

• 论 著 •

高通量测序在非小细胞肺癌基因突变研究中的应用*

杨静丽¹, 葛 闯², 易 琳², 张海伟², 林昌海², 唐万燕², 陈 霞², 犇伟奇²

(1. 重庆医科大学附属儿童医院新生儿诊治中心/儿童发育疾病研究教育部重点实验室/
国家儿童健康与疾病临床医学研究中心/儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地/儿童感染免疫
重庆市重点实验室, 重庆 400014; 2. 重庆大学附属肿瘤医院肿瘤转移与个体化诊治
转化研究重庆市重点实验室, 重庆 400030)

摘要:目的 对非小细胞肺癌(NSCLC)精准化诊疗相关的 28 种肿瘤驱动基因进行高通量测序, 分析多基因突变与疾病临床特征的关系。**方法** 收集重庆大学附属肿瘤医院 2017 年 1 月至 2018 年 10 月 396 例 NSCLC 患者标本, 对 EGFR、ALK、ROS1、KRAS、NRAS、HRAS、PIK3CA、TP53、PTEN、BRAF、HER2、RET、MET 等 28 种基因进行高通量测序分析。**结果** EGFR 基因突变占基因突变总检出例数的 35.35%, 且基因突变频率最高的前 5 个基因占总突变的 63.89%, 表现出明显的肿瘤主基因突变聚集现象。EGFR 基因亚型同样呈明显的主次分布规律, 其中最常见突变亚型是 19del、L858R, 分别占 45.00%、41.43%。EGFR 基因的 19del、L858R 和 20ins 3 个亚型多为单突变, 而 T790M、G719X、S768I、L861Q 等亚型则常表现为共突变。T790M 伴随 L858R 突变常常是原发性突变, T790M 与 19del 共突变则常常是获得性突变。EGFR 突变标本发生其他多基因突变的检出率显著低于无 EGFR 突变标本, 可能是因为 EGFR 基因突变抑制了其他基因发生突变。**结论** 高通量测序可高效检测 NSCLC 患者与靶向治疗相关驱动基因的突变情况, 可为研究多基因突变的内在关系及突变负荷提供有效工具, 为临床医生制订 NSCLC 患者的精准诊疗方案提供有力支撑。

关键词: 非小细胞肺癌; 高通量测序; 精准化诊疗; 驱动基因; 基因突变

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2020.10.003

中图法分类号: R734.2

文章编号: 1673-4130(2020)10-1161-06

文献标识码: A

Application of high-throughput sequencing in gene mutation study of non-small cell lung cancer*

YANG Jingli¹, GE Chuang², YI Lin², ZHANG Haiwei², LIN Changhai², TANG Wanyan²,
CHEN Xia², NIAN Weiqi²

(1. Department of Neonatology/Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders/National Clinical Research Center for Child Health and Disorders/China International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders/Chongqing Key Laboratory of Child Infection and Immunity, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China;
2. Chongqing Key Laboratory of Translational Research for Cancer Metastasis and Individualized Treatment, Chongqing University Cancer Hospital, Chongqing 400030, China)

Abstract: Objective To analyze the relationship between gene mutations and clinical characteristics, high-throughput sequencing was performed on 28 tumor driver genes related to the precision diagnosis and treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** A total of 396 NSCLC samples from Chongqing University Cancer Hospital were collected, and genes including EGFR, ALK, ROS1, KRAS, NRAS, HRAS, PIK3CA, TP53, PTEN, BRAF, HER2, RET, MET were analyzed by high-throughput sequencing. **Results** EGFR gene mutation accounted for 35.35% of the total number of gene mutations detected, and the first 5 genes with the highest mutation frequency accounted for 63.89% of the total mutation, which showed an obvious aggregation of major gene mutations. The EGFR hypotypes also showed an obvious primary and secondary distribution, among which the most common mutant subsets were 19del and L858R, accounting for 45.00% and

* 基金项目: 重庆市自然科学基金先锋科学基金项目(cstc2019jcyj-xfkxX0003); 重庆市科研机构绩效激励引导专项(cstc2018jxjl130057、cstc2017jxjl130048、cstc2017jxjl130026)。

作者简介: 杨静丽, 女, 医师, 主要从事新生儿肿瘤分子机制及检测相关研究。

本文引用格式: 杨静丽, 葛闯, 易琳, 等. 高通量测序在非小细胞肺癌基因突变研究中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(10): 1161-

41.43%, respectively. The 19del mutation, L858R point mutation and 20ins of EGFR gene were mostly single mutations, while T790M, G719X, S768I and L861Q were often accompanied by co-mutations. T790M with L858R mutation was often a primary mutation, while T790M with 19del co-mutation was often an acquired mutation. The detection rate of other multi-gene mutations in EGFR mutant samples was significantly lower than that in EGFR unmutated samples, possibly EGFR gene mutation inhibited other genes from mutating.

Conclusion High-throughput sequencing can efficiently detect the mutations of 28 kinds of driver genes related to targeted therapy in NSCLC patients, which can provide an effective tool for studying the internal relationship of gene mutation load, and provide more genetic information of patients to make accurate diagnosis and treatment plans.

Key words: non-small cell lung cancer; high-throughput sequencing; accurate diagnosis and treatment; driver gene; gene mutation

肺癌的发病率和病死率均居我国恶性肿瘤的首位。非小细胞肺癌(NSCLC)占肺癌的80%~85%^[1]。人们对NSCLC的分型认知已经迈入分子水平,越来越多的肿瘤靶向基因从基础研究走向临床应用,如吉非替尼、埃克替尼、奥希替尼等酪氨酸激酶抑制剂(TKI)的靶点基因表皮生长因子受体(EGFR)^[2],克唑替尼、色瑞替尼、劳拉替尼等的靶点基因间变性淋巴瘤激酶(ALK),达拉非尼联合曲美替尼的靶点基因BRAF、MEK等。

高通量测序是一种大规模平行测序技术,可用于基因点突变、插入缺失突变、基因重排和基因拷贝数突变等多种突变类型的分析。临床上,高通量测序可以针对药物的特定靶向基因进行深度测序,从而为肿瘤患者提供更多的治疗选项^[3]。本研究对396例NSCLC患者的外周血循环肿瘤DNA(ctDNA)进行高通量测序,以分析不同类型基因突变与临床病理资料的关系,旨在为疾病的精准化诊疗提供基因水平的参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集重庆大学附属肿瘤医院2017年1月至2018年10月396例NSCLC患者的标本。标本类型为外周血。男性患者255例,女性患者141例,年龄30~86岁。所有病例均经组织病理学检查确诊,其中腺癌患者293例,鳞状细胞癌患者103例。本研究获得该院医学伦理学委员会批准,临床资料及标本采集均获患者知情同意。

1.2 仪器与试剂 无水乙醇(分析纯)、血浆游离DNA提取试剂盒购自中国天根公司;高速冷冻离心机购自韩国Genespeed公司;混匀仪、涡旋振荡器购自中国其林贝尔公司;恒温金属浴购自德国Eppendorf公司;Qubit荧光计、磁力架购自美国Thermo Fisher Scientific公司;生物安全柜购自中国海尔公司;超微量分光光度计购自美国NanoDrop公司;7500荧光定量PCR仪、数字PCR仪购自美国Thermo Fisher Scientific公司;Bioruptor[®] Pico超声波破碎仪购自比利时Diagenode公司;真空浓缩仪购自中国北京吉艾姆公司;生物分析仪购自中国Bioptic公

司;NextSeq 550基因测序仪购自美国Illumina公司。

1.3 方法

1.3.1 核酸提取 吸取500 μ L Proteinase K于50 mL离心管底,加入5 mL制备血浆(10 mL全血,2 000 r/min离心10 min,取上清;8 000 r/min离心10 min,收集上清血浆),加入Buffer 1 Mix,混匀30 s,瞬离;60 $^{\circ}$ C水浴,30 min;加入Buffer 2,混匀15~30 s,冰浴5 min。将冰浴后溶液加入真空泵抽提吸附柱中进行抽吸;然后加入600 μ L Buffer 3,真空抽吸;加入750 μ L Buffer 4,真空抽吸;加入750 μ L无水乙醇,真空抽吸;将吸附柱放入干净套管,14 000 r/min离心3 min,丢弃套管。将吸附柱装入洁净的1.5 mL收集管中,开盖,室温静置10 min;56 $^{\circ}$ C烘干,1 min;悬空滴加80 μ L NF-Water,室温静置5 min;14 000 r/min离心1 min,保留约75 μ L DNA溶液;再次滴加50 μ L NF-Water,室温静置5 min;14 000 r/min离心1 min,保留约120 μ L DNA溶液。取3 μ L DNA原液以Qubit荧光计评估核酸质量及水平。剩余DNA原液如不立即使用可冻存于-80 $^{\circ}$ C冰箱。

1.3.2 文库构建及测序 将400 ng的DNA原液转移至DNA剪切专用Covaris管中进行剪切后,转移至新的1.5 mL离心管中并纯化;进行DNA末端修复,加“A”操作;连接接头序列并用AMPure XP磁珠纯化连接后的DNA标本;在0.2 mL低吸附PCR管中配制PCR扩增体系,混匀、PCR扩增,用AMPure XP磁珠纯化扩增后的DNA文库;Qubit荧光计测定文库DNA水平,吸取600 ng文库DNA至新的0.2 mL的PCR管。 ≤ 45 $^{\circ}$ C环境下,将文库浓缩至5 μ L,加入配制好的Block Mix溶液、P5 Blocker、P7 Blocker各1 μ L,PCR扩增;捕获和洗脱杂交的文库DNA;PCR扩增上一步得到的文库DNA,并用AMPure XP磁珠进行纯化;Qubit荧光计测定文库DNA水平,文库DNA水平应 ≥ 1 ng/ μ L。根据文库DNA水平进行稀释,稀释液的终水平为1.5 ng/ μ L;qPCR精确定量文库DNA有效水平。使用NextSeq 550基因测序仪进行高通量测序。

1.3.3 生物信息学分析 使用测序数据质控软件 pk_qc_new2 去除下机数据中质量较低的数据;使用序列比对软件 BWA(版本 V0.7.12)将原始数据与人类参考基因组(GRCh37)进行比对;使用 Sambaster_V0.1.22 标记测序数据中的重复 reads 并进行去重;使用 samtools_V0.1.19 将比对文件 SAM 格式转换为 BAM 格式,并用 Sambamba_V0.5.8 对 BAM 文件进行排序,用 GenomeAnalysisTK_V3.8 局部重比对及碱基质量重校正,过滤掉突变频率 0.5% 以上的位点。分别使用 VarScan2.3、Mysv_V2.6.pl、ExomeCNV_V2 进行 SNV/Indel、SV 及 CNV 的分析。根据 dbSNP 数据库(Avsnp150)、千人基因组(1000g2015aug_all)、外显子聚合数据库(Exac03_EAS)、癌症体细胞突变数据库(Cosmic83)、Clinvar_20170905 和 SAOdbSNP150 对基因突变位点进行注释。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 进行统计学分析。计数资料以例数和率表示,组间比较采用 χ^2 检验。所有比较均为双侧检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Panel 设计及数据质量评估 本 Panel 设计检测 EGFR、KRAS、HRAS、NRAS、PIK3CA、ALK、ROS1、BRAF、HER2、RET、TP53、MET、MAP2K1、FGFR1、FGFR2、AKT1、PTEN、SMO、KIT、PDGFRA、DDR2、RB1、TSC1、MEK1、BRCA、TET2、DNMT3A、GNA11 共 28 种肿瘤驱动基因的点突变、短片段缺失突变和短片段插入突变等基因突变类型,其中 ALK、ROS1、RET 3 个基因额外检测基因重排;EGFR、FGFR1、FGFR2、MET、KIT 5 个基因额外检测基因拷贝数突变。

每例标本产生的数据量约为 3 G,测序区域覆盖度为 100%,比对率 $> 99%$;高通量测序区域去重后平均测序深度大于 2 000 X,最低测序深度 1 200 X。100%测序标本的测序质量值为 $Q20 \geq 90%$, $Q30 \geq$

85%,比对质量值 $\geq 95%$ 。99.50% 的标本文库复杂度 $> 25%$,测序数据质量可靠。经生物信息学分析比对,排除非目标区突变、低质量突变、胚系突变及同义突变。

2.2 NSCLC 患者外周血基因突变分布 396 例 NSCLC 患者的 28 种 ctDNA 基因谱表明,67.42% 的标本至少检出 1 个基因突变类型,其中 EGFR 基因突变所占比例最高为 35.35%,其余的主要突变基因包括 KRAS (9.85%)、ROS1 (7.58%)、PIK3CA (5.56%)、ALK (5.56%)、RET (4.80%)、TSC1 (4.04%)、PTEN (3.79%)、HER2 (3.28%)、BRAF (2.78%)、DDR2 (2.78%)、MET (2.27%)。基因突变检出率最高的前 5 个基因占比为 63.89%,前 10 个基因占比为 82.58%,表现出明显的主基因突变聚集现象。见图 1。

EGFR 基因亚型同样呈现出明显的主次分布规律,其中最常见突变亚型是 19del、L858R,分别占 45.00%、41.43%,剩余依次是 T790M (22.86%)、G719X (3.57%)、S768I (2.14%)、L861Q (2.14%)、20ins (1.43%),其他 (17.14%)。在 63 例 19del 突变标本中共发现 15 种亚型,占比最高的前 5 位依次是:c.2235_2249del GGA ATT AAG AGA AGC (23.81%)、c.2236_2250del (20.63%)、c.2235_2249del (12.70%)、c.2239_2248 TTA AGA GAA G>C (9.52%)、c.2240_2257del TAA GAG AAG CAA CAT CTC (9.52%),其余少见亚型占 23.81%,同样表现出明显的主亚型聚集现象。见表 1。

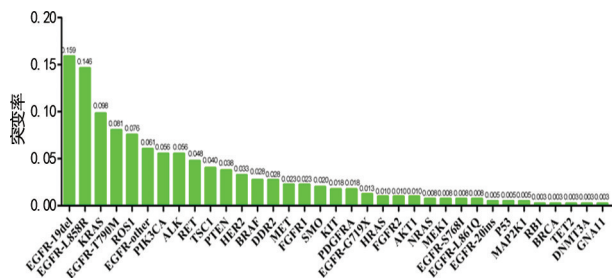


图 1 NSCLC 患者外周血 28 种基因突变谱

表 1 EGFR19 号外显子缺失突变亚型分布

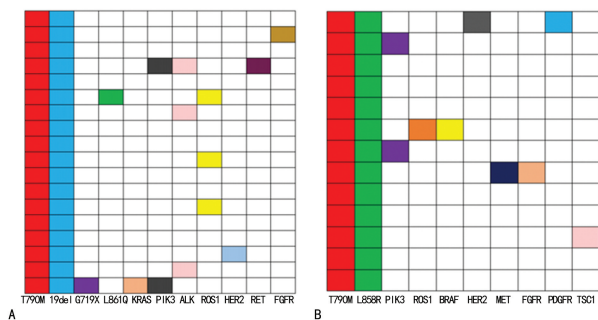
核苷酸突变	氨基酸突变	频数(n)
c.2235_2249del GGA ATT AAG AGA AGC	p. E746_A750del	15
c.2236_2250del	p. 746_750del	13
c.2235_2249del	p. 745_750del	8
c.2239_2248 TTA AGA GAA G>C	p. L747_A750delinsP	6
c.2240_2257del TAA GAG AAG CAA CAT CTC	p. L747_P753delinsS	6
c.2240_2257del	p. 747_753del	4
c.2237_2251del	p. 746_751del	2
c.2237_2255 AAT TAA GAG AAG CAA CAT C>T	p. E746_S752delinsV	2
c.2236_2244del	p. 746_748del	1
c.2237_2257 AAT TAA GAG AAG CAA CAT CTC>TCT	p. E746_P753delinsVS	1
c.2235_2252 GGA ATT AAG AGA AGC AAC>AAT	p. E746_T751delinsI	1

续表 1 EGFR19 号外显子缺失突变亚型分布

核苷酸突变	氨基酸突变	频数(n)
c. 2237_2253 AAT TAA GAG AAG CAA CA>TTG CT	p. E746_T751delinsVA	1
c. 2238_2252del ATT AAG AGA AGA AC	p. L747_T751del	1
c. 2252_2276 CAT CTC C-GAA AGC-CAA CAA G-GAA AT>A	p. T751_I759delinsN	1
c. 2212_2213ins TTA AAA TTC-CCG TCG CTA	p. V738delinsVKIP-VAI	1

2.3 NSCLC 患者 28 种基因突变的关系 本研究结果表明,EGFR 突变亚型存在明显的互斥突变与伴随突变现象。19del 缺失突变、L858R 点突变和 20ins 3 个亚型常表现为互斥突变。在 63 例 19del 突变病例中,仅有 2 例分别携带 G719X 和 L861Q,其余均为单亚型突变;58 例 L858R 突变病例中,也仅有 1 例携带 S768I 共突变;2 例 20ins 病例同样为单突变。伴随突变则多表现在罕见突变亚型上,如 32 例 T790M 突变全部都伴随其他突变位点;5 例 G719X 突变病例中,发现有 2 例携带 S768I 突变,1 例携带 L861Q 突变。

T790M 突变总是伴随 EGFR 敏感突变,主要是 19del 与 L858R 2 个亚型,且两种伴随突变形式与患者的靶向治疗密切相关。32 例 T790M 突变标本中,18 例患者经靶向治疗并出现一代 EGFR-TKI 耐药现象,其伴随突变是 19del;14 例患者未经靶向治疗,其伴随突变是 L858R。获得性 T790M 突变的患者发生基因突变的概率大于原发性 T790M 突变的患者统计分析结果,可能是因为 NSCLC 患者在靶向治疗过程中,肿瘤细胞会在靶向药物的打击下进一步发生克隆演进,导致更多基因发生突变,形成旁路激活效应,最终导致靶向药物耐药。见图 2。

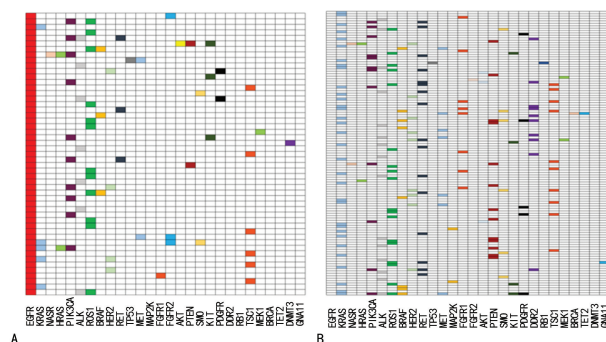


注:A 表示 T790M 获得性突变;B 表示 T790M 原发性突变。

图 2 T790M 突变状态下的多基因突变分布

2.4 阳性标本基因突变分析 140 例 EGFR 突变标本中,检测出存在其他基因突变类型的占 36.43%;256 例无 EGFR 突变标本中,检出其他基因突变类型的占 47.27%,提示 NSCLC 患者的不同基因间同样存在强烈的基因突变互斥现象($\chi^2=4.33, P=0.038$)。具体分析发现,EGFR 突变标本发生其他类型基因突变的概率显著低于无 EGFR 突变的标本,如 KRAS、ALK、RET、PTEN、DDR2、MET 等基因突变在 EGFR 突变患者中的检出率分别为 9.80%、13.73%、5.88%、3.92%、0.00%、3.92%,明显小于无 EGFR 突变患者中

的检出率(分别为 27.27%、12.40%、13.22%、10.74%、8.26%、5.79%),可能是 EGFR 基因突变抑制了其他基因发生突变。见图 3。



注:A 表示 EGFR 突变标本中多基因突变分布;B 表示无 EGFR 突变标本中多基因突变分布。

图 3 EGFR 突变及未突变状态下的多基因突变分布

2.5 基因突变与临床病理特征的关系 考察常见驱动基因突变与患者组织类型、组织分期、性别、年龄、吸烟史的关系。腺癌标本 EGFR 突变检出率(40.96%),显著高于鳞状细胞癌(19.42%),差异有统计学意义($P<0.05$);女性患者 EGFR 突变检出率(51.77%)显著高于男性(26.27%),差异有统计学意义($P<0.05$);无吸烟史的患者 EGFR 突变检出率(46.73%),明显高于有吸烟史的患者(23.86%),差异有统计学意义($P<0.05$);晚期患者(不低于 3B 期)的 EGFR 突变检出率(36.53%),高于早期(低于 3B 期)患者(14.29%),差异有统计学意义($P<0.05$);< 65 岁与 ≥ 65 岁的患者比较,EGFR 突变检出率差异无统计学意义($P=0.97$)。KRAS 基因突变的特征人群同样为无吸烟史的女性晚期腺癌患者,但因为统计人群的规模有限,差异无统计学意义($P>0.05$),需继续扩大样本量。见表 2。

表 2 主要基因突变与临床病理特征(n)

项目	n	高通量测序 检出突变	P_1	EGFR 突变	P_2	KRAS 突变	P_3
组织类型			0.55		<0.01		0.74
腺癌	293	200		120		28	
鳞状细胞癌	103	67		20		11	
性别			0.38		<0.01		0.04
男	255	168		67		31	
女	141	99		73		8	

续表 2 主要基因突变与临床病理特征(n)

项目	n	高通量测序 检出突变	P ₁	EGFR 突变	P ₂	KRAS 突变	P ₃
年龄			0.30		0.97		0.80
<65 岁	231	151		81		22	
≥65 岁	165	116		59		17	
分期			0.01		0.01		1.00
低于 3B	21	9		3		2	
不低于 3B	375	258		137		37	
吸烟史			0.41		<0.01		0.06
有	197	129		47		25	
无	199	138		93		14	

注: P₁ 表示高通量测序检出突变统计值; P₂ 表示 EGFR 突变统计值; P₃ 表示 KRAS 突变统计值。

3 讨 论

随着全球生物医药技术的飞速发展,以肺癌为代表的恶性肿瘤的诊治已进入了以生物信息大数据为基础的精准医疗时代^[4]。高通量测序技术可以对标本的核酸序列进行大规模的检测,快速得到患者个体化的全景式基因信息谱,为恶性肿瘤的精准化诊治提供支撑,并以其检测通量大、信息全面、灵敏度高的优势逐步从实验室研究阶段迈入临床应用阶段^[5]。在高通量测序临床应用方面,以美国纪念斯隆凯特琳癌症研究中心的 MSK-IMPACT 和美国 Foundation Medicin 公司的 FoundationOne CDx 最为引人注目。2018 年,中国国家药品监督管理局先后批准燃石医学、诺禾致源、世和基因及艾德生物的 4 款肿瘤高通量测序检测试剂盒,有效地规范了肿瘤诊断领域的临床选择。本研究对美国国立综合癌症网络推荐的 8 个基因及 20 个 NSCLC 常见的驱动基因进行高通量测序,研究了患者中这些基因突变的特征。

根据 396 例 NSCLC 患者的测序结果绘制基因突变图谱,发现 EGFR 的突变检出率为 35.35%,与东亚人群中 NSCLC 人群 30%~40% 的 EGFR 突变检出率一致^[6]。从组织类型看,EGFR 基因突变在肺腺癌患者中的检出率为 40.96%;肺鳞状细胞癌患者中的检出率为 19.42%,高于目前研究报道关于肺鳞状细胞癌 EGFR 突变的检出率,也反映出高通量测序技术相对于传统检测方法的灵敏度优势^[6]。同时发现,无论是 NSCLC 患者的多基因之间,还是 EGFR 亚型之间,均有明显的突变聚集现象,主要表现是基因突变检出率最高的前 10 个基因占高通量测序检出突变总数的 82.58%,EGFR 基因的 19del 与 L858R 突变 2 个亚型占据 EGFR 突变的 86.43%。同时,EGFR 基因的 19del 缺失突变、L858R 点突变和 20ins 3 个亚型上大多为单突变,很少有与其他基因亚型发生共突变的现象,表现出明显的互斥突变效应。T790M、

G719X、S768I、L861Q 等亚型则常常有共突变现象,表现出显著的伴随突变效应。本研究进一步丰富了程亚楠等^[7]关于 EGFR 19del 与 L858R 呈现出明显的互斥现象的理论,而所有 T790M 突变都与上述 2 个突变位点伴随出现。

T790M 是第一代 EGFR-TKI 药物的耐药突变^[8],但 ZHENG 等^[9]研究表明,在影像学检查显示病情有发展前的 2.2 个月即可在血浆中检测到 T790M 突变。本研究表明,T790M 伴随 L858R 突变常常是原发性突变,T790M 与 19del 共突变则常是获得性突变。获得性 T790M 突变的患者发生基因突变的概率大于原发性 T790M 突变的患者,可能是因为 NSCLC 患者靶向治疗过程中,肿瘤细胞会在靶向药物的打击下进一步克隆演进,导致更多基因发生突变,最终形成旁路激活。EGFR 突变标本发生多基因突变的频率显著低于无 EGFR 突变标本,如 KRAS、ALK、RET 等基因突变在 EGFR 突变患者中的检出率分别为 9.80%、13.73%、5.88%,明显小于无 EGFR 突变患者中的 27.27%、12.40%、13.22%,可能是因为 EGFR 基因突变抑制了其他基因发生突变。

本研究中的 ALK 在 NSCLC 中的突变检出率为 5.56%,与张绪超等^[10]报道的 3%~7% 的中国肺癌人群 ALK 突变检出率相一致。SOLOMON 等^[11]研究证实了第一代 ALK 抑制剂克唑替尼在 ALK 阳性晚期 NSCLC 一线治疗中的作用。在对克唑替尼的耐药机制研究中发现,ALK 酪氨酸激酶结构域获得性突变约占 20%,ALK 扩增占 8%^[12]。ASCEND-4 研究中第二代 ALK 抑制剂色瑞替尼一线治疗 ALK 阳性 NSCLC 的无进展生存期长达 16.6 个月,显著优于化疗组的 8.1 个月。无论有无 ALK 基因激酶区域的 2 次突变现象,患者都能从色瑞替尼治疗中获益^[13]。目前第三代 ALK 抑制剂劳拉替尼已在欧洲获批上市,第四代靶向药物已处于临床试验阶段。

BRAF 在恶性肿瘤中的突变检出率约为 8%,主要见于黑色素瘤(50%)、甲状腺乳头状癌(30%~70%),而在 NSCLC 中的突变检出率为 3%~5%^[14]。本研究中 BRAF 突变检出率为 2.78%,与张海燕等^[15]报道的中国人 4.4% 的突变检出率基本一致。BRAF 基因突变类型中,约 90% 的 BRAF 突变是第 15 号外显子的密码子 600 处的缬氨酸被谷氨酸替代,即 V600E 突变。KRON 等^[16]认为在无针对性的治疗时,非 V600E 突变型肺癌患者的预后优于 V600E 突变型肺癌患者,提示 V600E 可能是 NSCLC 预后不良的独立影响因素。JOSHI 等^[17]认为联合使用 BRAF 和 MEK 靶点抑制剂达拉非尼、曲美替尼对携带 V600E 的 NSCLC 具有良好治疗效果。

近年来,间质-上皮细胞转化在 NSCLC 中的临床应用是研究的热点,其中 MET 基因第 14 号外显子跳跃突变可作为 NSCLC 患者治疗的新靶点已经得到越

来越广泛的证实^[18]。MET 基因第 14 号外显子跳跃突变总发生率为 3%~6%，多发于肺肉瘤样癌(22%)和肺腺癌(3%~4%)^[19-20]。但 LIU 等^[21]分析了 968 例中国 NSCLC 患者的基因信息，发现 MET 基因第 14 号外显子跳跃突变仅占腺癌患者的 0.9%。MET 基因的靶向药物多为腺苷三磷酸的选择性竞争抑制剂，通过抑制 MET 的活性进而阻止下游相关激酶的磷酸化，从而实现对肿瘤细胞增殖、转移的调控。YAP 等^[22]研究了 21 例 MET 基因第 14 号外显子突变的晚期 NSCLC 患者，经克唑替尼靶向治疗，部分缓解率为 44%，疾病控制率为 50%，显示了良好的临床疗效。

4 结 论

本研究采用高通量测序技术对 NSCLC 患者 28 种靶向治疗相关驱动基因的突变信息进行全景检测，证实 EGFR 基因亚型间的分布规律及 EGFR 基因对其他基因突变的抑制作用，为临床医生制订 NSCLC 患者的精准诊疗方案提供了有力的保障。从更高层面上看，高通量测序技术的临床应用可以加快对未知病因或病因复杂的家族性肿瘤的研究与评估，也有利于发现新的致病基因，使肿瘤的预防更精准、有效。

参考文献

[1] BENNETT C W, BERCHEM G, KIM Y J, et al. Cell-free DNA and next-generation sequencing in the service of personalized medicine for lung cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(43): 71013-71035.

[2] WANG J, WANG B C, CHU H L, et al. Intrinsic resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in advanced non-small-cell lung cancer with activating EGFR mutations [J]. *Onco Targets Ther*, 2016, 9(1): 3711-3726.

[3] METZKER M L. Sequencing technologies-the next generation [J]. *Nat Rev Genet*, 2010, 11 (1): 31-46.

[4] SHEIKINE Y, KUO F C, LINDEMAN N I. Clinical and technical aspects of genomic diagnostics for precision oncology [J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(9): 929-933.

[5] MCGINN S, GUT I G. DNA sequencing-spanning the generations [J]. *N Biotechnol*, 2013, 30(4): 366-372.

[6] JANNE P A, YANG J C, KIM D W, et al. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer [J]. *N Engl J Med*, 2015, 372(18): 1689-1699.

[7] 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.

[8] CHANG Y S, CHOI C M, LEE J C. Mechanisms of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor resistance and strategies to overcome resistance in lung adenocarcinoma [J]. *Tubere Respir Dis (Seoul)*, 2016, 79(4): 248-256.

[9] ZHENG D, YE X, ZHANG M Z, et al. Plasma EGFR

T790M ctDNA status is associated with clinical outcome in advanced NSCLC patients with acquired EGFR-TKI resistance [J]. *Sci Rep*, 2016, 12(6): 20913.

[10] 张绪超, 陆舜, 张力, 等. 中国间变性淋巴瘤激酶阳性、ROS1 阳性非小细胞肺癌诊疗指南 [J]. *中华病理学杂志*, 2018, 474(4): 241-247.

[11] SOLOMON B J, MOK T, KIM D W, et al. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer [J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(23): 2167-2177.

[12] CRYSTAL A S, SHAW A T, SEQUIST L V, et al. Patient-derived models of acquired resistance can identify effective drug combinations for cancer [J]. *Sci*, 2014, 346(6216): 1480-1486.

[13] SORIA J C, TAN D S W, CHIARI R, et al. First-line ceritinib versus platinum-based chemotherapy in advanced ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (ASCEND-4): a randomised, open-label, phase 3 study [J]. *Lancet*, 2017, 389(10072): 917-929.

[14] DIENSTMANN R, TABERNERO J. BRAF as a target for cancer therapy [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2011, 11(3): 285-295.

[15] 张海艳, 胡春生, 刘斌, 等. 中国非小细胞肺癌 BRAF V600、EGFR 基因突变患者的临床病理特征分析 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2019, 24(6): 559-562.

[16] KRON A, RIEDEL R, MICHELS S, et al. 1300PD impact of co-occurring genomic alterations on overall survival of BRAF V600E and non-V600E mutated NSCLC patients: results of the Network Genomic Medicine [J]. *Ann Oncol*, 2017, 28(5): 461-462.

[17] JOSHI M, RICE S J, LIU X, et al. Trametinib with or without vemurafenib in BRAF mutated non-small cell lung cancer [J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0118210.

[18] SALGI A R. MET in lung cancer: biomarker selection based on scientific rationale [J]. *Mol Cancer Ther*, 2017, 16(4): 555-565.

[19] AWAD M M, OXNARD G R, JACKMAN D M, et al. MET exon 14 mutations in non-small-cell lung cancer are associated with advanced age and stagedependent MET genomic amplification and c-MET overexpression [J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34(7): 721-730.

[20] LIU X, JIA Y, STOOPLER M B, et al. Next-generation sequencing of pulmonary sarcomatoid carcinoma reveals high frequency of actionable MET gene mutations [J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34(8): 794-802.

[21] LIU S Y, GOU L Y, LI A N, et al. The unique characteristics of MET exon 14 mutation in chinese patients with NSCLC [J]. *J Thorac Oncol*, 2016, 11(9): 1503-1510.

[22] YAP T A, POPAT S. Targeting MET exon 14 skipping alterations: has lung cancer MET its match [J]. *J Thorac Oncol*, 2017, 12(1): 12-14.