1.0%(4/406)、2.2%(9/406)、0.7%(3/406)(图1A)。

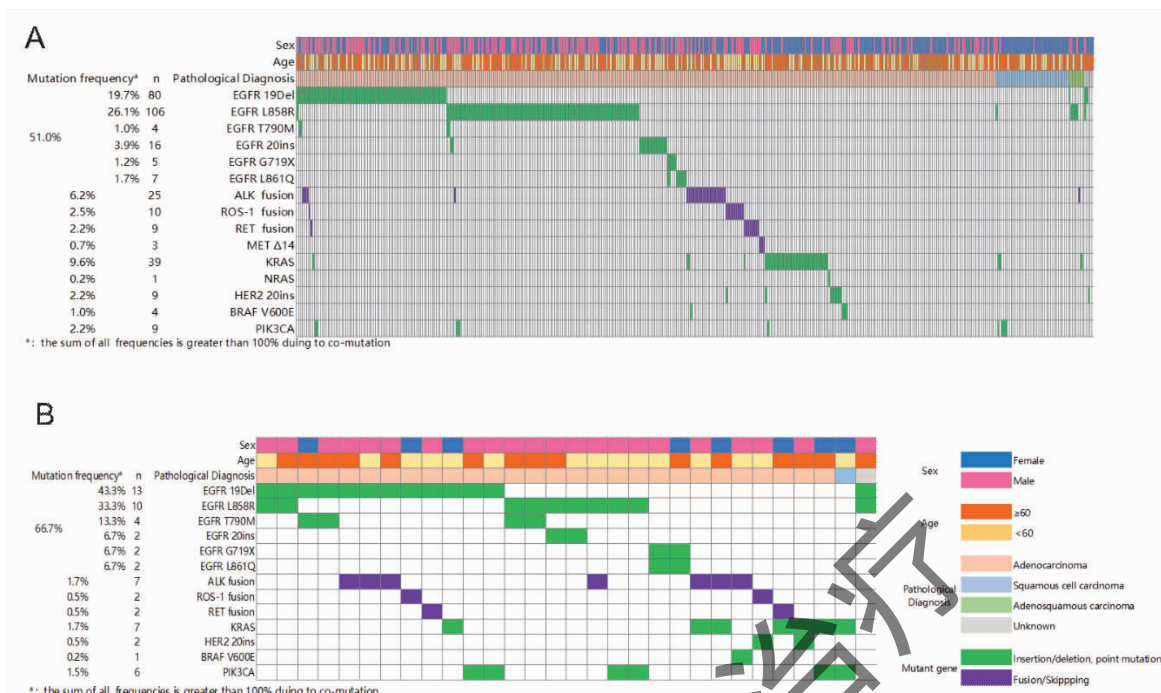


图 1 突变分布

Figure 1. Mutation Distribution

Panel A showed the mutation distribution and clinicopathological characteristics of 406 samples, and each column represents a patient; panel B showed the mutation distribution and clinicopathological characteristics of 30 double mutation samples.

在检出突变的 297 例样本中,有 30 例样本为双位点共突变(图 1B),突变类型丰富多样,多达 18 种,其中包括 L858R/T790M 2 例、L858R/20-INS 2 例、L858R/ALK 1 例、L858R/PIK3CA 2 例、L861Q/G719X 2 例、19Del/L858R 3 例、19Del/T790M 2 例、19Del/ALK 3 例、19Del/KRAS 1 例、19Del/PIK3CA 2 例、19Del/RET 1 例、19Del/ROS1 1 例、ALK/KRAS 2 例、ALK/BRAF 1 例、KRAS/HER2 1 例、KRAS/PIK3CA 2 例、RET/KRAS 1 例和 ROS1/HER2 1 例(表 1)。与单基因突变的患者相比,双突变患者中女性占比更高(73.0% vs 53.0%, $P=0.034$,表 2),病理亚型及年龄与共突变发生率无关。

2.2 EGFR 基因各位点突变情况

本次检测发现 EGFR 基因突变的例数为 207 例,占总检出率的 51.0% (207/406),突变频率最高,其中包括单点突变 196 例,双突变 11 例。单突变中 L858R 的突变例数最多,为 99 例,其次为 19Del(75 例)、20-INS(14 例),还检测到稀有突变 G719X 3 例和 L861Q 5 例。而在 EGFR 双突变中,19Del + L858R 为 3 例,19Del + T790M、L858R + T790M、L858R + 20ins 及 G719X + L861Q 共突变均各为 2 例(图 2)。

表 1 NSCLC 患者十联检双点突变类型及比例

Table 1. Type and Frequency of Co-mutation in Ten Genes Combined Examinations of NSCLC Patients

Mutation type	N	Mutation rate (%)
yL858R/T790M	2	6.7
L858R/20-INS	2	6.7
L858R/ALK	1	3.3
L858R/PIK3CA	2	6.7
L861Q/G719X	2	6.7
19Del/L858R	3	10.0
19Del/T790M	2	6.7
19Del/ALK	3	10.0
19Del/KRAS	1	3.3
19Del/PIK3CA	2	6.7
19Del/RET	1	3.3
19Del/ROS1	1	3.3
ALK/KRAS	2	6.7
ALK/BRAF	1	3.3
KRAS/HER2	1	3.3
KRAS/PIK3CA	2	6.7
RET/KRAS	1	3.3
ROS1/HER2	1	3.3

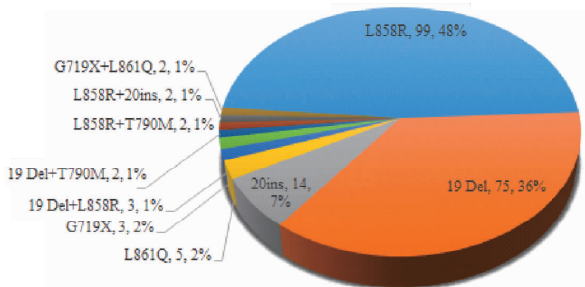


图 2 EGFR 突变分布饼图

Figure 2. EGFR Mutation Distribution

驱动基因突变与临床病理特征的相关性分析如表 3 所示:在性别分布方面,EGFR 在女性患者中的突变频率高于男性,差异有统计学意义(67.4% vs 36.6%, $P < 0.001$),HER2 20ins 同样好发于女性,差异有统计学意义(4.2% vs 0.5%, $P < 0.01$)。KRAS 则相反,男性患者中的 KRAS 突变频率高于女性(14.4% vs 4.2%, $P < 0.001$)。在年龄分布方面,ROS1 融合突变在年龄低于 60 岁患者中发生率显著高于 60 岁以上的人群,差异有统计学意义(0.5% vs 0.4%, $P < 0.01$)。在 NSCLC 患者病理组织学分型方面,EGFR 突变在腺癌中的发生率为 56.5%,显著高于鳞癌(2.7%, $P < 0.001$)。

2.3 NSCLC 驱动基因突变与临床病理特征的相关性

表 2 双突变患者与单突变患者的特征比较

Table 2. Characteristics of Patients with Double Mutations and Single Mutation

Variable	Double mutations	Single mutation	χ^2	P
Age (year)			0.501	0.479
≥ 60	15	151		
< 60	15	115		
Sex			4.514	0.034
Male	8	126		
Female	22	142		
Pathological type			0.981	0.547*
Adenocarcinoma	28	253		
Squamous cell carcinoma	1	5		
Adenosquamous carcinoma	0	7		
Unknown	1	2		

* Fisher's exact test.

表 3 驱动基因突变与临床病理特征的相关性

Table 3. Correlation between Driver Gene Mutation and Clinicopathological Characteristics

Variable	Total	Number of mutant samples									
		EGFR	ALK	KRAS	ROS1	RET	NRAS	BRAF	HER2	METΔ14	PIK3CA
Sex											
Female	216	79	12	31	4	3	1	2	1	2	5
Male	190	128	13	8	6	6	0	2	8	1	4
Age (year)											
≥ 60	232	118	14	25	1	2	0	2	5	1	5
< 60	173	89	11	14	9	7	1	2	4	2	4
Pathological type											
Adenocarcinoma	356	201	25	36	10	9	1	2	8	3	5
Squamous cell carcinoma	37	1	0	2	0	0	0	0	0	0	4
Adenosquamous carcinoma	8	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Unclassified	5	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0

One case lost in age information.

不同来源样本驱动基因突变检出率如表 4 所示:原发灶的突变检出率为 72.2%,转移灶中的突变检出率为 75.6%,二者差异无统计学意义($P = 0.536$)。总体而言,不同取材方法之间驱动基因的检出率存在差异,其中冰冻后样本检出率最高(81.8%, 121/148),其次是细胞学样本(77.4%, 24/31),第三为手术样本(70.2%, 33/47),穿刺样本检出率最低(64.8%, 94/145)。两两相比发现,冰冻样本驱动基因检出率显著高于穿刺样本(81.8% vs 64.8%, $P = 0.001$)。

2.4 双突变样本的组织病理特征及既往治疗史

我们对所有双突变样本的 HE 切片和免疫组化染色进行了复核,发现双突变样本的组织病理学主要为腺泡型腺癌、贴壁型腺癌、粘液腺癌、实性腺癌和微乳头状腺癌(图 3)。双突变病例组织学形态与单突变相似,未发现特有的组织病理特征,不能从组织形态学推断是否有驱动基因共突变及共突变类

型。

表 4 不同样本中的突变检出率

Table 4. Mutation Frequency of Different Samples

Variable	N (positive)	N (negative)	χ^2	P
Metastasis			0.383	0.536*
Primary focus	229	88		
Metastases focus	65	21		
Unknown	3	0		
Sample type			11.228	0.010**
Frozen	121	27		
Puncture	94	51		
Operation	33	14		
Cytology	24	7		
Unknown	25	10		

* Chi-square test; ** Pearson chi-square test.

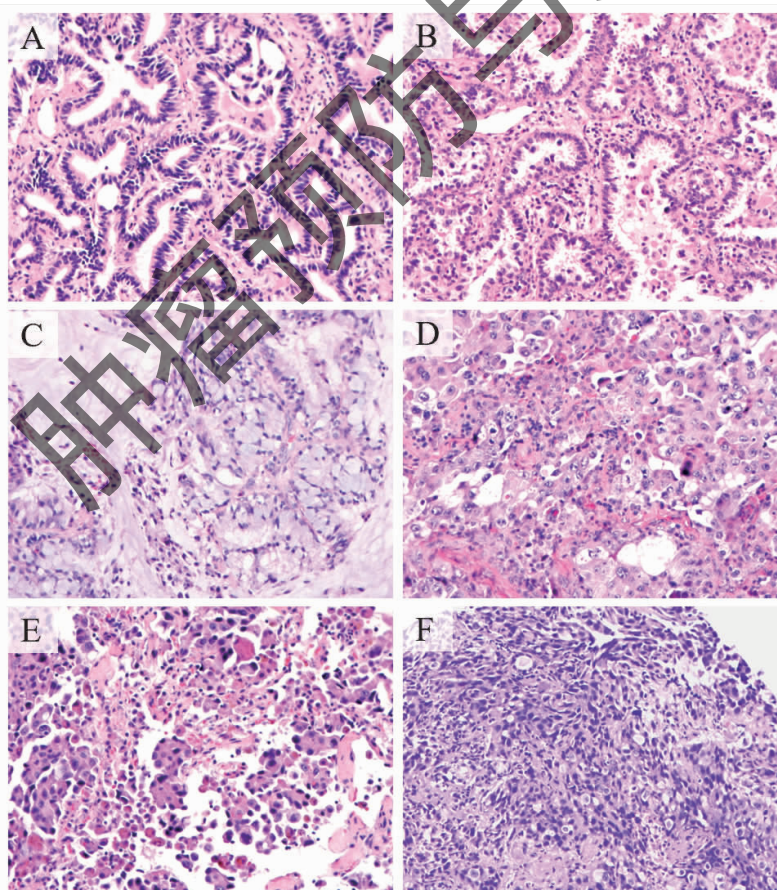


图 3 双突变样本的病理 HE 图片(×200)

Figure 3. HE Staining of Double Mutation Samples (×200)

A. L858R + 20ins, acinar adenocarcinoma; B. L858R + PIK3CA, adherent adenocarcinoma; C. ALK + BRAF, mucus adenocarcinoma; D. RET + KRAS, solid adenocarcinoma; E) RET + KRAS, micropapillary adenocarcinoma; F. ALK + KRAS, solid adenocarcinoma (some cells contain mucus).

双突变样本中,共 20 例样本可明确既往治疗史(图 4)。17 例(57%)样本来源于初诊初治患者,既

往未经受过治疗;3 例(10%)患者既往接受过靶向治疗(1 例)、放化疗(1 例)或手术(1 例)。

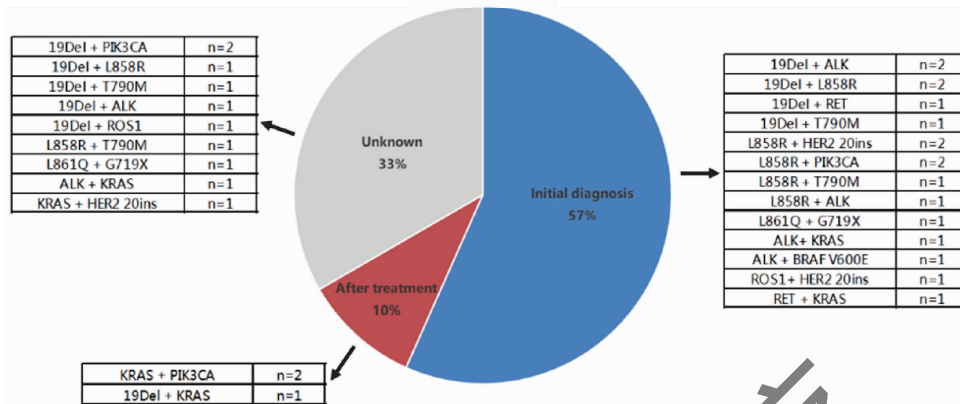


图 4 双突变患者既往治疗史分布及共突变类型

Figure 4. Previous Treatment History and Type of Co-mutation in Patients with Double Mutations

3 讨论

既往研究数据表明,EGFR 基因的突变率在亚洲为 30% ~ 51%^[6],本检测 EGFR 总突变率为 51.0% (207/406),在此范围内。EGFR 突变率是十种基因最高的,种类多样,最常见的类型为 21 号外显子 L858R 突变和 19 号外显子缺失,符合既往报道^[7-8]。EGFR 突变与治疗的反应性有明确的关系,除了常见的 EGFR 突变外,也观察到了 EGFR 少见突变,EGFR-TKI 对携带少见突变的 NSCLC 患者的有效率低于常见突变,存在异质性^[9-10],但靶向治疗仍优于化疗^[11]。我们在研究中发现了稀有突变 G719X 3 例和 L861Q 5 例。由于例数较少,EGFR-TKI 对携带这类突变患者的有效性还需加大样本量继续进行研究。本研究突变发生率第二位的是 KRAS(9.6%, 39/406),第三位则为 ALK 基因融合(6.2%, 25/406),与既往研究 KRAS 基因突变率 6% ~ 25%, ALK 融合发生率 2% ~ 7% 相符^[12]。ROS1 属于胰岛素受体家族中的一种受体酪氨酸激酶,位于 6 号染色体上,约有 2% 的 NSCLC 病例发生 ROS1 基因重排^[13],与本项目的研究结果(2.5%, 10/406)基本一致。RET 基因融合、NRAS 突变、PIK3CA 突变、BRAF 突变、HER2 突变和 MET 14 号外显子跳跃突变的发生率分别为 2.2% (9/406)、0.2% (1/406)、2.2% (9/406)、1.0% (4/406)、2.2% (9/406)、0.7% (3/406),也符合以往的研究^[14]。尽管后面这几种基因的突变率较低,但是临床上已经存在这些位点的靶向治疗药物,因此有必

要对其进行检测分析^[15]。临床医生可以根据我们的十基因联合检测报告、美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA) 获批、NCCN Guidelines for Non-Small Cell Lung Cancer(Version 3.2020)和临床试验药物^[16-20]等合理选择用药(表 5)。

本实验数据发现,NSCLC 患者的突变类型已经不局限于一种基因的突变,单基因双点突变和双基因联合突变的发生例数已达到 30 例,突变类型达到 18 种,多于以往报道^[21-22]。研究显示 EGFR 双突变类型、EGFR/ALK 双突变类型可以从 EGFR-TKIs 药物中获益,KRAS/ALK 双突变类型可以从 ALK 抑制剂治疗中受益^[23-25]。OPTIMAL 试验表明,对于携带 EGFR 19Del 和 21 突变的 NSCLC 患者,厄洛替尼作为一线治疗与吉西他滨联合卡铂相比生存期明显延长^[26]。由于本研究的患者双突变例数较少,每种类型均只有 1 ~ 3 例,大多为首次发现肿瘤,采取的治疗方式多为手术或手术 + 术后化疗。其中一例 86 岁的女性右肺下叶非小细胞腺癌伴双肺、骨、纵隔淋巴结、脑转移(IV 期,19 Del/ALK-EMLA/KIF5B 融合双突变),予以盐酸埃克替尼分子靶向治疗,无进展生存期(progression-free survival, PFS)为 9 个月,与盐酸埃克替尼一线治疗 PFS 为 296 天接近^[27],说明盐酸埃克替尼针对 19 Del/ALK 双突变的治疗是有效的。另一例 54 岁女性肺腺癌患者检测到罕见双突变(L861Q/G719X),在服用 28 天马来酸阿法替尼后放弃靶向治疗,使我们无法判定疗效。我们后期将对更多患者的靶向用药情况进行跟踪、收集和统计。

本次研究的 406 例样本数据显示,部分驱动基因的分布具有性别、年龄或病理组织亚型偏好。*EGFR* 突变(67.4% vs 36.6%, $P < 0.001$)和 *HER2* 20ins 突变(4.2% vs 0.5%, $P < 0.01$)在女性患者中的发生率高于男性,*ROS1* 融合在小于 60 岁患者

中的发生率更高(0.5% vs 0.4%, $P < 0.01$),与既往的报道一致^[28]。我们的数据也显示,*EGFR* 突变在肺腺癌中的突变频率高于肺鳞癌(56.5 vs 2.7%, $P < 0.001$),提示不同病理亚型 NSCLC 的驱动模式和靶向治疗策略有一定的差异。

表 5 非小细胞肺癌基因突变类型和用药指导

Table 5. Gene Mutation Types and a Medication Guidance of NSCLC

Gene	Sensitive mutation	Resistance mutation	Medication guidance (FDA approved or recommended by NCCN guidelines)	Clinical trial drugs	Other clinical significance
<i>EGFR</i>	L858R, 19DEL	T90M, 20ins	Gefitinib, Tarceva, Conmana, Afatinib, Dacomitinib		
	T790M	C797S	Osimertinib		
	20ins			JNJ-372, TAK-788	
<i>ALK</i>	EML4-ALK		Crizotinib, Alectinib, Ceritinib, Brigatinib, Lorlatinib		
<i>ROS1</i>	Rearrange		Crizotinib, Ceritinib, Entrectinib	Lorlatinib, TPX-0005	
<i>RET</i>	Rearrange		Cabozanix,	BLU-667, LOXO-292	
<i>KRAS</i>		Mutant of exon12, exon13 and exon61			Tips for EGFR TKI resistance
	G12C			AMG510, MRTX849	
<i>NRAS</i>		E63K			Tips for EGFR TKI resistance
<i>PIK3CA</i>		p. E542K, p. E545K, p. E545Q, p. H1047L, p. H1047R			Tips for poor prognosis
<i>BRAF</i>	V600E		Dabrafenib, Trametinib		
<i>HER2</i>	Insertion of exon 20		Herceptin	Pozotinib, TAK-788	
<i>MET</i>	Skipping and amplification of MET exon 14		Crizotinib, Capmatinib	Tepotinib, JNJ372	

同时,我们针对 NSCLC 原发灶和转移灶的突变频率进行了数据分析,两组阳性检出率分别为 72.2% (229/317)和75.6% (65/86),比较差异无统计学意义($P > 0.05$),因此原发灶和转移灶的组织标本均可用于肺癌驱动基因突变的检测^[29]。由于标本来源的方式不同,此次研究也对比了细胞学、冰冻后、穿刺和手术切除样本的突变率,除冰冻后样本与穿刺样本之间的差异有统计学意义(64.8% vs 81.8%, $P = 0.001$)以外,其他样本类型之间的差异均无统计学意义。穿刺样本的阳性率最低,样本质量、肿瘤细胞含量及肿瘤异质性是出现该现象可能

的原因。尽管如此,不论 NSCLC 患者标本的病理组织学类型^[30]、标本来源^[31]、是否为转移灶,都能够用于肿瘤驱动基因突变检测,指导晚期 NSCLC 的治疗,但可以优先选择冰冻后组织。本研究收集的 406 例样本,冰冻后样本为术后立即送检固定,肿瘤成分多,其突变检出率显著高于整体样本的十基因突变检出率(81.8% vs 73.2%, $P = 0.037$),也提示我们在平时的临床工作中标本及时固定的重要性,更有利于 DNA 和 RNA 的完整保存。而对于穿刺样本,在我院常规进行加快制片流程,属于加快标本,大多在收到样本的第 3 天就能得到基因报告,大大

缩短检测时间的同时确保阳性突变的检出率,有利于患者的及时治疗。但穿刺组织样本量较少,经过 HE 及免疫组化切片后,留给基因检测的组织量已很少,单基因检测无法有效覆盖所有靶点,不仅提供的基因信息有限,而且多次检测会造成样本的浪费或不够。而采用多基因联合检测,能在一次检测中提供足够的靶向用药信息,同时节省宝贵的临床样本,又缩短了报告周期。多基因联合检测是未来 NSCLC 乃至其他癌症基因检测的发展趋势。

双驱动基因共突变在 NSCLC 中相对罕见^[32],既往研究报道 EGFR 突变合并 ALK 融合的患者 TKI 疗效与单基因突变患者相比更差,但仍优于化疗^[33]。双突变的产生可能源于肿瘤异质性^[34],或者为同一肿瘤细胞携带两种驱动突变^[35]。无论如何,我们的研究显示双驱动突变不具备独特的组织病理特征,基因检测是鉴定双突变的主要方法。我们的研究同时证实:双驱动基因共突变常发生于既往未经治疗的 NSCLC 中,由此产生的多信号通路激活可能导致 TKI 治疗的原发耐药。因此,在初诊的肺癌患者中进行多基因联合检测能够提供更加全面的临床指导信息。

目前除了 EGFR、ALK、ROS1、RET、KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、HER2 和 MET 十种驱动基因与 NSCLC 发生发展密切相关外,NTRK1-3 基因是罕见的驱动基因,已经明确 NTRK 融合在 NSCLC 中具有重要意义^[36]。NTRK1-3 融合突变的患者 TMB(肿瘤突变负荷)更高、PD-L1 表达水平更高,提示这类患者可能更适合免疫治疗,有望从 NTRK 抑制剂或免疫治疗中获益。神经调节蛋白 1(neuregulin-1, NRG1)能够结合 HER3 和 HER4 并激活 ErbB 信号通路^[37],在 NRG1 融合的消化系统肿瘤中已有阿法替尼成功控制肿瘤的案例报道^[38],而在肺癌中,NRG1 融合的发生率约 0.3%^[39],随着更多低频驱动突变的发现和相关药物的问世,单基因检测在时效性、样本消耗量等方面将出现更多的局限性。未来多基因联合检测试剂盒将不仅仅局限于这十种驱动基因,会加入越来越多的基因检测位点,随着高通量测序技术的推广和普及,也将极大的推动肺癌的精准治疗,使更多的肺癌患者获益。

作者声明:本文全部作者对于研究和撰写的论文出现的不端行为承担相应责任;并承诺论文中涉及的原始图片、数据资料等已按照有关规定保存,可接受核查。

学术不端:本文在初审、返修及出版前均通过中国知网(CNKI)科技期刊学术不端文献检测系统的学术不端检测。

同行评议:经同行专家双盲外审,达到刊发要求。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

文章版权:本文出版前已与全体作者签署了论文授权书等协议。

[参考文献]

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018,68(6):394-424.
- [2] Davidson MR, Gazdar AF, Clarke BE. The pivotal role of pathology in the management of lung cancer[J]. J Thorac Dis, 2013, 5(S5):S463-S478.
- [3] 王之霞, 王红梅, 赵阳, 等. 晚期非小细胞肺癌一代 EGFR-TKIs 耐药后基因突变分析[J]. 徐州医学院学报, 2017,37(12):783-789.
- [4] Tiwari D, Brodie SA, Brandes JC. Targeted therapy of non-small-cell lung carcinoma[J]. Ther Adv Respir Dis, 2011,6(1):41-56.
- [5] Jänne PA, Shaw AT, Pereira JR, et al. Selumetinib plus docetaxel for KRAS-mutant advanced non-small-cell lung cancer: A randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 2 study[J]. Lancet Oncol, 2012,14(1):38-47.
- [6] 王晓莉, 葛晓松, 刘彦魁, 等. EGFR/ALK/ROS1 三联检测在非小细胞肺癌中的临床意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2018,34(10):1135-1137.
- [7] 王珊, 董丽儒, 刘爱东, 等. EGFR 及 KRAS 基因突变与非小细胞肺癌临床病理特征的关系[J]. 临床与实验病理学杂志, 2017,33(4):379-383.
- [8] 赵云飞, 李晓琴, 刘春玲. 非小细胞肺癌 EGFR-TK 非经典突变临床研究进展[J]. 肿瘤预防与治疗, 2019,32(6):542-546.
- [9] Russo A, Franchina T, Ricciardi G, et al. Heterogeneous responses to epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in patients with uncommon EGFR mutations: New insights and future perspectives in this complex clinical scenario[J]. Int J Mol Sci, 2019,20(6):1431.
- [10] Kate S, Chougule A, Joshi A, et al. Outcome of uncommon EGFR mutation positive newly diagnosed advanced non-small cell lung cancer patients: A single center retrospective analysis[J]. Lung Cancer(Auckl), 2019,10:1-10.
- [11] 郑杰, 韩睿, 祝梦晓, 等. 非小细胞肺癌 EGFR 非经典突变患者不同治疗方案疗效分析[J]. 肿瘤预防与治疗, 2019,32(9):800-806.
- [12] Gridelli C, Peters S, Sgambato A, et al. ALK inhibitors in the treatment of advanced NSCLC[J]. Cancer Treat Rev, 2014,40(2):300-306.

- [13] Bergethon K, Shaw A, Ou S, *et al.* ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers[J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30(8):863-870.
- [14] Li S, Li L, Zhu Y, *et al.* Coexistence of EGFR with KRAS, or BRAF, or PIK3CA somatic mutations in lung cancer: A comprehensive mutation profiling from 5125 Chinese cohorts[J]. *Br J Cancer*, 2014, 110(11):2812-2820.
- [15] 乐胜兵, 吴密璐. 非小细胞肺癌靶向治疗研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2016, 24(5):840-843.
- [16] Yang J, Yang J, Ban S, *et al.* Successful treatment of a miliary metastatic NSCLC patient with activating EGFR exon 20 insertion mutation with response to poziotinib[J]. *J Thorac Oncol*, 2019, 14(9):e198-e200.
- [17] Alexander D, Ou S HI, Chul CB, *et al.* Repotrectinib (TPX-0005) is a next generation ROS1/TRK/ALK inhibitor that potently inhibits ROS1/TRK/ALK solvent front mutations[J]. *Cancer Discov*, 2018, 8(10):1227-1236.
- [18] Subbiah V, Gainor JF, Rahal R, *et al.* Precision targeted therapy with BLU-667 for RET-Driven cancers[J]. *Cancer Discov*, 2018, 8(7):836-849.
- [19] Robichaux JP, Elamin YY, Tan Z, *et al.* Mechanisms and clinical activity of an EGFR and HER2 exon 20-selective kinase inhibitor in non-small cell lung cancer[J]. *Nat Med*, 2018, 24(5):638-646.
- [20] Oshin M, Mariya F, Jill S. Status of agents targeting the HGF/c-Met axis in lung cancer[J]. *Cancers*, 2018, 10(9):280.
- [21] 陈灵锋, 陈小岩, 俞训彬. 非小细胞肺癌驱动基因突变与临床病理特征的关系[J]. *中华病理学杂志*, 2016, 45(4):221-225.
- [22] 陈灵锋, 陈小岩, 俞训彬, 等. Illumina 靶向测序法与 Sanger 测序法检测肺腺癌驱动基因突变的比较[J]. *中华病理学杂志*, 2018, 47(3):209-212.
- [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(2016 版)[J]. *中华病理学杂志*, 2016, 45(4):217-220.
- [24] Benesova L, Minarik M, Jancarikova D, *et al.* Multiplicity of EGFR and KRAS mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients treated with tyrosine kinase inhibitors[J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(5):1667-1671.
- [25] Yang JJ, Zhang XC, Su J, *et al.* Lung cancers with concomitant EGFR mutations and ALK rearrangements: Diverse responses to EGFR-TKI and crizotinib in relation to diverse receptors phosphorylation[J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(5):1383-1392.
- [26] Chen G, Feng J, Zhou C, *et al.* Quality of life (QoL) analyses from OPTIMAL (CTONG-0802), a phase III, randomised, open-label study of first-line erlotinib versus chemotherapy in patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (NSCLC)[J]. *Ann Oncol*, 2013, 24(6):1615-1622.
- [27] Shi Y K, Wang L, Han BH, *et al.* First-line icotinib versus cisplatin/pemetrexed plus pemetrexed maintenance therapy for patients with advanced EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma (CONVINCE): A phase 3, open-label, randomized study[J]. *Ann Oncol*, 2017, 28(10):2443-2450.
- [28] 潘长芳, 赵胜利, 李洋, 等. 非小细胞肺癌药物靶向位点的相关基因突变研究[J]. *海南医学*, 2018, 29(19):2696-2698.
- [29] 程亚楠, 叶英楠, 董莉, 等. 靶向高通量测序在非小细胞肺癌中的临床应用[J]. *中国肿瘤临床*, 2018, 45(11):582-588.
- [30] 方平, 王洋. 非小细胞肺癌患者功能性驱动基因突变的临床意义[J]. *中华诊断学电子杂志*, 2018, 6(3):189-193.
- [31] 宋业颖, 许春伟, 吴永芳, 等. 非小细胞肺癌患者肿瘤组织中驱动基因的分子病理检测分析[J]. *临床与病理杂志*, 2015, 35(6):970-977.
- [32] 王鑫, 钟殿胜. 非小细胞肺癌 EGFR 和 ALK 基因双突变研究进展[J]. *中国肺癌杂志*, 2018, 21(9):686-691.
- [33] Mok TS, Yi LW, Thongprasert S, *et al.* Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(10):947-957.
- [34] Won J K, Keam B, Koh J, *et al.* Concomitant ALK translocation and EGFR mutation in lung cancer: A comparison of direct sequencing and sensitive assays and the impact on responsiveness to tyrosine kinase inhibitor[J]. *Ann Oncol*, 2015, 26(2):348-354.
- [35] Max MX, Bendell JC, Hurwitz HI, *et al.* Disease monitoring using post-induction circulating tumor DNA analysis following first-line therapy in patients with metastatic colorectal cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2020. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-1209.
- [36] Ricciuti B, Brambilla M, Metro G, *et al.* Targeting NTRK fusion in non-small cell lung cancer: Rationale and clinical evidence[J]. *Med Oncol*, 2017, 34(6):105.
- [37] Fernandez-Cuesta L, Plenker D, Osada H, *et al.* CD74-NRG1 fusions in lung adenocarcinoma[J]. *Cancer discov*, 2014, 4(4):415-422.
- [38] Weinberg B, Renouf D, Lim H, *et al.* NRG1-fusion positive gastrointestinal tumours: Afatinib as a novel potential treatment option[J]. *Ann Oncol*, 2019, 30(S4):iv80.
- [39] Jonna S, Feldman RA, Swensen J, *et al.* Detection of NRG1 gene fusions in solid tumors[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(16):4966-4972.