



肺癌篇

# 指南汇编



# 目 录

非小细胞肺癌分子病理检测临床实践指南（2021版）	1-10
中国间变性淋巴瘤激酶（ALK）阳性非小细胞肺癌诊疗指南（2015）	11-18
中国非小细胞肺癌ALK检测临床实践专家共识（2019）	19-26
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	27-33
ROS1阳性非小细胞肺癌诊断病理专家共识	34-37
中国非小细胞肺癌RET基因融合临床检测专家共识	38-46
2021CSCO非小细胞肺癌诊疗指南	47-48
常见检测项目列表	49



## ·共识与指南·

# 非小细胞肺癌分子病理检测临床实践指南 (2021 版)

中华医学会病理学分会 国家病理质控中心 中华医学会肿瘤学分会肺癌学组  
中国抗癌协会肺癌专业委员会 中国胸部肿瘤研究协作组

执笔者:应建明(国家癌症中心 国家肿瘤临床医学研究中心 中国医学科学院 北京协和医学院 肿瘤医院病理科 100021);师晓华(中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院病理科 100730)

通信作者:梁智勇(中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院病理科 100730),  
Email: liangzhiyong1220@yahoo.com; 吴一龙(广东省人民医院 广东省肺癌研究所, 广州  
510080), Email: syylwu@live.cn; 陆舜(上海市胸科医院 上海交通大学附属胸科医院肿  
瘤科 200030), Email: shunlu@sjtu.edu.cn

**【摘要】** 近十年来,晚期非小细胞肺癌的治疗,尤其是靶向治疗,取得了极大的进展,分子分型是非小细胞肺癌实施靶向治疗的前提。选择准确、快速、恰当的检测方法,全面筛选出适用靶向药物的目标人群具有重要临床意义。本指南基于国内临床实践数据及结合中国国情,以国内已上市治疗药物及体外诊断检测试剂为导向制定,重在对分子病理检测实践的指导。其他靶基因及免疫治疗相关生物标志物只做简单概述,待更多实践数据的积累后更新。

## Guidelines on clinical practice of molecular tests in non-small cell lung cancer in China

Chinese Society of Pathology, Pathology Quality Control Center, Chinese Medical Association Chinese Society of Oncology, China Anti-cancer Association Chinese Society of Lung Cancer, Chinese Thoracic Oncology Group

Corresponding author: Liang Zhiyong (Department of Pathology, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100730, China), Email: liangzhiyong 1220@yahoo.com; Wu Yilong (Department of Oncology, Guangdong Provincial People's Hospital and Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangdong Lung Cancer Institute, Guangzhou 510080, China), Email: syylwu@live.cn; Lu Shun (Department of Oncology, Shanghai Chest Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China), Email: shunlu@sjtu.edu.cn

近十年来,晚期非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)的治疗,尤其是靶向治疗,取得了极大的进展,可明显提高患者治疗的客观缓解率和延长无进展生存时间(PFS),并显著提高生活质量<sup>[1-5]</sup>。分子分型是 NSCLC 实施靶向治疗的前提。研究数据表明,我国肺腺癌患者常见基因变异谱系

与西方人群存在较大差异<sup>[6-7]</sup>。选择准确、快速、恰当的检测方法,全面筛选出适用靶向药物的目标人群具有重要临床意义。同时,随着少见基因变异的不断发现以及靶向药物获得性耐药机制的完善<sup>[8-10]</sup>,临床对基因检测的内涵提出了更多的需求。另外,免疫治疗尤其是抗 PD-1/PD-L1 抑制剂的发

DOI: 10.3760/cma.j.cn112151-20201220-00945

收稿日期 2020-12-20 本文编辑 常秀青

引用本文:中华医学会病理学分会,国家病理质量控制与指导中心,中华医学会肿瘤学分会肺癌学组,等. 非小细胞肺癌分子病理检测临床实践指南(2021 版)[J]. 中华病理学杂志, 2021, 50(4): 323-332. DOI: 10.3760/cma.j.cn112151-20201220-00945.



展也显著改善了部分 NSCLC 患者预后<sup>[11-13]</sup>。如何筛选免疫治疗潜在获益人群成为新的挑战。多项临床研究表明,NSCLC 中肿瘤细胞 PD-L1 表达水平的高低与抗 PD-1/PD-L1 免疫抑制剂的疗效呈正相关<sup>[14-17]</sup>。然而,PD-L1 的检测和判读在临床实践中存在较多挑战。除 PD-L1 表达水平外,肿瘤突变负荷(tumor mutation burden, TMB)以及肿瘤微环境等也与免疫治疗疗效存在一定的相关性<sup>[18-19]</sup>。同时,分子病理检测的方法多样,包括 Sanger 测序、即时定量 PCR(qRT-PCR)、荧光原位杂交(FISH)、二代测序及免疫组织化学(IHC)等,各种检测方法具有不同的优缺点,需根据检测内容及临床需求选择恰当的检测方法;单基因检测是现阶段广泛获批的检测方法,具有快速、易开展的特点;多基因检测可一次为患者提供多种基因变异信息。现阶段,多重 PCR 检测和小 Panel 二代测序试剂盒均已经获得国家药品监督管理局(NMPA)的批准,可同时检测多个基因变异;二代测序技术能够在 DNA 及 RNA 水平进行更多基因、多位点检测,是未来分子病理的发展方向。

多年来,国内临床和病理专家一直致力于 NSCLC 分子分型检测的规范化,并制定了相应的专家共识或指南<sup>[20-29]</sup>,对如何选择检测人群、检测标本与检测方法,以及制定、优化规范化检测流程起到了重要作用。检测的标准化可提升检测结果的准确性,使患者更大程度上获益。随着临床对分子分型检测内涵需求的不断增加,尤其是我国临床实践数据的不断积累、检测问题的不断发现、新检测技术平台的应用,以及更多基因检测质控与多中心真实世界数据研究的积累,亟待更加全面的关于 NSCLC 分子分型检测的实践指导。

本指南基于国内临床实践数据、结合中国国情,以国内已上市治疗药物及体外诊断检测试剂为导向制定,重在对分子病理检测实践的指导。其他靶基因及免疫治疗相关生物标志物只做简单概述,待更多实践数据的积累后更新。分子病理实验室建设及管理规范请参照相应指南或专家共识<sup>[30-31]</sup>,本指南不作过多赘述。

### 一、NSCLC 基因变异及临床意义

NSCLC 基因变异检测主要包括靶向治疗及免疫治疗相关分子病理检测。我国 NSCLC 患者分子变异谱不同于西方人群,主要体现在腺癌,包括常见变异基因表皮生长因子受体(EGFR, 45%~55%)、KRAS(8%~10%)、间变性淋巴瘤激酶(ALK,

5%~10%),少见变异基因 ROS1(2%~3%)、MET(2%~4%)、HER2(2%~4%)、BRAF(1%~2%)、RET(1%~4%),以及罕见变异基因 NTRK(<1%)、NRG1/2(<1%)、FGFR2(<1%)等。除极少数病例存在共突变外,上述基因变异在同一个病例中普遍存在互斥现象<sup>[32]</sup>。靶向治疗相关分子病理检测详见表 1。免疫治疗相关分子病理检测(表 1)包括 PD-L1 蛋白表达和 TMB。其他生物标志物,如高度微卫星不稳定(MSI-H)在 NSCLC 中罕见。目前免疫治疗主要用于 EGFR、ALK 和 ROS1 基因变异阴性的 NSCLC 患者<sup>[34]</sup>。近年来,肺癌分子微小残留病灶(molecular residual disease, MRD)的检测已受到广泛关注,MRD 指的是经过治疗后,传统影像学(包括 PET/CT)或实验室方法不能发现,但通过液体活检发现的癌来源分子异常,代表着肺癌的持续存在和临床进展可能。目前 MRD 的临床应用及检测尚有待进一步验证和规范。

### 二、检测适用人群

1. 拟接受靶向治疗的肺浸润性腺癌(或包括含腺癌成分的 NSCLC)患者需进行靶分子基因检测。在我国,目前已上市的靶向药物明确需要伴随诊断的基因包括 EGFR、ALK、ROS1;研究数据表明,有相应靶向药物但尚未在国内上市的靶基因包括 MET、HER2、BRAF、RET、KRAS、NTRK、NRG1/2、FGFR2 等。上述基因变异主要在腺癌或含腺癌成分的肿瘤中常见。拟接受靶向治疗的肺浸润性腺癌患者(具体人群可参见《2020 CSCO 非小细胞肺癌诊疗指南》)治疗前需进行靶分子基因检测。对于晚期 NSCLC 患者,靶分子基因检测能够有效筛选靶向药物获益人群。对于术后肺腺癌患者,一方面,EGFR 基因突变阳性患者可从酪氨酸激酶抑制剂(TKI)辅助治疗中获益;另一方面,术后患者存在复发风险,分子分型可直接指导复发后肿瘤治疗方案的选择。

2. 经活检组织病理学证实为非腺癌的晚期 NSCLC 患者可推荐进行靶分子基因检测。除肺腺癌外,靶分子基因变异在其他 NSCLC 患者(如肺腺鳞癌、非特指 NSCLC、大细胞肺癌及肺肉瘤样癌等)中真实存在,且患者可在靶向药物治疗中获益。如 EGFR 基因敏感突变、EML4-ALK 基因融合可发生于非腺癌的晚期 NSCLC<sup>[35]</sup>;MET 变异在肉瘤样癌中发生率高<sup>[36]</sup>;此外,部分由活检证实为鳞状细胞癌的患者,经术后病理证实存在肺腺癌成分<sup>[37]</sup>。因此经活检组织病理学证实为非腺癌的晚期 NSCLC

表 1 非小细胞肺癌基因变异及临床意义

类别	基因	变异类型	变异频率	临床意义	国家药品监督管理局获批药物(适应证) <sup>a</sup>	美国食品药品管理局获批药物(适应证) <sup>a</sup>	检测级别	推荐级别
必检基因	EGFR	第 18~21 号外显子点突变、缺失、插入	45%~55%	靶向治疗	吉非替尼、厄洛替尼、埃克替尼、阿法替尼、达克替尼、奥希替尼、阿美替尼	吉非替尼、厄洛替尼、埃克替尼、阿法替尼、达克替尼、奥希替尼	伴随诊断	I
	ALK	重排/融合	5%~10%	靶向治疗	克唑替尼、阿来替尼、塞瑞替尼	克唑替尼、阿来替尼、塞瑞替尼、Brigatinib、Lorlatinib	伴随诊断	I
	ROS1	重排/融合	2%~3%	靶向治疗	克唑替尼	克唑替尼、Lorlatinib、Entrectinib	伴随诊断	I
	MET	第 14 号外显子跳跃突变	2%~4%	靶向治疗	赛沃替尼 <sup>b</sup>	Capmatinib、替泊替尼、克唑替尼	伴随诊断	I
扩展基因	MET	扩增	3%~19%	靶向治疗	未获批	未获批	伴随诊断	II
	HER2	第 20 号外显子插入突变	2%~4%	靶向治疗	未获批	未获批	伴随诊断	II
	BRAF	V600	1%~2%	靶向治疗	未获批	Dabrafenib、Trametinib	伴随诊断	II
	RET	重排/融合	1%~4%	靶向治疗	普拉替尼	Selpercatinib、Pralsetinib	伴随诊断	I
	KRAS	第 2、3 外显子点突变	8%~10%	分子分型 靶向治疗	不适用 未获批	不适用 未获批	排除诊断 伴随诊断	II III
	NTRK	重排/融合	<1%	靶向治疗	未获批	Larotrectinib、Entrectinib	伴随诊断	II
肿瘤突变负荷	突变、缺失、插入等	与阈值有关	免疫治疗	未获批	帕博利珠单抗	帕博利珠单抗	伴随诊断	II
PD-L1	肿瘤细胞或/和免疫细胞表达	与阈值有关	免疫治疗	帕博利珠单抗、纳武利尤单抗、度伐利尤单抗、阿替利珠单抗、卡瑞利珠单抗、特瑞普利单抗、信迪利单抗、替雷利珠单抗	帕博利珠单抗、纳武利尤单抗、度伐利尤单抗、阿替利珠单抗	伴随诊断、补充诊断	I	

注: 推荐级别: I 级: 有可及性好的适应证明确的药物, 同时有已上市的明确的伴随诊断试剂; II 级: 有适应证明确的药物及明确的伴随诊断试剂, 但药物或检测试剂可及性较差; 或临床意义明确且检测试剂可及性好; III 级: 正在探索的临床意义(如药物); <sup>a</sup>获批药物会不断更新; <sup>b</sup>优先审批

患者均可推荐进行靶分子基因检测, 以期使这部分患者获得更多治疗方案的选择。因活检标本组织小, 组织中肿瘤细胞含量相对少, 因此, 合理化及最大化使用该活检组织获得明确病理组织类型诊断及完成靶分子基因检测尤为重要, 应依据患者病情、活检组织标本情况以及临床诊治需求来选择最佳的分子病理检测方法。

3. 所有 EGFR、ALK 基因变异阴性晚期 NSCLC 患者, 如拟进行 PD-1/PD-L1 抗体药物免疫治疗, 推荐进行 PD-L1 表达检测。在 NSCLC, 肿瘤细胞 PD-L1 蛋白表达水平与抗 PD-1/PD-L1 药物免疫治疗疗效存在正相关。临床治疗因免疫治疗药物不同而对 PD-L1 检测的需求不同, 部分药物为伴随诊断, 部分为补充诊断; 同时, 不同的免疫药物可能对应不同的 PD-L1 克隆及检测体系, 判读标准也可能因药物、临床应用场景不同而不同。对拟实施抗 PD-1/PD-L1 免疫治疗的 NSCLC 患者, 可选择进行 TMB 检测。TMB 一般指特定肿瘤基因组区域内每兆碱基对(Mb)中体细胞非同义突变的个数。部分

临床研究表明, 肿瘤组织或血液中 TMB 水平与免疫治疗疗效存在相关性。尽管未达成广泛共识, 在临床实践中, 肿瘤医师在实施免疫治疗前, TMB 水平被作为重要参考指标之一。

### 三、NSCLC 常用分子病理检测方法

针对上述 NSCLC 中基因变异检测, 常见的分子病理检测方法包括 Sanger 测序、FISH、qRT-PCR、IHC、二代测序技术等(表 2)。所有分子病理检测方法均具有优缺点, 也受所检基因变异类型和数量、标本类型、标本数量和质量、实验室条件等影响(详见各基因检测相关章节)。有时需要行多平台检测互补和验证。

### 四、常见送检标本类型

1. 检测标本优先使用肿瘤组织石蜡标本: 主要包括手术、纤维支气管镜下活检、CT 引导下肺穿刺、胸腔镜、淋巴结穿刺活检等方法获取的标本。检测前需对肿瘤细胞比例进行评估, 满足检测要求后方可进行检测。对于手术标本, 优先选取肿瘤细胞比例较高的标本进行基因检测。若肿瘤细胞比

表 2 非小细胞肺癌常用分子病理检测方法主要特点比较

检测方法	检测基因变异类型	检测范围	检测标本类型	灵敏度	特异度	检测周期	检测通量
Sanger 测序	基因突变	检测范围内已知/未知突变	甲醛固定石蜡包埋标本(FFPE)、细胞学标本	10%~15%	基因突变“金标准”	3~5 d	低
荧光定量 PCR	基因突变;基因重排/融合	已知突变、已知重排/融合	FFPE、细胞学标本、体液样本 <sup>c</sup>	1%~5%	高	2~3 d	有限的多基因联合检测
荧光原位杂交	基因重排、扩增	已知/未知重排、扩增	FFPE、细胞学标本	不适应	“金标准”	2~3 d	单项检测
免疫组织化学	蛋白表达	蛋白表达	FFPE	不适应	不适应	1~2 d	单项检测
高通量测序 <sup>a</sup>	基因突变、重排等	与建库检测范围有关,检测范围内所有位点 <sup>b</sup>	FFPE、细胞学标本、体液样本 <sup>c</sup>	0.1%~5.0%	高	5~7 d	几个到几百个基因同时检测

注:<sup>a</sup>因建库原理及基于DNA或RNA的检测策略有所不同;<sup>b</sup>目前已批准的基于RNA的二代测序检测融合基因检测,只能检测已知融合类型;<sup>c</sup>体液样本检测需谨慎,灵敏度较差

例较低,可通过富集,以保证检测结果的准确可靠。

2. 细胞学标本:包括胸腔积液、经皮肺穿刺活检、支气管内超声引导细针穿刺活检(EBUS FNA)、痰、肺泡灌洗液等,需制作成石蜡包埋标本,进行肿瘤细胞比例评估,满足检测要求后可进行检测。

3. 对于少数客观上不能获得组织或细胞学标本的晚期肺癌患者,推荐血液检测。晚期 NSCLC 患者的血液中存在循环游离肿瘤 DNA(ctDNA),其血浆中 ctDNA 有更高的检出率。可用含有游离 DNA 保护剂及防细胞裂解保护剂的专用常温采血管或用常规 EDTA 抗凝管(严禁使用肝素抗凝管)采集全血并进一步分离血浆。对于部分晚期发生脑膜转移的 NSCLC 患者,脑脊液对颅内肿瘤的 ctDNA 具有富集作用,可通过腰椎穿刺获取脑脊液进行相关基因检测。与肿瘤组织相比,血液和脑脊液中的 ctDNA 含量很低,其基因检测具有较高的特异度,但灵敏度较差。

## 五、NSCLC 常见靶分子基因变异检测

### (一) EGFR

1. EGFR 基因变异类型:EGFR 基因变异包括基因突变(点突变、插入/缺失突变),主要发生在编码 EGFR 酪氨酸激酶区的第 18~21 号外显子,以及获得性耐药突变(包括第一、二代 TKI 的耐药突变 T790M 和第三代 TKI 的耐药突变 C797S 等)。EGFR 基因扩增对选择 TKI 治疗目前无明确临床意义。

2. EGFR 基因突变常用检测方法及主要特点:目前 EGFR 基因突变检测的方法有很多种,临床常用的检测方法包括 Sanger 测序法、qRT-PCR 法和二代测序等。这些方法各有优势和劣势,不管使用何种检测方法,均应包括 EGFR 最主要的突变位点外

显子 19 缺失(19del)和外显子 21 点突变(L858R),还应包括外显子 18 点突变(G719X),外显子 20 插入突变(20ins)和点突变(T790M、S768I),外显子 21 点突变(L861Q)等。Sanger 测序法是直接可检测已知和未知突变的一种方法,是早期广泛应用的 EGFR 基因突变检测方法。但 Sanger 测序法检测 EGFR 基因突变的灵敏度较低,操作步骤复杂、容易产生污染,已不能完全满足临床 EGFR 基因突变检测的需求。基于 qRT-PCR 的方法,需要根据 EGFR 基因已知的突变类型设计引物探针,无法检测出所有可能的突变,但灵敏度相对较高,操作简单,无需对 PCR 产物进行操作,在很大程度上避免了扩增产物的污染,易于在临床开展,是目前 EGFR 基因突变检测最常用的检测技术之一。二代测序是一种高通量测序技术,能够同时对多基因、多位点进行测序。二代测序检测方法主要包括实验操作和生物信息学分析两部分。实验操作部分包括样本准备、文库制备、目标区域富集、测序等;生物信息学分析部分包括测序后的数据质量分析、比对、变异识别、注释和结果报告与解释等。相较于传统测序技术,二代测序可以一次性检测大量靶基因,能够分析基因变异的丰度,相对成本低。然而二代测序操作步骤多、程序复杂,任一环节出现问题,都会影响检测结果的准确性,结果的判读依赖生物信息的准确分析,因此二代测序检测必须经过严格的质量控制。二代测序检测 EGFR 基因突变,检测位点更加全面,可以发现罕见突变位点,为晚期 NSCLC 患者的全流程管理提供依据。

3. EGFR 基因检测临床实践常见问题及解决策略:(1)常见突变位点:目前中国已上市的 qRT-PCR 体外诊断试剂盒主要包括 EGFR 第 18~21 号外显子

常见突变类型(20~40多种)。(2)罕见突变位点:随着二代测序检测普遍应用于临床检测,越来越多的罕见突变位点被发现,尤其是外显子19插入突变和外显子20插入突变,约占全部EGFR突变的5%。其中约一半以上EGFR罕见突变对TKI靶向药物治疗敏感,EGFR基因罕见位点的检测也有助于正在研发中药物的临床试验入组。因此,对于传统方法检测的驱动基因阴性晚期肺腺癌患者,推荐进行二代测序检测。(3)耐药机制检测:目前EGFR-TKI的耐药机制已经基本明确,大部分是由EGFR T790M的获得性突变,约占50%。其他机制包括MET基因扩增、KRAS突变、BRAF突变等。因此,对于第一、二代EGFR-TKI耐药患者,优先推荐进行T790M检测(qRT-PCR或二代测序)。也可同时与其他耐药机制进行检测或T790M检测阴性后用高通量技术(二代测序)进行其他耐药机制的检测。第三代TKI耐药患者,推荐进行二代测序检测耐药机制。另外,组织学形态的转化(如小细胞癌、鳞癌)也是TKI耐药机制之一<sup>[38-39]</sup>。

## (二)ALK

1.ALK基因变异类型:ALK基因变异类型包括基因重排/融合,以及获得性耐药突变(点突变为主)。目前至少发现了20多种EML4-ALK融合变异亚型。此外还有更多少见/罕见的ALK融合伴侣不断被发现<sup>[40]</sup>。上述ALK基因重排均可导致融合基因/蛋白的表达,提示适用于抗ALK抑制剂靶向治疗。尽管有研究结果显示不同的变异亚型可能与抗ALK治疗的PFS时间相关,但不同研究的结果存在差异,其临床意义尚待我们进一步研究<sup>[41-42]</sup>。ALK激酶区的获得性突变是ALK抑制剂治疗耐药的主要机制之一,对指导耐药患者的后续临床治疗具有一定的指导意义<sup>[43]</sup>。

2.ALK基因变异常用检测方法及主要特点:ALK基因重排导致ALK融合基因的表达,可以在多个分子水平上进行检测,包括FISH在DNA水平上检测ALK基因重排;qRT-PCR检测ALK融合mRNA;IHC检测ALK融合蛋白表达,以及二代测序检测DNA水平上的重排序列或mRNA水平上的融合序列。比对研究证明各检测平台间存在较高的符合率,但也存在各检测平台结果不一致的病例<sup>[44]</sup>。ALK Ventana D5F3 IHC检测方法是目前最快速、经济的方法,并且二元结果判读标准简便易行。该判读标准仅适用于肺腺癌,该检测在用于鳞癌、神经内分泌癌等其他类型肺癌标本时应谨慎,

疑似阳性标本需要使用其他方法进行验证。在临床实践中要警惕IHC结果判读中存在的陷阱,避免非特异性着色。**FISH检测是检测ALK重排的“金标准”,检测结果判读直观,对样本质量要求较低**,但费用较高、经济效益比不佳。并且在FISH判读时,对于处于临界值分离信号、不典型分离信号等的判定需要格外谨慎,推荐利用其他技术平台复核检测。基于qRT-PCR方法的ALK融合基因检测具有较高的灵敏度和特异度,但因为qRT-PCR只能检测已知ALK融合基因类型,所以存在假阴性。另外,由于qRT-PCR基于mRNA扩增技术,因此实验室内外部质控等应制定最严格的技术标准,防止污染。ALK基因融合通过捕获平台在DNA/RNA水平或扩增子平台在RNA水平上进行检测。基于捕获平台检测结果的灵敏度和特异度均很高,而且能够检测到包括已知和未知位点在内的ALK重排,但是其准确性可能会受捕获探针覆盖区域、覆盖度、标本DNA质量,以及生物信息学分析等关键因素影响。另外,极少数情况下,在DNA水平上检测到的基因重排(如intergenic translocation)可能并不会引起融合蛋白的表达。在RNA水平上采用扩增子的测序方式具有很高的检测灵敏度和特异度。但其检测范围一般仅局限于特定的常见位点,罕见融合可能会漏检。对于质控不合格或结果不典型病例,报告时应加备注,并建议使用其他技术平台进行复检。尽管同样存在灵敏度问题,二代测序可在血液中检出ALK基因变异,注意假阴性结果的出现。

3.ALK基因检测临床实践常见问题及解决策略:在进行IHC-Ventana D5F3、FISH、qRT-PCR及二代测序检测结果判读时,对于检测结果不能确定、信号不典型或者位于临界值的患者,应建议使用其他技术平台进行检测。优先应用IHC-Ventana D5F3进行ALK检测。当怀疑检测标本有质量问题时,优先应用FISH检测。当和其他基因(如EGFR、ROS1等)一起检测时,可以进行qRT-PCR或二代测序检测。

## (三)ROS1

1.ROS1基因变异类型:ROS1基因变异包括ROS1基因重排。目前共发现十余种ROS1基因融合伴侣,主要包括CD74、SLC34A2、CCDC6、TPM3、EZR等,其断裂位点主要位于ROS1基因的第32~36号外显子<sup>[45]</sup>。

2.ROS1基因检测方法及主要特点:ROS1基因

重排/融合表达检测各种方法学与 ALK 相似,但 IHC 抗体特异性不佳,目前不能直接用于检测 ROS1 基因重排/融合表达,仅可用于 ROS1 基因融合初筛。另外 ROS1 融合类型没有出现如 EML4-ALK 这样特别集中的融合形式。基于 qRT-PCR 方法的 ROS1 融合基因检测具有较高的灵敏度和特异度,且可与 ALK 联检。**FISH 检测是检测 ROS1 重排的“金标准”。**二代测序检测 ROS1 基因变异同样可在 DNA 水平上检测重排序列,也可在 mRNA 水平检测融合序列,但由于 ROS1 基因序列的特殊性,基于 DNA 水平的二代测序检测灵敏度受文库探针设计及生物信息学分析能力影响较大,应注意假阴性。

**3.ROS1 基因检测临床实践常见问题及解决策略:**IHC 检测 ROS1 蛋白表达用于初筛 ROS1 融合临床应用前,实验室应经过严格的检测流程、判读标准、质量控制和保证,阳性病例需经过其他技术平台进行验证。在进行 FISH、qRT-PCR 及二代测序检测结果判读时,对于检测结果不能确定、信号不典型或者位于临界值的患者,应建议使用其他技术平台进行检测。当和其他基因(如 EGFR、ALK 等)一起检测时,可以进行 qRT-PCR 或二代测序检测。

#### (四)PD-L1

**1.PD-L1 表达检测:**通过 IHC 检测肿瘤细胞和/或免疫细胞 PD-L1 的表达水平是目前判断 NSCLC 患者能否从免疫检查点抑制剂治疗中得到更多获益的主要评估手段。目前我国已批准 3 种标准化的 PD-L1 检测商用试剂盒用于临床检测,包括配套 Dako 平台的 PD-L1 IHC 22C3 pharmDx 试剂盒及浓缩液、PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 试剂盒以及配套 Ventana 检测平台 SP263 试剂盒。未上市的检测试剂还包括基于 Ventana 检测平台的 SP142 试剂盒。不同单抗和 IHC 染色平台的使用、PD-L1 染色阳性截断值的设定与相应的免疫治疗药物疗效相关。PD-L1 检测所用抗体克隆不同其阳性阈值不同;PD-L1 染色阳性定义:22C3、28-8 和 SP263 抗体的阳性定义为任何强度完整或部分肿瘤细胞胞膜着色,SP142 抗体将阳性的肿瘤细胞和免疫细胞均纳入阳性标准中。

**2.PD-L1 表达检测临床实践常见问题及解决策略:**经 3.7% 中性甲醛固定石蜡包埋的肿瘤组织样本是检测 PD-L1 表达标准的标本类型。手术切除标本和活检标本均可进行 PD-L1 检测。由于肿瘤具有异质性,PD-L1 表达在瘤内和瘤间存在一定的

异质性。采用活检标本进行 PD-L1 应保证足够的标本量。目前,仅组织学标本被批准用于 PD-L1 检测,细胞学标本尚未经过临床验证,实验室需做好充分的方法验证和质量控制;在组织学标本不可获得的情况下,可尝试用细胞学蜡块标本进行 PD-L1 检测,但在报告中应予以必要的说明,仅供临床参考。应合理安排驱动基因检测和 PD-L1 检测,建议同时检测,当标本有限时,尤其是肺腺癌患者,应优先考虑驱动基因检测(EGFR、ALK、ROS1 等)。

#### (五)MET

**1.MET 基因变异类型:**在 NSCLC 的临床实践中,根据已有的循证医学证据,目前主要关注 MET 第 14 号外显子跳跃突变和 MET 扩增的检测。目前国外已有 MET 抑制剂获批用于含 MET 第 14 号外显子跳跃突变 NSCLC 患者的靶向治疗,国内亦有赛沃替尼(Savolitinib)已进入优先审批。MET 扩增包括原发扩增和继发扩增,其中继发扩增较多见于驱动基因阳性患者经 TKI 治疗进展后,是 EGFR-TKI 治疗耐药的重要机制之一,MET 抑制剂赛沃替尼、替泊替尼(Tepotinib)联合 EGFR 抑制剂等已有 I / II 期研究数据发表<sup>[46-47]</sup>,对耐药患者的后续临床治疗有一定的指导意义。

**2.MET 基因变异的常用检测方法及主要特点:**MET 第 14 号外显子跳跃突变的检测,包括二代测序或 qRT-PCR 直接检测缺失 MET 第 14 号外显子的 mRNA,或二代测序在 DNA 水平上检测可能导致 MET 第 14 号外显子剪切的基因变异。基于 RNA 的检测在临床实践中应注重 mRNA 质量,在检测前应做好质控,如发现 mRNA 已经降解建议重新取材检测。MET 基因探针覆盖范围不够可能导致基于 DNA 的二代测序发生漏检,建议二代测序检测应尽量涵盖第 14 号外显子外的如第 13 或 14 号内含子上可能发生剪切变异的区域。**原位杂交检测是检测 MET 扩增的标准方法。**目前临床研究中不同的 FISH 判读标准[Cappuzzo 标准和 UCCC (University of Colorado Cancer Center) 标准]均有使用,在临床实践中建议尽可能采用能够区分出定点扩增和多倍体的 UCCC 标准<sup>[48]</sup>。相较于 FISH,二代测序可用于 MET 扩增检测,但与 FISH 检测的对应性比较复杂,并可能遗漏 MET 多体<sup>[49]</sup>,但是二代测序可同时检测 MET 突变和融合等其他变异,且能实现多基因共检,在临床实践中应用更广。

#### 3.MET 基因检测临床实践常见问题及解决策

略:在临床实践中,MET 基因第 14 号外显子跳跃突变的检测,可与其他驱动基因变异同时检测,或对其他驱动基因变异阴性的患者进行单独检测。应根据可及的检测平台、标本质量及标本类型,合理选择不同的检测方法。可参考其他融合基因检测策略。当组织标本不可及时,血浆标本也可以考虑用于 MET 第 14 号外显子跳跃突变的检测,作为补充<sup>[50]</sup>。

MET 扩增的检测尤其在 EGFR-TKI 耐药人群中,如有充足的肿瘤组织标本,可以考虑优先选择二代测序。对于检测结果不能确定、有扩增信号但不典型或者位于临界值的患者,应建议使用 FISH 进行复测。对于特殊患者人群,如 EGFR-TKI 耐药后 T790M 及其他耐药机制阴性人群,或者组织标本肿瘤细胞含量较低时,考虑到二代测序检测拷贝数变异可能存在的漏检风险,MET 扩增二代测序报告阴性时,仍可考虑 FISH 复测。以组织为参照,血浆检测 MET 扩增现有数据表明其灵敏度低,在报告中应予以必要的说明,血浆检测仅供临床参考,检测阴性不能排除 MET 扩增。

#### (六) 其他靶分子

1. HER2、BRAF、KRAS、RET、NTRK 等:除了上述靶分子外,HER2 基因突变或扩增、BRAF 突变、KRAS 突变、RET 基因重排、NTRK 家族基因重排等,均为 NSCLC 中重要的驱动基因变异,并是潜在的治疗靶点<sup>[51]</sup>。他们的检测方法可参照基因点突变、基因重排类型的检测方法和检测策略。更多的尚需临床实践的积累。HER2 是酪氨酸激酶受体 ERBB 家族成员之一,HER2 基因突变或扩增是 NSCLC 的驱动基因之一,其中最常见的基因变异为 HER2 外显子 20 插入性突变,在 NSCLC 的突变率为 2%~4%<sup>[52]</sup>。BRAF 突变可导致 MAPK/ERK 信号通路异常活化,BRAF 突变常见位点为 V600,在 NSCLC 中变异频率为 1%~2%<sup>[53]</sup>。亚洲人群中 KRAS 基因突变率为 8%~10%,突变位点位于外显子 2 及 3,易发生在吸烟的肺腺癌患者,并且易伴发其他基因变异,如 LKB1、p53、CDKN2A/B 等,KRAS 突变与患者预后差、耐药等相关<sup>[54]</sup>。NSCLC 中 RET 融合基因变异频率为 1%~4%,最常见的 RET 基因融合伴侣为 KIF5B (70%~90%) 和 CCDC6 (10%~25%),美国食品药品管理局 (FDA) 已批准 Selpercatinib 和 Pralsetinib 用于伴有 RET 易位的肿瘤<sup>[55]</sup>,国内亦有普拉替尼进入优先审批。NTRK 融合基因在 NSCLC 中罕见,发生率小于 0.1%,美国

FDA 已批准 Larotrectinib 及 Entrectinib 用于 NTRK 融合阳性的实体瘤的靶向治疗<sup>[56-57]</sup>。

2.TMB: 目前还没有通用标准值和检测流程,但在部分临床研究和实践中已经在使用的生物标志物,涉及二代测序 Panel 设计及算法,以及肿瘤人群数据的划分,相对复杂,国际上也暂无指南共识,仅有个别检测方法获批,因此还需要更多的临床试验及真实数据的验证。

#### 六、检测策略优化

检测策略应该兼顾时效性和靶向基因数量,在评估患者可供检测的标本质量及能适用的检测方法后,综合考虑患者就诊时间和疾病进展情况,对初测和复测的患者选择适宜的检测策略,为临床治疗决策提供最大程度的帮助。优先推荐多基因联合检测,如多重 PCR;高通量基因检测是未来发展方向;在组织标本不足、医院条件限制等情况下,可首选单基因检测。

1. 单基因检测:EGFR、ALK、ROS1 均可进行单基因分别检测;在某些特殊临床检测场景中,优先推荐单基因检测:(1)对于部分晚期患者,在组织标本量极少,不能满足联合检测的情况下可试行 ALK IHC 和/或 ROS1 的 FISH 单基因检测;(2)组织标本质量欠佳,不能满足二代测序等检测要求时,应用 FISH 检测 ALK 和/或 ROS1 重排。其余基因可考虑血液/脑脊液检测;对于第一、二代 EGFR-TKI 耐药患者,如样本量较少,可仅考虑进行 T790M 检测。

2. 多基因联合检测:使用多种平台行多基因联合检测,如 qRT-PCR 同时检测 EGFR、ALK、ROS1、RET 和 MET 第 14 号外显子跳跃突变。应重视多基因联合检测对各自基因变异检测的局限性,必要时可联合单基因检测技术。因多基因、多平台联合检测组织样本消耗较多,且成本较高,如要对所有必检和扩展靶点基因进行全面检测,推荐高通量基因检测。

3. 高通量基因检测:相比传统的检测方法,二代测序一次实验可同时对多个靶点基因的突变、重排和扩增进行检测,从而有效地避免样本浪费、节约检测时间并相对地降低检测费用,因此,有条件的实验室推荐对初治患者使用二代测序对 NSCLC 的所有必检和扩展靶点基因进行筛选,对于 EGFR-TKI 耐药患者也推荐二代测序检测,以全面地查找耐药原因。但是,需认识到二代测序平台自身的一些缺陷,必要时可使用其他单基因检测或多

基因联合检测的方法并用或验证,尤其对于二代测序检测结果全阴的样本。如DNA二代测序检测结果驱动基因阴性的样本,可以使用其他检测方法在RNA或蛋白水平复检,以保证全面地检出靶点基因变异。

## 七、室内外质控

1. 检测实验室应在临床应用前建立及优化检测规范化流程,并进行性能验证。

2. 检测实验室应定期参加室间质评活动,每项检测项目每年至少两次。

3. 检测实验室均应设置阴、阳性对照。

4. 检测实验室应制定专人负责基因检测的质量控制,定期组织人员比对、培训及数据总结和分析。

在临床操作中,行之有效的质量控制系统对于病理诊断与评估的可信度来说至关重要。检测实验室应在临床应用前建立及优化基因检测规范化流程,并进行性能验证[ 阴阳性质合率、最低检测限(如适用)等]。质量控制主要包括室内质控与室间质控。室内质控除了常规性的设立阳性及阴性对照,还包括不同检测方法比对、不同检测人员比对、新试剂性能验证及定期抽检等,以及定期进行人员培训及数据总结和分析。室内质控的主要目的就是确保实验步骤的准确性和控制实验室每次检测结果的可靠性、有效性。检测实验室应定期参加室间质评活动,每年至少两次。室间质控可以通过参加国内权威机构举办的室间质评活动来完成,也可通过与其他实验室(如已获资格认可的实验室、使用相同检测方法的实验室或使用配套系统的实验室)比对的方式确定检验结果的可靠性。

## 八、临床病理沟通

应建立包括临床医师、病理医师、分子检测及生物信息学分析人员等在内的分子肿瘤团队及相关运行机制,加强临床病理沟通。沟通内容包括但不限于:(1)分子病理检测送检流程(包括基因检测前、检测后及耐药后再次检测)及分子病理报告内涵;(2)本单位检测或外送检测的肿瘤组织或细胞学标本应由病理医师进行肿瘤细胞含量的评估;(3)当存在检测结果不一致或与临床病理不符时,应与检测医师或相关人员沟通,确保检测结果均无异议时,方可进行相关治疗;(4)当需要外送独立实验室检测时,应联合对外送检测的独立实验室进行质量评价;(5)靶向药物耐药机制检测内容的制定;(6)开展定期相关专业进展学术会议。

**免责声明** 本文中公布的临床实践指南内容由专家组成员依据现有医学证据及临床实践经验共同讨论形成,以帮助相关人员进行非小细胞肺癌分子病理检测或临床治疗决策。其中的内容可能不够全面或不够充分。医学知识发展迅速,在本指南产生到发表期间均可能出现新的证据,而这些可能并没有体现在本指南中。另外,因检测流程复杂、实验室条件差异以及患者之间存在个体差异等影响检测决策或结果,因此,本指南中内容的采用应结合检测条件、政策许可以及专业人员的专业知识独立判断。对本指南内容的使用是自愿的。专家组成员明确否认对文中所提及的任何产品具有商业性目的。专家组对因使用本指南内容而造成的或与之相关的任何人身伤害或财产损失,或任何错误或遗漏不承担责任。

**中国非小细胞肺癌分子病理检测临床实践指南专家组成员**  
(按单位名称汉语拼音字母顺序排列):北京大学人民医院胸外科(杨帆);北京大学医学部病理学系(张波);北京大学肿瘤医院病理科(林冬梅);北京医院病理科(刘东戈);复旦大学附属肿瘤医院病理科(李媛、周晓燕);广东省人民医院广东省肺癌研究所肿瘤内科(吴一龙、张绪超);河南省肿瘤医院病理科(马杰);解放军总医院第一医学中心病理科(石怀银);空军军医大学西京医院病理科(王哲);上海市胸科医院上海交通大学附属胸科医院病理科(韩昱晨),肿瘤科(陆舜);首都医科大学宣武医院病理科(滕梁红);四川大学华西医院病理科(唐源、蒋莉莉);苏州大学附属第一医院病理科(郭凌川),胸外科(马海涛);郑州大学第一附属医院病理科(李文才);中国科学院大学附属肿瘤医院(浙江省肿瘤医院)(苏丹);中国医学科学院北京协和医学院北京协和医院病理科(梁智勇、师晓华、吴焕文、武莎斐、曾瑄),呼吸科(王孟昭);中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院病理科(李卫华、邱田、应建明);中山大学附属第一医院病理科(韩安家);中山大学附属肿瘤医院分子病理室(邵建永)

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参 考 文 献

- [1] Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial[J]. Lancet Oncol, 2010, 11(2): 121-128. DOI: 10.1016/S1470-2045(09)70364-X.
- [2] Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma[J]. N Engl J Med, 2009, 361(10): 947-957. DOI: 10.1056/NEJMoa0810699.
- [3] Nishio M, Kim DW, Wu YL, et al. Crizotinib versus chemotherapy in Asian patients with ALK-positive advanced non-small cell lung cancer[J]. Cancer Res Treat, 2018, 50(3):691-700. DOI: 10.4143/crt.2017.280.
- [4] Solomon BJ, Mok T, Kim DW, et al. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer[J]. N Engl J Med, 2014, 371(23):2167-2177. DOI: 10.1056/NEJMoa1408440.

- [5] Soria JC, Tan D, 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. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)30123-X.
- [6] Li W, Qiu T, Ling Y, et al. Subjecting appropriate lung adenocarcinoma samples to next-generation sequencing-based molecular testing: challenges and possible solutions[J]. Mol Oncol, 2018, 12(5): 677-689. DOI: 10.1002/1878-0261.12190.
- [7] Dacic S, Shuai Y, Yousem S, et al. Clinicopathological predictors of EGFR/KRAS mutational status in primary lung adenocarcinomas[J]. Mod Pathol, 2010, 23(2): 159-168. DOI: 10.1038/modpathol.2009.154.
- [8] Pennell NA, Arcila ME, Gandara DR, et al. Biomarker testing for patients with advanced non-small cell lung cancer: real-world issues and tough choices[J]. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2019, 39: 531-542. DOI: 10.1200/EDBK\_237863.
- [9] Mok TS, Wu YL, Ahn MJ, et al. Osimertinib or platinum-pemetrexed in EGFR T790M-positive lung cancer[J]. N Engl J Med, 2017, 376(7): 629-640. DOI: 10.1056/NEJMoa1612674.
- [10] Oxnard GR, Arcila ME, Sima CS, et al. Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in EGFR-mutant lung cancer: distinct natural history of patients with tumors harboring the T790M mutation[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(6): 1616-1622. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2692.
- [11] Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer[J]. N Engl J Med, 2015, 373(2): 123-135. DOI: 10.1056/NEJMoa1504627.
- [12] Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer[J]. N Engl J Med, 2015, 373(17): 1627-1639. DOI: 10.1056/NEJMoa1507643.
- [13] Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D, et al. Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial[J]. Lancet, 2017, 389(10066): 255-265. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)32517-X.
- [14] Mahoney KM, Atkins MB. Prognostic and predictive markers for the new immunotherapies[J]. Oncology (Williston Park), 2014, 28 Suppl 3:39-48.
- [15] Garon EB, Rizvi NA, Hui R, et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer[J]. N Engl J Med, 2015, 372(21): 2018-2028. DOI: 10.1056/NEJMoa1501824.
- [16] Fehrenbacher L, Spira A, Ballinger M, et al. Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial[J]. Lancet, 2016, 387(10030): 1837-1846. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)00587-0.
- [17] Mok T, Wu YL, Kudaba I, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for previously untreated, PD-L1-expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-042): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial[J]. Lancet, 2019, 393(10183): 1819-1830. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)32409-7.
- [18] Rizvi NA, Cho BC, Reinmuth N, et al. Durvalumab with or without tremelimumab vs standard chemotherapy in first-line treatment of metastatic non-small cell lung cancer: the MYSTIC phase 3 randomized clinical trial[J]. JAMA Oncol, 2020, 6(5): 661-674. DOI: 10.1001/jamaoncology.2020.0237.
- [19] Singal G, Miller PG, Agarwala V, et al. Association of patient characteristics and tumor genomics with clinical outcomes among patients with non-small cell lung cancer using a clinicogenomic database[J]. JAMA, 2019, 321(14): 1391-1399. DOI: 10.1001/jama.2019.3241.
- [20] 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[J]. 中华病理学杂志, 2011, 40 (10): 700-702. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2011.10.014.
- [21] 张绪超, 陆舜, 张力, 等. 中国间变性淋巴瘤激酶(ALK)阳性非小细胞肺癌诊疗指南[J]. 中华病理学杂志, 2015, 44(10): 696-703. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2015.10.003.
- [22] 《非小细胞肺癌血液 EGFR 基因突变检测中国专家共识》制. 非小细胞肺癌血液 EGFR 基因突变检测中国专家共识[J]. 中华医学杂志, 2015, 95(46): 3721-3726. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2015.46.001.
- [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. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2016.04.001.
- [24] 中国抗癌协会病理专业委员会肺癌学组. ROS1 阳性非小细胞肺癌诊断病理专家共识[J]. 中华病理学杂志, 2018, 47(4): 248-251. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2018.04.004.
- [25] 张绪超, 陆舜, 张力, 等. 中国间变性淋巴瘤激酶(ALK)阳性非小细胞肺癌诊断专家共识(2013 版)[J]. 中华病理学杂志, 2013, 42(6): 402-406. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2013.06.012.
- [26] 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, 47(4): 241-247. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2018.04.003.
- [27] 中国非小细胞肺癌 ALK 检测模式真实世界多中心研究专家组, 中华医学会病理学分会分子病理学组. 中国非小细胞肺癌 ALK 检测临床实践专家共识[J]. 中华病理学杂志, 2019, 48(12): 913-920. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2019.12.001.
- [28] 中国抗癌协会肿瘤病理专业委员会, 中国临床肿瘤学会肿瘤病理专家委员会, 中国临床肿瘤学会非小细胞肺癌专家委员会. 中国非小细胞肺癌 PD-L1 表达检测临床病理专家共识[J]. 中华肿瘤杂志, 2020, 42(7): 513-521. DOI: 10.3760/cma.j.cn112152-20200313-00202.
- [29] 王恩华, 朱明华, 步宏, 等. 非小细胞肺癌靶向药物治疗相关基因检测的规范建议[J]. 中华病理学杂志, 2016, 45(2): 73-77. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2016.02.001.
- [30] 中华医学会病理学分会, 中国医师协会病理科医师分会, 中国抗癌协会肿瘤病理专业委员会, 等. 分子病理诊断实验室建设指南(试行)[J]. 中华病理学杂志, 2015, 44(6): 369-371. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2015.

- 06.001.
- [31] 《临床分子病理实验室二代基因测序检测专家共识》编写组. 临床分子病理实验室二代基因测序检测专家共识[J]. 中华病理学杂志, 2017, 46(3): 145-148. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2017.03.001.
- [32] Chen J, Yang H, Teo A, et al. Genomic landscape of lung adenocarcinoma in East Asians[J]. Nat Genet, 2020, 52(2): 177-186. DOI: 10.1038/s41588-019-0569-6.
- [33] 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. DOI: 10.3760/cma.j. issn. 0529-5807.2016.04.002.
- [34] Gregg JP, Li T, Yoneda KY. Molecular testing strategies in non-small cell lung cancer: optimizing the diagnostic journey[J]. Transl Lung Cancer Res, 2019, 8(3): 286-301. DOI: 10.21037/tlcr.2019.04.14.
- [35] Watanabe J, Togo S, Sumiyoshi I, et al. Clinical features of squamous cell lung cancer with anaplastic lymphoma kinase (ALK)-rearrangement: a retrospective analysis and review[J]. Oncotarget, 2018, 9(35): 24000-24013. DOI: 10.18632/oncotarget.25257.
- [36] Liu X, Jia Y, Stoopler MB, 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. DOI: 10.1200/JCO.2015.62.0674.
- [37] Ho HL, Kao HL, Yeh YC, et al. The importance of EGFR mutation testing in squamous cell carcinoma or non-small cell carcinoma favor squamous cell carcinoma diagnosed from small lung biopsies[J]. Diagn Pathol, 2019, 14(1):59. DOI: 10.1186/s13000-019-0840-2.
- [38] Yu HA, Arcila ME, Rekhtman N, et al. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers [J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(8): 2240-2247. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2246.
- [39] Shinohara S, Ichiki Y, Fukuichi Y, et al. Squamous cell carcinoma transformation from adenocarcinoma as an acquired resistance after the EGFR TKI therapy in (EGFR-mutated) non-small cell lung cancer[J]. J Thorac Dis, 2018, 10(7): E526-E531. DOI: 10.21037/jtd.2018.06.83.
- [40] Rosenbaum JN, Bloom R, Forys JT, et al. Genomic heterogeneity of ALK fusion breakpoints in non-small-cell lung cancer[J]. Mod Pathol, 2018, 31(5): 791-808. DOI: 10.1038/modpathol.2017.181.
- [41] Lin JJ, Zhu VW, Yoda S, et al. Impact of EML4-ALK variant on resistance mechanisms and clinical outcomes in ALK-positive lung cancer[J]. J Clin Oncol, 2018, 36(12): 1199-1206. DOI: 10.1200/JCO.2017.76.2294.
- [42] Li Y, Zhang T, Zhang J, et al. Response to crizotinib in advanced ALK-rearranged non-small cell lung cancers with different ALK-fusion variants[J]. Lung Cancer, 2018, 118:128-133. DOI: 10.1016/j.lungcan.2018.01.026.
- [43] Katayama R, Shaw AT, Khan TM, et al. Mechanisms of acquired crizotinib resistance in ALK-rearranged lung Cancers[J]. Sci Transl Med, 2012, 4(120): 120ra17. DOI: 10.1126/scitranslmed.3003316.
- [44] Ying J, Guo L, Qiu T, et al. Diagnostic value of a novel fully automated immunochemistry assay for detection of ALK rearrangement in primary lung adenocarcinoma[J]. Ann Oncol, 2013, 24(10): 2589-2593. DOI: 10.1093/annonc/mdt295.
- [45] Bubendorf L, Büttner R, Al-Dayel F, et al. Testing for ROS1 in non-small cell lung cancer: a review with recommendations[J]. Virchows Arch, 2016, 469(5): 489-503. DOI: 10.1007/s00428-016-2000-3.
- [46] Sequist LV, Han JY, Ahn MJ, et al. Osimertinib plus savolitinib in patients with EGFR mutation-positive, MET-amplified, non-small-cell lung cancer after progression on EGFR tyrosine kinase inhibitors: interim results from a multicentre, open-label, phase 1b study[J]. Lancet Oncol, 2020, 21(3): 373-386. DOI: 10.1016/S1470-2045(19)30785-5.
- [47] Wu YL, Cheng Y, Zhou J, et al. Tepotinib plus gefitinib in patients with EGFR-mutant non-small-cell lung cancer with MET overexpression or MET amplification and acquired resistance to previous EGFR inhibitor (INSIGHT study): an open-label, phase 1b/2, multicentre, randomised trial[J]. Lancet Respir Med, 2020, 8(11): 1132-1143. DOI: 10.1016/S2213-2600(20)30154-5.
- [48] Go H, Jeon YK, Park HJ, et al. High MET gene copy number leads to shorter survival in patients with non-small cell lung cancer[J]. J Thorac Oncol, 2010, 5(3): 305-313. DOI: 10.1097/JTO.0b013e3181ce3d1d.
- [49] Moro-Sibilot D, Cozic N, Pérol M, et al. Crizotinib in c-MET-or ROS1-positive NSCLC: results of the AcSé phase II trial[J]. Ann Oncol, 2019, 30(12): 1985-1991. DOI: 10.1093/annonc/mdz407.
- [50] Paik PK, Felip E, Veillon R, et al. Tepotinib in non-small-cell lung cancer with MET exon 14 skipping mutations[J]. N Engl J Med, 2020, 383(10): 931-943. DOI: 10.1056/NEJMoa2004407.
- [51] Halliday PR, Blakely CM, Bivona TG. Emerging targeted therapies for the treatment of non-small cell lung cancer [J]. Curr Oncol Rep, 2019, 21(3): 21. DOI: 10.1007/s11912-019-0770-x.
- [52] Jebbink M, de Langen AJ, Boelens MC, et al. The force of HER2: a druggable target in NSCLC? [J]. Cancer Treat Rev, 2020, 86:101996. DOI: 10.1016/j.ctrv.2020.101996.
- [53] Leonetti A, Facchinetto F, Rossi G, et al. BRAF in non-small cell lung cancer (NSCLC): pickaxing another brick in the wall[J]. Cancer Treat Rev, 2018, 66:82-94. DOI: 10.1016/j.ctrv.2018.04.006.
- [54] Cai D, Hu C, Li L, et al. The prevalence and prognostic value of KRAS co-mutation subtypes in Chinese advanced non-small cell lung cancer patients[J]. Cancer Med, 2020, 9(1):84-93. DOI: 10.1002/cam4.2682.
- [55] Drilon A, Oxnard GR, Tan D, et al. Efficacy of selercatinib in RET fusion-positive non-small-cell lung cancer[J]. N Engl J Med, 2020, 383(9): 813-824. DOI: 10.1056/NEJMoa2005653.
- [56] Lassen U. Entrectinib for ROS1 fusion-positive NSCLC and NTRK fusion-positive solid tumours[J]. Lancet Oncol, 2020, 21(2): 193-194. DOI: 10.1016/S1470-2045(19)30789-2.
- [57] Haratake N, Seto T. NTRK fusion-positive non-small-cell Lung cancer: the diagnosis and targeted therapy[J]. Clin Lung Cancer, 2021, 22(1): 1-5. DOI: 10.1016/j.clcc.2020.10.013.

## · 标准与规范 ·

# 中国间变性淋巴瘤激酶(ALK)阳性非小细胞肺癌诊疗指南

张绪超 陆舜 张力 廖美琳 王长利 程颖 李甘地 Tony Mok 黄诚 刘晓晴  
 王洁 王孟昭 张沂平 周建英 周晓军 周晓燕 林冬梅 杨衿记 宋勇 王凯  
 何勇 李慧 钟文昭 吴一龙

代表中国临床肿瘤学会(CSCO)肿瘤标志物专家委员会

原发性肺癌(简称肺癌)是我国最常见的恶性肿瘤之一。根据世界卫生组织(WHO)癌症Globocan数据库,2012年我国新发肺癌患者达65.28万,居所有恶性肿瘤之首<sup>[1]</sup>,约占全球1/3,其中80%以上的患者为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer)。近十多年来,随着分子医学的进展和靶向药物的不断涌现,非小细胞肺癌的治疗已由化疗为主进入到个体化分子靶向“精准”治疗的时代。目前临床应用的个体化分子靶向治疗主要针对表皮生长因子(EGFR)突变型和间变性淋巴瘤激酶(ALK)融合基因型肺癌,这两种基因变异型肺癌均具有明确的分子靶点、靶点检测技术及上市的靶向药物,临床疗效得到明显提高。其他基因变异型肺癌的靶向药物和伴随分子诊断(companion diagnostics)技术正在不断研发中。

肺癌中ALK变异主要为ALK基因与其他基因发生断裂重排。其中,棘皮动物微管结合样蛋白4(EML4)-ALK融合基因变异是其主要类型,除了EML4外,肺癌中与ALK基因融合的其他基因还包括TFG和KIF5B等<sup>[2-4]</sup>。国内外大量的研究数据显

示,发生ALK重排的非小细胞肺癌患者占3%~7%<sup>[4-6]</sup>。

目前,在中国获批的针对ALK靶点的小分子抑制剂为克唑替尼(crizotinib),针对ALK靶点的其他小分子抑制剂如赛瑞替尼(ceritinib)已被美国食品和药品管理局(FDA)批准用于克唑替尼治疗失败后的患者<sup>[7]</sup>。在我国,相关适应证目前还处在临床试验阶段。克唑替尼是一种ATP竞争性酪氨酸激酶抑制剂,既可特异性靶向抑制ALK,也可抑制c-MET和ROS1等信号通路。临床试验显示对于ALK阳性的晚期非小细胞肺癌患者,克唑替尼的疗效显著优于传统化疗,一线单药治疗患者的中位无进展生存期(PFS)为10.9个月,有效率高达74%<sup>[8]</sup>,二线单药治疗患者的中位PFS为7.7个月,有效率达到65.3%<sup>[9]</sup>。2014年9月《新英格兰医学杂志》发表了克唑替尼在ROS1阳性晚期非小细胞肺癌患者1期扩展临床研究结果,在该研究中,克唑替尼在ROS1阳性非小细胞肺癌总体缓解率达到72%。中位缓解持续时间为17.6个月,中位PFS为19.2个月,且ROS1融合基因的种类不影响疗效<sup>[10]</sup>。

目前针对ALK融合基因检测的常用方法有3种:荧光原位杂交(FISH)、即时荧光定量PCR技术(RT-PCR)和免疫组织化学法(IHC)。上述3种方法各有其优缺点。FISH价格昂贵,操作规范要求较高,且不能区分ALK融合类型(fusion variants);RT-PCR对标本质量要求较高,需专用的试剂盒进行检测;IHC简便易行,但阳性标准不统一。ALK阳性非小细胞肺癌虽仅占全部非小细胞肺癌的3%~7%,但是每年新发病例数在中国仍接近35 000例<sup>[11]</sup>。因此,如何准确和规范地诊断和治疗ALK阳性非小细胞肺癌便成了临床上的当务之急。

DOI:10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2015.10.003

作者单位:510080广州,广东省肺癌研究所/广东省人民医院/广东省医学科学院(张绪超、杨衿记、钟文昭、吴一龙);上海交通大学附属胸科医院(陆舜、廖美琳);中山大学肿瘤医院(张力);天津医科大学附属肿瘤医院(王长利);吉林省肿瘤医院(程颖、李慧);四川大学华西医院(李甘地);香港中文大学医学院(Tony Mok);福建省肿瘤医院(黄诚);解放军第三〇七医院(刘晓晴);北京大学肿瘤医院(王洁、林冬梅);中国医学科学院北京协和医学院北京协和医院(王孟昭);浙江省肿瘤医院(张沂平);浙江大学医学院附属第一医院(周建英);南京军区南京总医院(周晓军、宋勇);复旦大学附属肿瘤医院(周晓燕);浙江大学医学院附属第二医院(王凯);第三军医大学大坪医院(何勇)

通信作者:吴一龙,E-mail:syylwu@live.cn

中国临床肿瘤学会(Chinese Society of Clinical Oncology,CSCO)肿瘤标志物专家委员会于2013年组织诊断和治疗领域专家制定了中国ALK阳性非小细胞肺癌的诊断专家共识(2013版)<sup>[12]</sup>。基于近年来新出现的大量研究和循证医学证据,肿瘤标志物专家委员会决定对2013版专家共识进行更新,并将共识升级为指南及补充治疗指南。

### 一、ALK 阳性非小细胞肺癌的定义

2007年Soda等<sup>[2]</sup>和Rikova等<sup>[13]</sup>分别发现肺癌中存在EML4-ALK融合基因变异现象,且该基因变异具有致癌性,明确了EML4-ALK融合基因是肺癌的驱动基因之一。2009年Shaw等<sup>[14]</sup>将ALK基因重排阳性的肺癌列为非小细胞肺癌的一个特定分子亚型。根据已有的研究结果,CSCO肿瘤标志物专家委员会讨论认为,从检测方法学角度考虑,ALK融合型非小细胞肺癌不仅是基因序列层面的改变即序列重排,ALK融合蛋白也是该类疾病中的重要变异,因此将此类疾病统称为“ALK阳性非小细胞肺癌”。检测方法具体包括ALK基因FISH检测、ALK融合变异RT-PCR检测或ALK融合蛋白IHC检测阳性的肺癌。该类肺癌是非小细胞肺癌的一个分子亚型,常见于腺癌,其患者通常可从ALK酪氨酸激酶抑制剂(TKI)治疗中获益。

### 二、ALK 检测适宜人群

CSCO肿瘤标志物专家委员会讨论了肺癌中ALK检测的适宜人群、标本条件及与其他分子标志物分析的关系,做出以下推荐或建议。

1. 晚期非小细胞肺癌患者使用ALK TKI治疗前必须检测ALK融合变异状态。推荐所有含腺癌成分的非小细胞肺癌患者在诊断时常规进行ALK融合基因或融合蛋白检测<sup>(1类)</sup>(证据级别定义请见文章末注释)。

2. 对于小活检标本或者不吸烟的鳞状细胞癌患者也建议进行ALK检测<sup>(1类)</sup>。

3. 检测前应有送检标本的质控,包括亚型确认和标本量确认。送检标本类型包括手术标本、活检组织标本、胸水等细胞学标本。由于部分活检组织标本临床取材小标本的局限性,有时无法保证肺腺癌的准确诊断,应考虑对不能判断组织学类型的肺癌也进行ALK检测<sup>(1类)</sup>。

4. 对于送检标本ALK融合和EGFR突变双阴性的患者,美国国家综合癌症网络(NCCN)指南推荐进一步检测ROS1的重排,考虑到小活检标本的有限性,关于ROS1的检测,在患者的允许下,推荐

ROS1、ALK 和 EGFR 同时检测<sup>(2A类)</sup>。目前关于ROS1检测方法还没有完全统一,建议有条件的实验室先进行ALK/ROS1的IHC检测,ROS1检测结果阳性的患者,进一步使用FISH或者RT-PCR确诊。

5. 为了避免标本浪费和节约检测时间,对于晚期非小细胞肺癌活检标本,建议一次性切出需要诊断组织类型和ALK/EGFR检测的标本量,避免重复切片浪费标本<sup>(2A类)</sup>。

6. 有研究表明,在我国年龄是ALK阳性非小细胞肺癌一项显著的独立预测因子,在年轻非小细胞肺癌患者中,发生ALK融合的概率显著高于发生EGFR突变的概率<sup>[15]</sup>,在年龄小于51岁的患者中,发生ALK重排的概率高达18.5%<sup>[15]</sup>。因此对于样本量有限、可能不能满足同时检测ALK/EGFR检测的样本,对年轻的患者,建议优先检测ALK融合状态<sup>(2B类)</sup>。

### 三、ALK 阳性非小细胞肺癌的检测

目前,我国国家食品药品监督管理总局(CFDA)批准的诊断ALK阳性非小细胞肺癌的诊断试剂盒有雅培贸易(上海)有限公司的ALK基因重组检测试剂盒(FISH法)、罗氏诊断产品(上海)有限公司的Ventana抗ALK抗体诊断试剂盒(IHC法)和厦门艾德生物医药科技有限公司的EML4-ALK融合基因检测试剂盒(RT-PCR法)。对于ALK阳性非小细胞肺癌的诊断,推荐使用CFDA批准的诊断试剂和方法进行诊断<sup>(1类)</sup>。

具体使用何种方法,检测实验室应根据组织标本类型选择合适的检测技术。当怀疑一种技术的可靠性时(如FISH的肿瘤细胞融合率接近15%时),可以考虑采用另一种技术加以验证。其他检测手段如常规IHC技术可以作为ALK融合基因的初筛手段,对于初筛结果ALK阳性的患者建议使用上述3种批准的检测方法之一进行确诊。

1. FISH:在针对ALK阳性的非小细胞肺癌的临床试验中,大部分研究检测ALK融合均是基于FISH的诊断,因此,FISH检测目前仍是诊断ALK融合基因的经典方法。2014年10月CFDA批准雅培FISH分离探针试剂盒(Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit)用于诊断ALK融合基因。该试剂盒设计的两种探针分别标记ALK基因的两端,300 kb的3'端和442 kb的5'端分别标记为橘红色和绿色。在无ALK融合基因表达的肿瘤细胞中,橘红色和绿色重叠为黄色或者相互黏合(两个信号之间的间隔

小于两个信号的直径);而在存在 ALK 融合基因表达的肿瘤细胞中,橘红色和绿色信号相互分离(间隔 $\geq 2$ 个信号直径)或绿色信号缺失。标本 FISH 阳性结果的判定标准为单个视野中的 50 个肺癌细胞中至少有 25 个存在分离信号或绿色信号缺失,或者两个不同视野中的 100 个肺癌细胞中至少有 15 个存在分离信号或绿色信号缺失。详细的 FISH 阳性判读标准可参见雅培 ALK 分离 FISH 探针试剂盒说明书。ALK FISH 技术适用的组织样本类型:4% 中性甲醛固定后石蜡包埋标本,采用防脱落技术处理的玻片装载切片,厚度 3~5 μm。FISH 检测 ALK 融合也存在不足之处。首先,FISH 检测对于操作和判读技术要求较高,诊断医师必须经过严格的 FISH 操作和结果判读培训。只有经 FISH 操作经验丰富的医师判定的结果才具有可靠性。其次,晚期非小细胞肺癌患者通常只能提供 2 mm 左右的小活检组织,很难保证每个视野均存在 50 个以上的肺癌细胞进行判读。此外,FISH 检测结果的判断界值(cut-off 值)也存在商榷之处,已有多项研究发现少数 ALK FISH 阴性、IHC 阳性的患者也能从克唑替尼治疗中明显获益<sup>[16-17]</sup>。最后,目前 FISH 检测的成本昂贵,且不能明确 ALK 融合基因的具体融合变异体。因此,虽然 FISH 检测仍是经典 ALK 诊断手段,但现阶段尚无法适用于中国 ALK 阳性非小细胞肺癌患者的大规模筛查和诊断。

2. IHC: (1) Ventana IHC: 由罗氏公司开发的 Ventana anti-ALK 抗体诊断试剂盒在 2013 年获 CFDA 批准用于诊断 ALK 阳性非小细胞肺癌。由于其在全自动免疫组织化学仪器上操作,检测流程和结果判读都得以标准化。该技术平台方法使用了基于非内源性半抗原、信号扩增多聚体和辣根过氧化物酶(HRP)系统的染色信号放大技术。在不影响检测特异性的前提下,大大提高了 ALK 融合蛋白 IHC 检测的敏感性。结果判读时采用简单易行的二分类系统,即仅为阳性和阴性两种,阳性结果即可诊断为 ALK 阳性非小细胞肺癌。大量研究数据表明其与 FISH 结果的吻合率达到 95% 以上<sup>[17-18]</sup>,结果判读的可重复性大于 95%<sup>[18-19]</sup>,目前在中国已经广泛应用于临床 ALK 阳性非小细胞肺癌的诊断。同时,由于操作简便,检测准确度较高,相对于其他诊断方法价格便宜。国际上其他 ALK 抑制剂的 3 期临床试验中,ALK Ventana IHC 已经成为 ALK 阳性非小细胞肺癌的首选检测方法。因此专家共识推荐:Ventana IHC 可以作为 ALK 阳性非小细胞肺癌

的临床首选的常规诊断方法<sup>(2A类)</sup>。诊断报告中应该注明 Ventana IHC 方法,以区别于初筛的常规 IHC 方法。虽然 Ventana IHC 具有操作简便、检测的准确度较高、相对于其他诊断方法价格便宜等优势,但 Ventana IHC 需要专门的自动化染色仪器,而目前,在相当一部分检测实验室还没有 Ventana 的染色自动化仪器,这在一定程度限制了它在临床上的广泛使用。Ventana IHC 技术适用的临床标本类型:4% 中性甲醛液固定后石蜡包埋标本,采用防脱落技术处理的玻片装载切片,厚度 3~5 μm。(2) 常规 IHC 技术:由于 FISH 检测存在由于经济适用性差和技术操作有难度不易普及的不足,Ventana IHC 自动化设备在中国相当一部分检测实验室还没有普及。因此,有必要有一种初筛的方法来满足部分检测实验室的需求。目前已有较多学者不断探索其他的分子诊断检测方法。常规 IHC 技术因其具有简便易行、价格便宜、操作方法成熟等特点,成为潜在有效的筛查方法之一。目前,在非小细胞肺癌患者中,可以用于 ALK 融合基因筛选的抗体主要为 D5F3 (Cell Signaling 公司) 和 5A4 (Abcam 公司),它们检测 ALK 融合蛋白的敏感性和特异性分别达到了 100% 和 95%~99%<sup>[20]</sup>, ALK1 抗体敏感性较低 (ALK1, Dako 公司),不适宜用于 ALK 融合基因的检测<sup>[20]</sup>。总结已报道的数据后发现(表 1),常规(指非自动化仪器辅助的手工操作) IHC 检测的强阳性与 FISH 检测阳性之间存在高度的一致性。IHC 3+、2+、1+、-的患者 FISH 阳性率分别为 95.9%、57.0%、5.8% 和 0。现有数据也证实 ALK IHC 阳性与克唑替尼临床疗效之间存在相关性<sup>[21]</sup>。

采用 IHC 法需注意以下两点:第一,由于 ALK 的蛋白表达与神经外胚层的分化有关,故其可能在小细胞肺癌和正常人的脑组织中表达<sup>[22]</sup>,因此不建议在小细胞肺癌中使用 ALK 融合蛋白的 IHC 检测;第二,常规 ALK IHC 操作和判读标准还未统一,在实验室开展常规 ALK IHC 前,需要对抗原修复、一抗的类型和浓度、抗体孵育的温度和时间等关键步骤进行优化统一,建议采用国内病理专家已经达成共识的规范化操作和判读标准进行操作<sup>[23]</sup>。

由于常规 IHC 存在上述优缺点,考虑到晚期非小细胞肺癌样本的有限性,而常规 IHC 在临床实践中具有可操作性,我们推荐:(1)有条件的单位首选 Ventana IHC 方法检测<sup>(1类)</sup>;(2)对于不能开展 ALK Ventana IHC 检测的实验室,鼓励患者尤其是小活检标本患者,将标本送到周边能开展 Ventana

**表 1 免疫组织化学(IHC)与荧光原位杂交(FISH)  
检测 ALK 结果对照(例)**

研究项目	病例数	FISH	IHC 3 +	IHC 2 +	IHC 1 +	IHC -
Kim 等 <sup>[24]</sup>	464	阳性	14	3	0	0
		阴性	1	7	14	425
Yi 等 <sup>[25]</sup>	101	阳性	8	1	1	0
		阴性	0	2	20	69
Blackhall 等 <sup>[26]</sup>	1 281	阳性	20	6	2	0
		阴性	2	4	46	1 201
Han 等 <sup>[27]</sup>	119	阳性	37	7	1	0
		阴性	2	1	5	66
Park 等 <sup>[28]</sup>	262	阳性	9	11	5	0
		阴性	0	2	1	234
Zhou 等 <sup>[29]</sup>	368	阳性	25	5	0	0
		阴性	1	4	51	282
Takamochi 等 <sup>[30]</sup>	360	阳性	10	0	0	0
		阴性	0	1	2	347
Paik 等 <sup>[31]</sup>	735	阳性	15	13	0	0
		阴性	0	7	20	680
Paik 等 <sup>[32]</sup>	640	阳性	22	6	0	0
		阴性	0	10	16	586
Selinger 等 <sup>[33]</sup>	594	阳性	4	1	2	0
		阴性	1	2	3	581
合计	4 924	阳性	164	53	11	0
		阴性	7	40	178	4 471

IHC 检测的实验室进行 ALK 融合基因检测<sup>(2A类)</sup>; (3)在条件缺乏的地区建议采用常规 IHC 法进行 ALK 阳性非小细胞肺癌患者的初筛,筛查 ALK 阳性或疑似阳性的患者必须接受 FISH、Ventana IHC 或者 RT-PCR 技术中任意一种技术确诊<sup>(2A类)</sup>。

3. 基于 PCR 扩增的方法: (1) 即时定量 RT-PCR: RT-PCR 法检测 ALK 融合基因的特点在于快速、简便易行、能同时明确 ALK 已知的融合变体的类型。既往 RT-PCR 的不足之处在于假阴性率高,这是由于 RT-PCR 对于 RNA 的质量要求较高,若结果为阴性,则很难判定是真阴性还是 RNA 降解所致的假阴性。此外,目前在非小细胞肺癌中已陆续发现了超过 20 种不同的 ALK 融合变体,不能排除仍有未知融合变体的存在。因此,无法检测未知的融合型是其最大的不足之处。这些因素限制了 RT-PCR 在 ALK 融合基因诊断中的应用。目前,随着 PCR 技术的进步,上述很多问题已能得到很好的解决,RT-PCR 的检测结果与 FISH 检测的阳性吻合率和阴性吻合率分别达到 98.4% 和 94.6%<sup>[34-35]</sup>。2013 年 CFDA 已批准厦门艾德生物技术有限公司的可用于临床的 ALK 融合基因检测试剂盒(EMLA-ALK 融合基因检测试剂盒),通过多重引物 RT-PCR 法,需 100~500 ng 肿瘤组织的 RNA,即可

检测出 EML4-ALK 融合基因的阳性信号。该试剂盒可检测 7 种不同的 EML4-ALK 融合基因型,基本涵盖了常见的 EML4-ALK 融合基因型。该方法适用于甲醛液固定石蜡包埋的肿瘤组织标本和各类新鲜组织或细胞学标本。不过,RT-PCR 法也存在着无法检测未知的融合变体和对 RNA 提取质量要求较高等不足之处,需要临幊上提高组织标本的保存质量。(2) cDNA 末端快速扩增 PCR 联合测序方法:除了 RT-PCR 方法外,广东省肺癌研究所 Zhang 等<sup>[36]</sup>采用 cDNA 末端快速扩增 PCR 联合测序技术成功检测分析了 ALK 基因的融合变异。该方法的独到之处在于采用 cDNA 末端快速扩增技术结合两轮 PCR 技术来富集扩增 ALK 基因的融合变体,敏感性高,不限于检测 EML4 与 ALK 的融合,而且可以检测到其他任何基因与 ALK 的融合,联合 PCR 产物的直接测序步骤能够明确融合是来自 EML4-ALK 多种变体中的具体哪一种。这具有一定的临床意义。已知不同 EML4-ALK 融合基因变体的酪氨酸激酶活性程度有明显差异,因而可能对临床用药剂量有一定的指导价值。该方法主要适用于各类新鲜组织或细胞学标本。

开展基于 PCR 技术检测 ALK 融合变异的实验室环境要求应该能够保证检测质量,PCR 实验室需要符合我国卫生计生委临床检测中心的临检 PCR 实验室资格认证条件。各检测实验室应做好室内质控,并积极参与外部质控评价项目。考虑到 PCR 扩增片段的非特异性技术特点,判断基于 PCR 技术诊断 ALK 融合变异阳性应该满足以下条件:PCR 产物经测序后序列比对确认存在 ALK 融合序列、或基于融合变异序列特异性荧光探针的即时定量 PCR 检测结果阳性。单纯 RT-PCR 产物经电泳后的条带观察不推荐作为 ALK 融合基因诊断依据。

上述多种技术都可以选择,各有优缺点,存在一定的互补性。结合临幊可获得的各类生物材料标本(手术或穿刺活检组织、胸水细胞学和痰液细胞学等),有效利用各种检测分析技术获得最高检出率具有重要科学意义和临床意义。

4. 可用于检测 ALK 的其他方法简介:(1)高通量测序技术:高通量测序 (high-throughput sequencing) 又名下一代测序 (next generation sequencing, NGS), 是相对于传统的桑格测序 (Sanger sequencing) 而言的。NGS 是近几年发展最为迅速的技术之一,以其高数据输出量与高解析度的特性,不仅可以同时检测多个基因的突变、融合和拷贝数变

化情况,而且使得检测的费用和时间大大缩短。2014 年在美国临床肿瘤学会(ASCO)会议上,Ali 等<sup>[37]</sup>展示了利用 NGS 可以有效鉴定出 FISH 不能诊断出的 ALK 阳性肺癌患者,在 9 例 ALK NGS 阳性 FISH 阴性的患者中,5 例患者对克唑替尼治疗有响应,2 例无响应,还有 2 例无法评估,显示了 NGS 在 ALK 检测上的优越性。除了检测灵敏度比较高外,NGS 还可以同时检测多个其他靶点。这样既节约了标本,也节省了患者等待检测结果的时间,对于突变频率不高的靶点,重要性显著提高。基于这些优势,NCCN 肺癌指南从 2014 年第 3 版开始,推荐使用 NGS 同时检测 EGFR 突变和 ALK 融合。NGS 虽然具有很多优势,国内外有多款 NGS 仪器获得 CFDA 批准用于临床,且有多家公司正在研发基于 NGS 的肿瘤生物标志物检测试剂盒。但目前,关于 NGS 检测样本的质控、数据的解析等一系列问题还没有明确的规范。国内也没有一款获批的基于 NGS 的肿瘤生物标志物检测试剂盒,且目前 NGS 的收费还比较高。因此,在临床常规检测中,暂不推荐使用 NGS 来常规检测 EGFR 突变和 ALK 融合,但各中心可以根据实际情况,在临床研究中使用 NGS 来筛查 ALK 等相关基因的融合突变情况。(2)特异性的 RT-PCR 联合测序方法:特异性 RT-PCR 是确认非小细胞肺癌存在 ALK 融合基因的另一种快速诊断方法。技术优势在于其检测突变转录本的高敏感性,如发现扩增产物则意味着 ALK 融合基因。该技术也存在一些不足。首先,RT-PCR 分析必须基于单管多重技术(multiplex),由于 EML4-ALK 融合基因至少存在 11 种变体和非 EML4 的其他融合配对者,所以任何基于 PCR 的检测策略必须配对所有已知 ALK 融合基因的明确引物,否则对于潜在的非 EML4 基因的配对者与 ALK 基因融合就无法检测出来,而且对于潜在的 EML4 第 21 号外显子与 ALK 融合的转录变体长度达 1 284 bp 也可能难于检测。

第二,肺癌患者甲醛液固定石蜡包埋组织提取的 RNA 很容易降解,与新鲜冷冻组织相比,采用 RT-PCR 操作甲醛液固定石蜡包埋组织标本 RNA 的难度较大。第三,存在出现非特异性扩增的风险而出现假阳性,需要较高的实验室环境,防止出现交叉污染。在常规临床诊断实验室可能难于开展。

#### 四、ALK 阳性非小细胞肺癌诊断流程

鉴于 ALK 基因重排或融合的常用分子诊断各种方法的优缺点(表 2),且我国适用于 ALK 变异检测的肺癌患者人数众多,需要在临床建立一套行之有效的分子诊断流程。常规 IHC 因其具有方便、易行、价格低的优势,适合于 ALK 阳性非小细胞肺癌的筛查。FISH、Ventana IHC 和 RT-PCR 已获 CFDA 批准用于临床检测,适合于最终的确诊。以上 3 种方法的具体操作流程和注意事项可参见 CFDA 批准的产品说明书。

**ALK 检测总体原则:**综合获取的各类生物材料的特征、分子检测方法的特点、实验室自身条件,进行多学科大协作,合理采取有效检测方法和流程,以保证 ALK 融合型非小细胞肺癌的检出率和准确率。

适合 ALK 融合基因诊断的肿瘤标本,包括各种组织标本和细胞学标本。组织标本获取手段包括手术切除、支气管镜检、经皮肺穿刺、淋巴结活检、手术活检等。对于恶性胸腔积液、心包积液、痰液或支气管灌洗液和细胞学穿刺等标本,在细胞数量充足条件下可制备细胞学标本蜡块(cell block),检测方法可采用 FISH、IHC 或 RT-PCR<sup>[38]</sup>,如果是新鲜细胞标本可考虑采用特异性 PCR 方法。考虑到细胞学标本的细胞数量少等特点,细胞学标本的检测结果解释需格外谨慎。

**综合考虑上述讨论因素:**各类检测技术的优缺点和各组织类型的技术适用性特点,CSCO 肿瘤标志物专家委员会推荐以下用于临床实践的检测流程图(图 1)。

表 2 免疫组织化学、荧光原位杂交和即时定量逆转录聚合酶链反应检测 ALK 方法的比较

项目	荧光原位杂交	免疫组织化学	即时定量逆转录聚合酶链反应
敏感性 <sup>[34]</sup>	10% ~ 15%	5% ~ 10%	1% ~ 5%
检测费用	高	低	高
可检测的融合型	所有融合型,但不能区分	所有融合型,但不能区分	已知或未知的融合型
操作要求	高,需经过培训且有经验的医师判读结果	简便,几乎所有病理科医师均可诊断	简便,但需特定的试剂盒及仪器
所需组织量	厚度 3 ~ 5 μm 石蜡切片	厚度 3 ~ 5 μm 石蜡切片	100 ~ 500 ng RNA 的组织
优点	特异性高	操作简便、价格便宜	操作简便、敏感性高
不足之处	操作要求高、价格昂贵、尚不适用于 ALK 融合阳性患者的筛查	判定标准主观、无法直接检测融合基因	无法检测未知的融合型、对 RNA 质量要求高

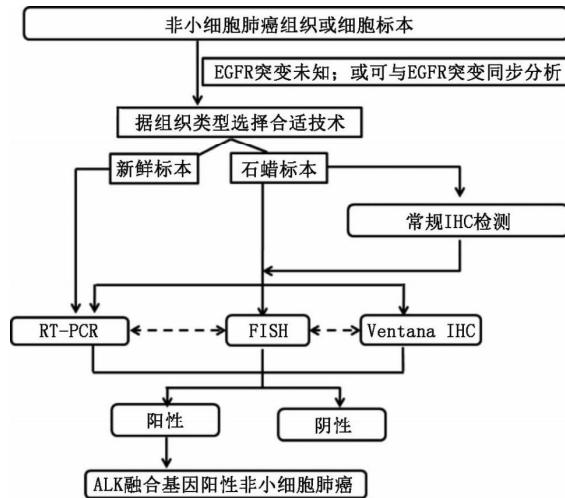


图 1 中国 ALK 阳性非小细胞肺癌患者的诊断流程图

1. 对于部分无条件行 Ventana IHC 检测的医疗机构或中心,常规 ALK IHC 可作为初筛方法,但阳性标本需以 CFDA 批准的 FISH、Ventana IHC 或 RT-PCR 技术进一步确诊。

2. 所有含腺癌成分的非小细胞肺癌,应在诊断时常规进行 ALK 融合基因检测。

3. ALK 抗体使用推荐:常规 IHC 建议使用 Cell Signaling 公司的 D5F3 克隆号、Abcam 或 Novocastra 公司的 5A4 克隆号抗体;Ventana IHC 使用专用抗体试剂盒(D5F3)。

4. 流程图中 FISH、RT-PCR、Ventana IHC 技术之间的虚线表示单一技术检测结果判断不确定(equivocal)时三种方法之间可相互验证结果。

5. NCCN 肺癌指南从 2014 年第 3 版开始,推荐使用 NGS 来同时检测 EGFR 突变和 ALK 融合。NGS 虽然具有很多优势,但目前,关于 NGS 检测标本的质控、数据的解析等一系列问题还没有明确的规范。国内也没有一款获批的基于 NGS 的肿瘤生物标志物检测试剂盒,且目前 NGS 的收费还比较高。因此,在临床常规检测中,暂不推荐使用 NGS 来常规检测 EGFR 突变和 ALK 融合,但各中心可以根据实际情况,在临床研究中使用 NGS 来筛查 ALK 等相关基因的融合突变情况。

## 五、ALK 阳性晚期非小细胞肺癌的治疗

1. 一线治疗:对于晚期非小细胞肺癌,含铂双药方案是标准一线化疗方案。而 ALK 阳性晚期非小细胞肺癌经确诊后,一线首选克唑替尼治疗,PROFILE 1014 研究证实,一线患者 PFS 可达

10.9 个月,总体缓解率可达 74%,并且患者的疾病相关症状(如咳嗽、胸痛和呼吸困难等)和整体生活质量得到显著的改善<sup>[8]</sup>。值得注意的是,脑转移及 65 岁以上老年人群亚组患者也能从克唑替尼的治疗中 PFS 获益<sup>[8]</sup>。因此,专家委员会推荐:对于 ALK 阳性晚期非小细胞肺癌患者,应一线使用克唑替尼治疗<sup>(1A)</sup>。克唑替尼治疗最常见的不良反应( $\geq 25\%$ )为视觉异常、恶心、呕吐、腹泻、便秘、水肿、转氨酶升高及疲乏。但通常这些反应的级别较低,主要为 1 或 2 级。在 PROFILE 1014 研究中 3/4 级不良反应中发生率相对较高的为转氨酶升高(14%)及中性粒细胞减少(11%)<sup>[8]</sup>,在临床应用过程中,要注意患者肝功能及全血细胞计数的监测。较少发生的严重不良反应为间质性肺病,在 PROFILE 1014 研究中发生率为 1%<sup>[8]</sup>,治疗过程中要注意监测患者间质性肺病的症状和指征,一旦发生间质性肺病需永久停药。克唑替尼推荐起始治疗剂量为 250 mg,每日 2 次,口服。在治疗的过程中,如果患者出现 3/4 级不良事件,需一次或多次减少剂量。第一次减少剂量:200 mg,每日 2 次,口服;第二次减少剂量:250 mg,每日 1 次,口服;如果每日 1 次口服 250 mg 仍不能耐受,则永久停服。

2. 二线及后续治疗:晚期非小细胞肺癌二线治疗可选择的化疗药物包括多西他赛和培美曲塞<sup>(2A)</sup>。而 ALK 阳性非小细胞肺癌患者的二线治疗,PROFILE 1007 研究证实<sup>[9]</sup>,与标准二线化疗(培美曲塞或多西他赛单药)相比,克唑替尼治疗组患者 PFS 显著延长(7.7 个月比 3.0 个月),肿瘤缓解率明显提高(65% 比 20%),并且患者的整体生活质量和疾病相关症状(如疲乏、咳嗽、胸痛及呼吸困难等)改善更显著。因此,专家委员会推荐:如果一线治疗时没有应用 ALK-TKI 治疗,推荐克唑替尼用于 ALK 阳性晚期非小细胞肺癌患者的二线或后续治疗<sup>(2A)</sup>。

3. ALK-TKI 治疗疾病进展后的治疗:ALK 阳性非小细胞肺癌患者接受克唑替尼治疗后,如同其他 TKI 治疗一样,不可避免在 1~2 年内相继发生 RECIST(version 1.1) 定义的疾病进展<sup>[39]</sup>。在克唑替尼治疗出现疾病进展后,根据患者的症状、转移部位、单发/多发病灶决定患者是否继续接受克唑替尼治疗<sup>[40]</sup>。如患者进展无症状,推荐继续使用克唑替尼治疗;如患者出现有症状的单发脑转移或系统性转移灶,考虑局部治疗结合继续克唑替尼治疗;如患者出现有症状的多发脑转移,考虑全脑放疗结合继

续克唑替尼治疗;如患者出现有症状的系统性多发转移灶,考虑二代 ALK-TKI 治疗(克唑替尼治疗进展后二代 ALK-TKI 治疗的临床研究正在进行中,二代 ALK-TKI 在中国尚未获批),或腺癌的其他一线治疗(根据患者功能状态评分进行双药化疗)<sup>(2A类)</sup>。新近回顾性研究显示,克唑替尼后续 Ceritinib 治疗,患者中位 PFS 达 17.4 个月,中位总生存期达 49.4 个月<sup>[41]</sup>。目前关于 ALK-TKI 治疗进展后治疗的高级别循证医学证据较少,但一系列研究正在进行中,如克唑替尼治疗进展后二代 ALK-TKI 治疗的研究,以及克唑替尼治疗进展后化疗(培美曲塞单药)联合不联合克唑替尼的 SWOG1300 研究(NCT02134912)等,期待这些研究结果能提供更多循证医学证据。因此,专家委员会推荐:(1) ALK 阳性患者接受克唑替尼治疗后出现耐药进展,考虑到二代药物在我国尚未上市,鼓励患者参加临床试验,以期获得新药进行治疗。(2) 经 ALK-TKI 治疗后的患者出现寡转移或缓慢进展后,如果一般情况良好,且无显著临床症状恶化,可继续口服克唑替尼,并针对局部病灶进行治疗,如无神经系统症状的脑部转移等。若患者出现多部位的全面进展,且临床症状出现恶化后,可换用两药含铂方案进行化疗。再次出现进展后,可根据患者功能评分,酌情选用之前未选用的化疗药物进行治疗<sup>(2A类)</sup>。

## 六、小结

基于 EGFR 突变和 ALK 融合变异等分子标志物的肺癌分子靶向个体化治疗模式已经在临床建立和应用。吉非替尼、厄洛替尼和克唑替尼等 EGFR 或 ALK 抑制剂已经应用于临床,在我国正在向更多的肺癌患者推广应用。非小细胞肺癌的分子靶向治疗将越来越依赖于分子靶点变异的分子诊断。临床实践中分子检测的标准化和检测流程的建立对于提高临床实践能力起关键作用。ALK 融合变异作为晚期肺癌中第二个明确应用的分子分型,其诊断方法和流程仍需进一步结合临床数据进行优化。我们根据目前 ALK 融合基因检测各种方法的优缺点、临床标本的特点和实验室的条件,提出合理的检测流程,推荐应用方法和注意事项。希望各诊疗中心能客观准确地筛查 ALK 融合变异患者,合理开展基于明确分子诊断的靶向治疗,真正造福广大肺癌患者。

本次“中国 ALK 阳性非小细胞肺癌诊断治疗的指南”是在 CSCO 肿瘤生物标志物专家委员会的倡导下,从临床诊断和治疗的角度出发,结合我国肺癌患者众多(约占全球 1/3)的现状,综合最新的循证

医学研究数据和 CFDA 批准的药物和伴随诊断方法,供临床实践参考。本指南将根据实际情况定期更新,期望能为未来进一步优化 ALK 阳性肺癌患者的诊断和治疗提供指导。

**注释:**CSCO 肿瘤生物标志物专家委员会证据或共识水平的定义:

1 类:表示该推荐内容基于高水平的证据,并且在本指南制定专家成员中具有广泛的共识,建议值得信赖。

2A 类:表示该项推荐基于临床经验在内的较低水平证据,本指南制定专家成员达成共识,因此该推荐是可以信赖的。

2B 类:表示该项推荐内容基于临床经验在内的较低水平证据,本指南制定专家成员对于该建议的适宜性意见不一致,但无较大分歧。

3 类:表示 CSCO 肿瘤生物标志物专家委员会专家存在较大分歧。

本文中所推荐的共识证据级别除了少数做特别说明之外,均在 2A 类以上。

## 参 考 文 献

- [1] WHO. Globocan 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012 [EB/OL]. [2015-07-06]. <http://globocan.iarc.fr/Pages/online.aspx>
- [2] Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer [J]. Nature, 2007, 448(7153):561-566.
- [3] Wong DW, Leung EL, So KK, et al. The EML4-ALK fusion gene is involved in various histologic types of lung cancers from nonsmokers with wild-type EGFR and KRAS[J]. Cancer, 2009, 115(8):1723-1733.
- [4] Shackelford RE, Vora M, Mayhall K, et al. ALK-rearrangements and testing methods in non-small cell lung cancer: a review[J]. Genes Cancer, 2014, 5(1-2):1-14.
- [5] Vidal J, Clavé S, de Muga S, et al. Assessment of ALK status by FISH on 1000 Spanish non-small cell lung cancer patients[J]. J Thorac Oncol, 2014, 9(12):1816-1820.
- [6] Pan Y, Zhang Y, Li Y, et al. ALK, ROS1 and RET fusions in 1139 lung adenocarcinomas: a comprehensive study of common and fusion pattern-specific clinicopathologic, histologic and cytologic features[J]. Lung Cancer, 2014, 84(2):121-126.
- [7] Shaw AT, Kim DW, Mehra R, et al. Ceritinib in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer[J]. N Engl J Med, 2014, 370(13):1189-1197.
- [8] Solomon BJ, Mok T, Kim DW, et al. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer[J]. N Engl J Med, 2014, 371(23):2167-2177.
- [9] Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer[J]. N Engl J Med, 2013, 368(25):2385-2394.
- [10] Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer[J]. N Engl J Med, 2014, 371(21):1963-1971.
- [11] 全国肿瘤防治办公室/全国肿瘤登记中心/卫生部疾病预防控制局. 2009 全国肿瘤登记年报[M]. 北京:军事医学科学出版社,2010.
- [12] 张绪超,陆舜,张力,等. 中国间变性淋巴瘤激酶(ALK)阳性非小细胞肺癌诊断专家共识(2013 版)[J]. 中华病理学杂志,2013,42(6):402-406.

- [13] Rikova K, Guo A, Zeng Q, et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer [J]. Cell, 2007, 131(6):1190-1203.
- [14] Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK[J]. J Clin Oncol, 2009, 27(26):4247-4253.
- [15] Hong S, Fang W, Hu Z, et al. A large-scale cross-sectional study of ALK rearrangements and EGFR mutations in non-small-cell lung cancer in Chinese Han population[J]. Sci Rep, 2014, 4:7268.
- [16] Cabillic F, Gros A, Dugay F, et al. Parallel FISH and immunohistochemical studies of ALK status in 3244 non-small-cell lung cancers reveal major discordances [J]. J Thorac Oncol, 2014, 9(3):295-306.
- [17] Sun JM, Choi YL, Won JK, et al. A dramatic response to crizotinib in a non-small-cell lung cancer patient with IHC-positive and FISH-negative ALK[J]. J Thorac Oncol, 2012, 7(12):e36-e38.
- [18] Minca EC, Portier BP, Wang Z, et al. ALK status testing in non-small cell lung carcinoma: correlation between ultrasensitive IHC and FISH[J]. J Mol Diagn, 2013, 15(3):341-346.
- [19] Wynes MW, Sholl LM, Dietel M, et al. An international interpretation study using the ALK IHC antibody D5F3 and a sensitive detection kit demonstrates high concordance between ALK IHC and ALK FISH and between evaluators[J]. J Thorac Oncol, 2014, 9(5):631-638.
- [20] Mino-Kenudson M, Chiriac LR, Law K, et al. A novel, highly sensitive antibody allows for the routine detection of ALK-rearranged lung adenocarcinomas by standard immunohistochemistry[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(5):1561-1571.
- [21] Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer [J]. N Engl J Med, 2010, 363(18):1693-1703.
- [22] Iwahara T, Fujimoto J, Wen D, et al. Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system[J]. Oncogene, 1997, 14(4):439-449.
- [23] 《常规免疫组织化学初筛 ALK 阳性非小细胞肺癌专家共识》专家组. 常规免疫组织化学初筛 ALK 阳性非小细胞肺癌专家共识[J]. 中华病理学杂志, 2015, 44(7):476-479.
- [24] Kim H, Yoo SB, Choe JY, et al. Detection of ALK gene rearrangement in non-small cell lung cancer: a comparison of fluorescence in situ hybridization and chromogenic in situ hybridization with correlation of ALK protein expression [J]. J Thorac Oncol, 2011, 6(8):1359-1366.
- [25] Yi ES, Boland JM, Maleszewski JJ, et al. Correlation of IHC and FISH for ALK gene rearrangement in non-small cell lung carcinoma: IHC score algorithm for FISH [J]. J Thorac Oncol, 2011, 6(3):459-465.
- [26] Blackhall FH, Peters S, Bubendorf L, et al. Prevalence and clinical outcomes for patients with ALK-positive resected stage I to III adenocarcinoma: results from the European Thoracic Oncology Platform Lungscape Project[J]. J Clin Oncol, 2014, 32(25):2780-2787.
- [27] Han XH, Zhang NN, Ma L, et al. Immunohistochemistry reliably detects ALK rearrangements in patients with advanced non-small-cell lung cancer[J]. Virchows Arch, 2013, 463(4):583-591.
- [28] Park HS, Lee JK, Kim DW, et al. Immunohistochemical screening for anaplastic lymphoma kinase (ALK) rearrangement in advanced non-small cell lung cancer patients[J]. Lung Cancer, 2012, 77(2):288-292.
- [29] Zhou J, Zhao J, Sun K, et al. Accurate and economical detection of ALK positive lung adenocarcinoma with semiquantitative immunohistochemical screening[J]. PLoS One, 2014, 9(3):e92828.
- [30] Takamochi K, Takeuchi K, Hayashi T, et al. A rational diagnostic algorithm for the identification of ALK rearrangement in lung cancer: a comprehensive study of surgically treated Japanese patients[J]. PLoS One, 2013, 8(8):e69794.
- [31] Paik JH, Choi CM, Kim H, et al. Clinicopathologic implication of ALK rearrangement in surgically resected lung cancer: a proposal of diagnostic algorithm for ALK-rearranged adenocarcinoma [J]. Lung Cancer, 2012, 76(3):403-409.
- [32] Paik JH, Choe G, Kim H, et al. Screening of anaplastic lymphoma kinase rearrangement by immunohistochemistry in non-small cell lung cancer: correlation with fluorescence in situ hybridization[J]. J Thorac Oncol, 2011, 6(3):466-472.
- [33] Selinger CI, Rogers TM, Russell PA, et al. Testing for ALK rearrangement in lung adenocarcinoma: a multicenter comparison of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization[J]. Mod Pathol, 2013, 26(12):1545-1553.
- [34] Tuononen K, Sarhadi VK, Wirtanen A, et al. Targeted resequencing reveals ALK fusions in non-small cell lung carcinomas detected by FISH, immunohistochemistry, and real-time RT-PCR: a comparison of four methods[J]. Biomed Res Int, 2013, 2013:757490.
- [35] Ying J, Guo L, Qiu T, et al. Diagnostic value of a novel fully automated immunochemistry assay for detection of ALK rearrangement in primary lung adenocarcinoma [J]. Ann Oncol, 2013, 24(10):2589-2593.
- [36] Zhang X, Zhang S, Yang X, et al. Fusion of EML4 and ALK is associated with development of lung adenocarcinomas lacking EGFR and KRAS mutations and is correlated with ALK expression [J]. Mol Cancer, 2010, 9:188.
- [37] Ali SM, He J, Peled N, et al. Identifying ALK rearrangements that are not detected by FISH with targeted next-generation sequencing of lung carcinoma[J]. J Clin Oncol, 2014, 32:5s.
- [38] Zhou J, Yao H, Zhao J, et al. Cell block samples from malignant pleural effusion might be valid alternative samples for anaplastic lymphomakinase detection in patients with advanced non-small-cell lung cancer[J]. Histopathology, 2015, 66(7):949-954.
- [39] Camidge DR, Pao W, Sequist LV. Acquired resistance to TKIs in solid tumours: learning from lung cancer [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2014, 11(8):473-481.
- [40] NCCN. Non-small cell lung cancer[EB/OL]. Version 4. 2015, 31.
- [41] Gainor JF, Tan DS, De Pas T, et al. Progression-free and overall survival in ALK-positive NSCLC patients treated with sequential crizotinib and ceritinib[J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(12):2745-2752.

(收稿日期:2015-08-25)

(本文编辑:常秀青)

## ·共识与指南·

# 中国非小细胞肺癌 ALK 检测临床实践 专家共识

中国非小细胞肺癌 ALK 检测模式真实世界多中心研究专家组; 中华医学会病理学分会  
分子病理学组

执笔者: 张静(国家癌症中心/国家肿瘤临床医学研究中心/中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院病理科 100021); 王志杰(国家癌症中心/国家肿瘤临床医学研究中心/中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院肿瘤内科 100021)

通信作者: 应建明, 国家癌症中心/国家肿瘤临床医学研究中心/中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院病理科 100021, Email:jmying@cicams.ac.cn; 王洁, 国家癌症中心/国家肿瘤临床医学研究中心/中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院肿瘤内科 100021, Email:zlhuxi@163.com; 梁智勇, 中国医学科学院北京协和医学院北京协和医院病理科 100730, Email:liangzhiyong1220@yahoo.com

基金项目: 北京市卫生与健康科技成果与适宜技术推广项目(2018-TG-58); 中国癌症基金会项目(中国非小细胞肺癌 ALK 检测模式真实世界多中心研究); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2017-I2M-2-003)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2019.12.001

## **Expert consensus on clinical practice of ALK fusion detection in non-small cell lung cancer in China**

*Experts from the RATICAL study (ALK testing in Chinese advanced non-small cell lung cancer patients: a national-wide multicenter prospective real world data study); Molecular Pathology Committee of Chinese Society of Pathology*

*Corresponding authors: Ying Jianming, Email: jmying@cicams.ac.cn; Wang Jie, Email: zlhuxi@163.com; Liang Zhiyong, Email: liangzhiyong1220@yahoo.com*

**【摘要】** 伴有间变性淋巴瘤激酶(ALK)基因融合的肺癌是非小细胞肺癌一个重要的临床亚型。ALK 抑制剂对伴有 ALK 基因融合的晚期非小细胞肺癌患者显示出显著的临床获益。选择准确、快速、恰当的 ALK 检测方法,筛选出适用 ALK 抑制剂的目标人群具有重要临床意义。近年来 ALK 抑制剂的研发和临床应用取得了极大的进展,获得性耐药机制逐渐阐明,同时,新的 ALK 检测伴随诊断平台进入临床应用。尽管大量的比对研究已经证实各检测平台间存在较高的符合率,但检测实践过程中,新的问题不断出现。针对不同检测人群、检测标本,选择恰当的检测方法,并制定、优化及遵守规范化检测流程才能获得准确的检测结果,使患者得到最大程度的获益。随着临床实践数据的不断积累、更多的关于 ALK 检测质控以及多中心研究的开展,为我们提供了大量的资料,并取得了共识。参与本专家共识讨论的专家均具有丰富的理论和临床实践检测经验,保证了该共识的实践指导价值。

间变性淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase, ALK)基因融合在我国非小细胞肺癌中的发生率约 5.6%<sup>[1]</sup>, 其中腺癌的发生率为 6.6%~9.6%<sup>[2-3]</sup>。近年来 ALK 抑制剂的研发和临床应用取得了较大的突破, 包括一代[如克唑替尼(Crizotinib)]、二代[如阿来替尼(Alectinib)、塞瑞替尼(Ceritinib)、Brigatinib]乃至三代 ALK 抑制剂

(Lorlatinib), 可明显提高 ALK 阳性晚期非小细胞肺癌患者的客观缓解率并延长无进展生存时间(progression-free survival, PFS)。选择准确、快速、恰当的 ALK 检测方法,筛选出适用 ALK 抑制剂的目标人群具有重要临床意义。另外,随着越来越多的 ALK 基因罕见融合亚型的发现,以及 ALK 抑制剂获得性耐药机制的阐明,临床对 ALK 基因检测

的内涵提出了更多的需求。

ALK基因易位导致ALK融合基因的表达(下文中提及的ALK阳性是指ALK基因易位或ALK融合基因表达),这一分子生物学基础决定了检测ALK基因融合可以在多个分子水平上进行,包括荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization,FISH)在DNA水平上检测ALK基因易位;即时荧光定量聚合酶链反应(real time polymerase chain reaction,RT-PCR)检测ALK融合mRNA;免疫组织化学(immunohistochemistry,IHC)检测ALK融合蛋白表达,以及二代测序(next-generation sequencing,NGS)技术检测DNA水平上的易位序列或mRNA水平上的融合序列。我国是目前全球ALK检测伴随诊断平台应用最多的国家。大量的比对研究已经证实了各检测平台间存在较高的符合率,但检测实践过程中仍存在较多问题,如各检测平台结果不一致病例的处理,ALK检测结果判读中不典型病例的解决路径推荐等。针对不同检测人群、检测标本,选择恰当的检测方法,并制定、优化及遵守规范化检测流程才能获得准确的检测结果,使患者得到最大程度的获益,中国病理及临床专家制定了ALK检测专家共识(2013年)<sup>[4]</sup>,对规范化ALK基因融合检测起到了重要作用。但临床实践数据的不断积累、检测问题的不断发现、新检测技术平台的应用,以及更多的关于ALK检测质控以及多中心研究的开展,促进了本共识的达成并提供了大量的资料。参与本共识的临床、外科病理、分子病理专家均具有丰富的理论和临床实践检测经验,希望本共识能为我国的ALK检测提供切实的实践指导。

### 一、ALK检测的临床意义

1.伴有ALK基因融合的不可手术晚期非小细胞肺癌患者接受ALK抑制剂治疗,客观缓解率和PFS显著优于含铂化疗,并改善患者的生活质量。反之,ALK基因融合阴性患者并不能从ALK抑制剂治疗中获益。ALK抑制剂针对ALK融合基因及蛋白表达研发,多个中心随机对照Ⅲ期临床研究证实其客观缓解率高,患者中位PFS得到明显延长<sup>[5-6]</sup>,这使得ALK成为非小细胞肺癌中除了表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor,EGFR)外的第2个推荐检测位点,也奠定了ALK抑制剂作为一线药物治疗ALK阳性非小细胞肺癌的基础地位。对于初治ALK阳性晚期非小细胞肺癌患者,ALK抑制剂疗效显著优于传统化疗方案,同时ALK抑制剂相关不良反应较轻微,主要为腹泻、

恶心、呕吐等1~2级消化道不良反应以及视觉障碍等,显著改善了患者的生活质量。

2.伴有ALK基因融合的非小细胞肺癌手术患者与预后差相关,无复发生存时间(recurrence-free survival,RFS)较短。研究表明,手术切除的非小细胞肺癌患者,ALK阳性患者比EGFR突变患者的RFS更短,提示ALK阳性患者术后应采取更积极的随诊计划或进行辅助治疗<sup>[7]</sup>。

### 二、ALK检测的适用人群

1.所有经病理学诊断为肺浸润性腺癌(包括含腺癌成分)患者均需进行ALK检测。在我国,未经选择的非小细胞肺癌中ALK阳性病例约占5.6%<sup>[1]</sup>,其中肺腺癌阳性率约6.6%~9.6%<sup>[2-3]</sup>,晚期患者阳性率高于早期患者。对于晚期非小细胞肺癌患者,ALK基因检测能够有效筛选ALK抑制剂获益人群。对于手术切除患者,ALK阳性非小细胞肺癌患者的预后较差。因此,本共识强烈推荐经病理学诊断为肺浸润性腺癌(包括含腺癌成分)的患者,不管其分期,均需进行ALK基因检测。

2.经活检组织病理学诊断为非腺癌的晚期非小细胞肺癌患者推荐进行ALK检测。ALK基因融合可在肺鳞状细胞癌中检出<sup>[8]</sup>,有多个个案报道在鳞状细胞癌患者中检测出棘皮动物微管相关类蛋白4(echinoderm microtubule-associated protein-like 4,EML4)-ALK基因融合,且可在接受ALK抑制剂治疗中获益<sup>[9]</sup>;同时针对我国1134例晚期(Ⅲb~Ⅳ期)非小细胞肺癌研究数据显示,在鳞状细胞癌中ALK基因融合发生率可达3.7%<sup>[10]</sup>。除此之外,部分由活检诊断为鳞状细胞癌的患者,经术后病理证实存在肺腺癌成分<sup>[11]</sup>,因此我们推荐经活检组织病理学诊断为非腺癌的晚期非小细胞肺癌患者可以进行ALK检测,以期筛选出ALK阳性患者获得更佳治疗方案的选择。

### 三、ALK靶向药物

1.一代ALK抑制剂克唑替尼和二代ALK抑制剂阿来替尼均可用于晚期ALK阳性非小细胞肺癌患者的一线治疗,阿来替尼优先。目前,国家药品监督管理局(National Medical Products Administration,NMPA)批准上市的ALK抑制剂包括克唑替尼、阿来替尼和塞瑞替尼。PROFILE 1014研究证实克唑替尼作为晚期ALK阳性非小细胞肺癌患者的一线治疗明显优于标准含铂化疗,因此推荐克唑替尼作为一线治疗方案<sup>[5]</sup>。基于ALEX、J-ALEX和ALESIA研究的结果,阿来替尼作

为晚期 ALK 阳性非小细胞肺癌患者的一线治疗优于克唑替尼,因此作为一线的优先推荐治疗方案<sup>[12-13]</sup>。

2. 二代 ALK 抑制剂阿来替尼和塞瑞替尼均用于晚期 ALK 阳性非小细胞肺癌患者经克唑替尼治疗耐药后的二线治疗。ASCEND 系列研究证实了塞瑞替尼在未经治疗或经克唑替尼治疗失败的 ALK 阳性非小细胞肺癌患者中的疗效均优于含铂化疗<sup>[14]</sup>,但目前 NMPA 尚未批准塞瑞替尼的一线适应证,仅批准塞瑞替尼用于克唑替尼耐药后的二线治疗。其他的二代 ALK 抑制剂如 Brigatinib 等以及三代 ALK 抑制剂 Lorlatinib 等,亦显示出作为一线治疗,或经一代/二代 ALK 抑制剂耐药后的后线治疗中具有应用前景的治疗效果。

#### 四、ALK 检测基因异常类型

初治患者进行 ALK 基因异常检测时,必须检测是否存在基因易位/融合/表达,可进行 ALK 融合变体亚型检测及易位丰度检测。目前至少发现了 20 多种 EML4-ALK 融合变体亚型,其中,最常见的 EML4 的变体 1[v1: 外显子 13 与 ALK 的外显子 20 融合(E13;A20)] 和变体 3v3a/b[ 外显子 6a/b 与 ALK 的外显子 20 融合(E6a/b;A20)],这两种变体类型约占总体的 60%<sup>[1]</sup>。所有的变体都保留了 ALK 的整个酪氨酸激酶结构域和 EML4 的 N 末端卷曲螺旋区域,这对于 ALK 的二聚化和组成型激活是必不可少的。ALK 除最常见与 EML4 融合外,也可以与 TFG、KLC1、SOCS5、H1P1、TPR、BIRC6 等基因融合<sup>[15]</sup>。研究结果显示,不同的变异亚型可能与抗 ALK 治疗的 PFS 时间相关,但限于研究人群的局限性,以及不同药物的作用机制存在差异,不同研究的结果存在差异<sup>[16-17]</sup>,因此,这些复杂的 ALK 变异类型及其临床意义尚待我们进一步研究。而突变丰度与疗效的关系研究也处于探索阶段。ALK 激酶区的突变极少见于初治 ALK 易位患者,主要出现于 ALK 抑制剂治疗耐药后患者。目前临床实践主要依据患者有无 ALK 基因易位/融合/表达来决定是否使用 ALK 抑制剂。因此目前我们强烈推荐初治患者进行 ALK 基因异常检测时,必须检测是否存在基因易位/融合/表达,可进行 ALK 融合变体亚型检测及易位丰度检测。针对 ALK 抑制剂耐药患者,需要考虑 ALK 获得性耐药突变的相关检测。

#### 五、ALK 检测方法及判读标准

##### 1. Ventana-D5F3 IHC、FISH、RT-PCR、NGS 均可

用于 ALK 基因融合检测,判读标准参照试剂盒说明书。

2. 检测结果报告格式应规范化。目前,我国 NMPA 批准了 4 个技术平台的 ALK 基因检测伴随诊断试剂,包括 ALK Ventana-D5F3 IHC、FISH、RT-PCR、NGS 检测平台。研究结果显示,这 4 个技术平台检测试剂均具有较高的灵敏度及特异度。专家组强烈推荐这 4 种方法均可用于 ALK 基因融合检测,依据临床具体情况及实验室条件进行检测方法的选择,并通过必要的性能验证或性能确认,确立检测分析前、分析中和分析后全流程的标准操作程序。判读标准参考试剂盒说明书。各检测平台结果报告应设置规范化的格式。

3. 非 Ventana D5F3 抗体 IHC 检测仅用于初筛。由于快速、经济、操作简单,IHC 检测方法在各病理实验室广泛开展。目前有 4 种 ALK 抗体克隆,包括 ALK1、5A4、D5F3 以及 1A4。由于 ALK1 灵敏度较低(67%),而 1A4 的特异度较低(70%),均不推荐应用于临床;ALK 5A4 及 D5F3 均具有较高的灵敏度及特异度(95%~100%)<sup>[18]</sup>,但检测实践过程中 ALK 5A4 IHC 灵敏度及特异度依据阳性强度或 H 评分界定值不同而不同,因此专家共识建议非 Ventana D5F3 抗体 IHC 检测仅用于 ALK 检测结果初筛。为规范化 ALK IHC 初筛检测,我国病理专家编写了《常规免疫组织化学初筛 ALK 阳性非小细胞肺癌专家共识》<sup>[19]</sup>。

4. 对于非腺癌患者,在进行 ALK Ventana-D5F3 IHC 结果判读时,应谨慎,必要时加备注。ALK Ventana-D5F3 IHC 检测试剂及判读标准是针对肺腺癌样本设计的。在临床实践中,有些低分化癌、伴神经内分泌分化、鳞状细胞癌等会有异质性或者棋盘状的假阳性着色,属于真实信号,但是 ALK 融合蛋白阴性(尤其注意活检标本),因此对于非腺癌患者,在进行 ALK Ventana-D5F3 IHC 结果判读时需要格外谨慎,必要时可加备注进一步说明或建议使用其他技术平台进行验证。

5. 在进行 ALK Ventana-D5F3 IHC 检测结果判读时,对于检测结果不能确定的患者,应建议使用其他技术平台进行复检。ALK Ventana-D5F3 IHC 检测方法是目前最快速、经济的方法,且二元结果判读标准简单。然而,在临床实践中要警惕 ALK Ventana IHC 结果判读中存在的一些陷阱,避免假阳性或假阴性。首先,富含胞内黏液的实体型肺腺癌中易出现 ALK 融合基因,一方面由于胞内黏液

非特异性吸附,易被误判为假阳性的可能,另一方面,由于黏液挤压细胞胞质,真实阳性信号易被忽视,而被错判为阴性,因此我们在判读富含黏液分泌的病例时,要格外留意阳性信号的部位及真假;其次,假阳性着色可出现于:肺泡内巨噬细胞、神经纤维及神经节细胞、呼吸道上皮细胞、坏死组织碎片及细胞外黏液吸附,在判读时要加以区分。在全国多中心研究质控数据分析中也发现了很多染色不典型、结果判读不确定的病例,针对此类情况,需再次强调标本规范化处理、室内质控、室间质评的重要性。判读时要注意以下几个要点,尤其是信号较浅、信号分布不均的情况:(1)整体染色情况(间质背景是否干净);(2)关注亚器官定位,信号位于胞质或者胞质和胞膜(细胞核不应着色);(3)染色相对均匀(ALK异质性少见),胞质内的着色也相对均匀(信号点大小较为均匀);(4)注意腔缘效应以及黏液、坏死等导致的非特异性着色。总之,在进行Ventana-D5F3 IHC检测结果判读时,对于结果不能确定的患者,专家共识建议使用其他技术平台进行复检<sup>[3]</sup>。

6. 在进行FISH结果判读时,对于分离信号肿瘤细胞比例在临界值附近的病例,判读应谨慎,必要时加备注,并建议使用其他技术平台进行复检。

7. 在进行FISH结果判读时,对于存在不典型信号时,如单绿信号(5'端荧光信号)或伴扩增等,应定义为不典型病例,并建议使用其他技术平台进行复检。FISH检测ALK基因易位是经典的检测方法。但由于EML4-ALK易位是倒置易位,有些病例荧光分离信号距离较近,且断裂点附近不稳定,会产生染色体崩塌导致距离更近,加上立体空间位置,可造成假阴性判读结果。另外,在试剂盒判读标准中,ALK单绿信号(5'端荧光信号)被判为阴性,但有研究显示,部分此类病例经其他技术平台证实存在ALK基因融合表达,且显示出对ALK抑制剂治疗有效<sup>[20]</sup>。故本专家共识推荐,对于FISH信号不典型病例,应推荐其他技术平台进行复检。

8. 在进行RT-PCR结果判读时,对于Ct值在阈值范围附近的病例,判读应谨慎,必要时加备注,并建议使用其他技术平台进行复检。基于RT-PCR检测ALK融合基因表达方法的灵敏度和特异度均较高,但因为RT-PCR只能检测已知ALK融合基因类型,所以存在假阴性可能。同时,因涉及基于mRNA的PCR扩增,其对于检测环境和标本质量都有比较高的要求,因此应强化内外部质控,避免污

染。对于Ct值在阈值范围附近的患者,在进行结果判读时需要谨慎对待,需结合标本质量、肿瘤细胞含量、质控情况等综合分析。必要时加备注,并建议使用其他技术平台进行复检。

9. 在进行NGS检测ALK结果判读时,应充分掌握NGS检测平台及试剂的特点和局限性,结合标本情况、检测质控及测序数据等进行综合判读。对于质控不合格或结果不典型病例,报告时应加备注,并建议使用其他技术平台进行复检。NGS在基因检测中的地位越来越高,除了点突变,也可以检测基因易位,同时可以和其他基因如EGFR、K-RAS、CMET等几个乃至几百个基因一起检测。根据建库平台不同,其检测的基因分子类型不同。一般情况下,ALK基因融合通过捕获平台在DNA水平或扩增子平台在RNA水平上进行检测。基于捕获平台检测结果的灵敏度和特异度均很高,而且能够检测到包括已知和未知位点在内的所有ALK易位,但是其准确性可能会受捕获探针的覆盖度、标本DNA质量,以及生物信息学分析等关键因素影响。另外,极少数情况下,在DNA水平上检测到的基因易位可能并不会引起融合蛋白的表达。在RNA水平上采用扩增子的测序方式具有很高的检测灵敏度和特异度,而且极少的RNA投入量就能够在转录水平检测到ALK融合基因表达。但是,其检测范围一般仅局限于特定的常见位点,罕见融合可能会漏检。另外,与RT-PCR相似,其对于检测环境和标本质量都有比较高的要求。鉴于这两种常用的NGS方法均存在一些不足,近年来出现了使用捕获平台同时在DNA和RNA水平上进行测序的方法,可以在一定程度上提高ALK融合检测的准确性和灵敏度,但是,该方法成本较高,RNA的投入量也比扩增子平台更多。NGS检测流程复杂,影响因素繁多。在进行ALK结果判读时,应充分掌握NGS检测平台及试剂的特点和局限性,并结合标本情况、检测质控及测序数据等进行综合判读。

#### 六、ALK检测的标本类型

检测标本优先使用肿瘤组织标本。肿瘤组织标本不满足要求时,推荐使用细胞学标本。对于少数客观条件上不能获得组织或细胞学标本的晚期肺癌患者,可尝试血液/脑脊液检测。

多种样本均可用于ALK基因融合检测。考虑到检测平台对肿瘤细胞比例及肿瘤细胞量的需求,我们首先推荐选择手术切除或活检获取的石蜡包

埋的肿瘤组织标本进行 ALK 检测；如果手术样本保存时间过长(3 年以上)、未经过规范化前处理的标本可影响检测结果。晚期肺癌患者无法获取肿瘤组织标本时，细胞学样本包括细胞学穿刺标本或胸水细胞块等经病理学评估肿瘤细胞量满足需要的，推荐用于 ALK 检测。对于少数晚期非小细胞肺癌患者无法获得组织学或细胞学样本的，专家共识建议尝试使用血液/脑脊液进行 ALK 检测<sup>[21]</sup>。

### 七、ALK 检测策略优化

1. 优先应用 Ventana-D5F3 IHC 进行 ALK 检测。ALK Ventana-D5F3 IHC 快速、经济、操作简单，且具有较高的灵敏度(100%)及特异度(98%)<sup>[18]</sup>。同时，对于 ALK Ventana-D5F3 IHC 阳性但 FISH 阴性的患者，接受 ALK 抑制剂治疗疗效显著<sup>[15,20,22]</sup>。同时无论是石蜡包埋组织样本或细胞块样本，还是原发灶或转移灶样本中，ALK Ventana-D5F3 的 IHC 与 FISH 均表现出较高的一致性(94%~100%)<sup>[18]</sup>。除上述优点之外，由于石蜡包埋组织样本中蛋白质相对稳定，ALK Ventana-D5F3 IHC 可以检测较长时间的样本，且所需的组织样本量较小。因此专家组强烈推荐优先应用 Ventana-D5F3 IHC 进行 ALK 检测。同时，为了降低样本耗损、加快检测流程，专家组推荐可以将肺癌鉴别诊断免疫组织化学标志物与 ALK Ventana-D5F3 IHC 等同时进行检测。

2. 当和其他基因(如 EGFR、ROS1 等)一起检测时，可以联合 FISH 和 RT-PCR，或进行 RT-PCR 或 NGS 多基因检测。当标本量有限，如晚期非小细胞肺癌活检样本，且临床需要同时了解其他基因(如 EGFR、KRAS、ROS1 等)变异情况时，为了节约样本及检测时间，专家组推荐可以联合 FISH 和 RT-PCR 进行多基因同时检测，或进行 RT-PCR 或 NGS 检测，实现多个基因组合检测<sup>[23]</sup>。

3. 当怀疑检测标本有质量问题时，优先应用 FISH 检测。ALK 各检测平台各有优缺点，当我们遇到例如 ALK Ventana-D5F3 IHC 染色结果不均匀或者染色结果较浅等提示标本处理不当或者保存时间过长等质量问题时，专家组推荐优先应用 FISH 检测。FISH 检测依然是 ALK 基因易位检测的经典方法，其检测结果直观稳定，通过直接在显微镜下观察细胞核染色质形态及分离信号。

4. 临床病理特征可用于优先检测项目及方法的选择。ALK 阳性非小细胞肺癌患者具有一定的临床病理特征，ALK 基因融合更常见于年轻(中位年龄 55 岁)、非吸烟、富含胞内黏液的实体型肺腺

癌患者中，男女患者比例相近，且常与其他驱动基因突变如 EGFR、KRAS、ROS1 等互斥<sup>[2,24]</sup>。我们可以依据患者临床病理特征进行优先检测项目及检测方法的选择，例如具备上述临床病理特征的患者我们可以优先进行 ALK Ventana-D5F3 IHC 检测。

### 八、ALK 检测临床实践中存在的问题及解决策略

1. 所有病例包括本单位检测或外送检测的肿瘤组织或细胞学标本应由病理医师进行肿瘤细胞含量的评估。ALK IHC、FISH、RT-PCR、NGS 各检测平台对肿瘤细胞含量均有一定要求，如 FISH 检测判读标准要求至少判读 100 个肿瘤细胞，而以 PCR 为基础的 RT-PCR 技术和 NGS 技术，不仅需要一定的细胞量，同时需满足一定的肿瘤细胞比例(需对照产品的最低检测限等参数)。对于扩增子为基础的 NGS 技术一般需要 5~10 ng 核酸(大约 1 000 个肿瘤细胞)，以杂交捕获为基础的 NGS 技术需要 50~200 ng 核酸，只有满足要求才能保证检测结果的准确性，因此所有病例包括本单位检测或外送检测的肿瘤组织或细胞学标本均应先由病理医师进行肿瘤细胞比例及含量的评估。

2. 当存在 IHC、FISH、RT-PCR、NGS 检测结果不一致时，临床医师应与检测医师或相关人员沟通，确保检测结果均无异议时，才可进行 ALK 抑制剂的治疗。

3. 当需要外送独立实验室检测时，临床医师应对外送检测的独立实验室进行质量评价。本共识首先推荐在有能力的医院病理科实验室进行 ALK 基因融合检测。当需要外送独立实验室进行检测时，临床医师应对送检的独立实验室进行质量评估，以确保检测结果的准确性。

4. 临床医师与组织病理医师及分子检测人员应及时就 ALK 基因检测进行必要的沟通，包括 ALK 基因检测前、ALK 基因检测后及服用 ALK 抑制剂耐药后再次检测时。在临床实践过程中我们偶尔会遇到病理特征、临床特征及用药疗效与分子检测结果不一致的病例，此时须强调临床医师、组织病理医师及分子检测人员之间及时相互沟通，包括 ALK 基因检测前、ALK 基因检测后及服用 ALK 抑制剂耐药后再次检测时，在沟通过程中可以及时发现检测问题及特殊病例，为今后检测经验及实践数据的积累提供更多资料。

### 九、ALK 检测的室内外质控

#### 1. 检测实验室应在临床应用前建立及优化 ALK

检测规范化操作流程，并进行必要的性能验证。

2. 检测实验室应定期参加ALK检测室间质评活动，每年至少2次。

3. 检测实验室均应设置阴、阳性对照。

4. 检测实验室应制定专人负责ALK基因检测的质量控制，定期组织人员比对、培训及数据总结和分析。

在临床操作中，行之有效的质量控制系统对于病理诊断与评估的可信度来说至关重要。检测实验室应在临床应用前建立及优化ALK检测规范化操作流程，并进行必要的性能验证[包括但不限于阴、阳性符合率、最低检测限(如适用)等]。质量控制主要包括室内质控与室间质评。室内质控除了常规性的设立阳性及阴性对照，还包括不同检测方法比对、不同检测人员比对、新试剂性能验证及定期抽检等，以及定期进行人员培训及数据总结和分析。室内质控的主要目的是确保实验步骤的准确性和控制实验室每次检测结果的可靠性、有效性。检测实验室应定期参加ALK检测室间质评活动，每年至少2次。室间质评可以通过参加国内权威机构举办的室间质评活动来完成，也可通过与其他实验室(如已获资格认可的实验室、使用相同检测方法的实验室等)比对的方式确定检测结果的可信度。

#### 十、ALK抑制剂耐药机制检测

1. 对于ALK抑制剂耐药的患者，基因检测内容应由临床医师和分子病理检测医师共同讨论决定。

2. 耐药患者进行基因检测时，建议优先应用NGS检测，检测内容包括获得性突变和融合突变类型等。

ALK抑制剂耐药可分为原发性和继发性耐药，主要包括EML4-ALK融合亚型的影响、ALK激酶区突变、ALK基因扩增，以及基因旁路的激活、组织亚型或谱系改变等<sup>[25]</sup>。对于ALK抑制剂耐药的患者，专家组建议基因检测内容应由临床医师和分子病理检测医师共同讨论决定。如果患者在接受ALK抑制剂一线治疗后出现耐药，建议患者再取活检进行组织学诊断和基因检测，优先进行NGS基因检测，分析具体基因变异类型，包括获得性突变和融合突变类型等，用于指导选择最恰当的二线治疗药物。本共识要点总结见表1。

**免责声明** 本文中公布的临床实践专家共识内容由专家组成员依据现有医学证据及实践经验共同讨论形成，以帮助相关人员进行ALK基因检测或临床决策。其中的内容可能

不够全面或不够充分。医学知识发展迅速，在本共识产生到发表期间均可能出现新的证据，而这些可能并没有体现在本共识中。另外，因检测流程复杂、实验室条件差异以及患者之间存在个体差异等影响检测决策或结果，因此，本共识中内容的采用应结合检测条件、政策许可及专业人员的独立专业判断。对本共识内容的使用是自愿的。专家组成员明确否认对文中所提及的任何产品具有商业性目的。专家组对因使用本共识内容而造成的或与之相关的任何人身伤害或财产损失，或任何错误或遗漏不承担任何责任。

**《中国非小细胞肺癌ALK检测模式真实世界研究》项目组专家(按单位名称汉语拼音字母顺序排列)**: 北京医院病理科 国家老年医学中心(王征); 福建医科大学附属肿瘤医院病理科(陈刚); 复旦大学附属中山医院病理科(纪元); 复旦大学附属肿瘤医院病理科 复旦大学上海医学院肿瘤学系(李媛); 广东省人民医院 广东省医学科学院病理科(刘艳辉); 国家癌症中心/国家肿瘤临床医学研究中心/中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院病理科(应建明); 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院病理科(耿敬姝); 河北医科大学第四医院病理科(刘月平); 华南肿瘤学国家重点实验室肿瘤医学协同创新中心 中山大学肿瘤防治中心病理科(云径平); 华中科技大学同济医学院附属协和医院病理科(聂秀); 空军军医大学西京医院病理科(王哲); 陆军军医大学西南医院病理科(阎晓初); 南京医科大学第一附属医院病理科(张智弘); 南京医科大学附属肿瘤医院 江苏省肿瘤医院病理科(张静渊); 青岛大学附属医院病理科(李玉军); 山东省肿瘤防治研究院病理科(穆殿斌); 山西省肿瘤医院病理科(郗彦凤); 上海市胸科医院 上海交通大学附属胸科医院病理科(韩昱晨); 首都医科大学附属北京胸科医院 北京市结核病胸部肿瘤研究所病理科(车南颖); 四川大学华西医院病理科(蒋莉莉); 苏州大学附属第一医院病理科(郭凌川); 天津医科大学附属肿瘤医院病理科(孙蕾娜); 同济大学附属上海市肺科医院病理科(武春燕); 浙江大学医学院附属第一医院病理科(滕晓东); 郑州大学第一附属医院病理科(李文才); 郑州大学附属肿瘤医院临床病理中心(夏庆欣); 中国科学院大学附属肿瘤医院病理科(吴伟); 中国医科大学附属第一医院病理科(邱雪杉); 中国医学科学院北京协和医学院北京协和医院病理科(李霖); 中南大学湘雅二医院病理科(李代强); 中南大学湘雅医院病理科(周建华)

**肿瘤临床专家顾问组成员(按单位名称汉语拼音字母顺序排列)**: 广东省人民医院 广东省医学科学院肿瘤中心(周清); 国家癌症中心/国家肿瘤临床医学研究中心/中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院肿瘤内科(王洁); 吉林省肿瘤医院肿瘤内科(程颖); 解放军总医院第一医学中心肿瘤内科(焦顺昌); 同济大学附属上海市肺科医院肿瘤科(周彩存); 上海市胸科医院 上海交通大学附属胸科医院肿瘤内科(陆舜); 中山大学肿瘤医院肿瘤内科(张力)

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

表1 中国非小细胞肺癌ALK检测临床实践专家共识要点

序号	专家共识推荐要点	推荐级别
1.ALK检测的临床意义		
1.1	伴有ALK基因融合的不可手术晚期非小细胞肺癌患者接受ALK抑制剂治疗,客观缓解率和无进展生存时间显著优于含铂化疗,并改善患者的生活质量。反之,ALK基因融合阴性患者并不能从ALK抑制剂治疗中获益	强烈推荐
1.2	伴有ALK基因融合的非小细胞肺癌手术患者与预后差相关,无复发生存时间较短	推荐
2.ALK检测的适用人群		
2.1	所有经病理学诊断为肺浸润性腺癌(包括含腺癌成分)患者均需进行ALK基因融合检测	强烈推荐
2.2	经活检组织病理学证实为非腺癌的晚期非小细胞肺癌患者推荐进行ALK基因融合检测	推荐
3.ALK靶向药物		
3.1	二代ALK抑制剂阿来替尼(Alectinib)优先用于晚期ALK融合基因阳性非小细胞肺癌患者的一线治疗	强烈推荐
3.2	一代ALK抑制剂克唑替尼(Crizotinib)用于晚期ALK融合基因阳性非小细胞肺癌患者的一线治疗	强烈推荐
3.3	二代ALK抑制剂阿来替尼用于晚期ALK融合基因阳性非小细胞肺癌患者经克唑替尼治疗耐药后的二线治疗	强烈推荐
3.4	二代ALK抑制剂塞瑞替尼(Ceritinib)用于晚期ALK融合基因阳性非小细胞肺癌患者经克唑替尼耐药后的二线治疗	强烈推荐
4.ALK检测基因异常类型		
	初治患者进行ALK基因异常检测时,必须检测是否存在基因易位/融合/表达,可进行ALK融合变体亚型检测及易位丰度检测等	强烈推荐
5.ALK检测方法及判读标准		
5.1	Ventana-D5F3 IHC、FISH、RT-PCR、NGS均可用于ALK基因融合检测,判读标准参照国家相关部门批准的试剂盒说明书	强烈推荐
5.2	检测结果报告格式规范化	强烈推荐
5.3	非Ventana-D5F3抗体进行免疫组织化学检测仅用于初筛	专家共识意见
5.4	非腺癌标本进行Ventana-D5F3 IHC结果判读时应谨慎,必要时加备注	推荐
5.5	在进行Ventana-D5F3 IHC检测结果判读时,对于结果不能确定的患者,应建议使用其他技术平台进行复检	专家共识意见
5.6	在进行FISH结果判读时,对于分离信号肿瘤细胞比例在临界值附近的病例,判读应谨慎,必要时加备注,并建议使用其他技术平台进行复检	推荐
5.7	在进行FISH结果判读时,对于存在不典型信号时,如单绿信号(5'端荧光信号)或伴扩增等,应定义为不典型病例,并建议使用其他技术平台进行复检	推荐
5.8	在进行RT-PCR结果判读时,对于Ct值在阈值范围附近的病例,判读应谨慎,必要时加备注,并建议使用其他技术平台进行复检	推荐
5.9	在进行NGS检测ALK结果判读时,应充分掌握NGS检测平台及试剂的特点和局限性,结合标本情况、检测质控及测序数据等进行综合判读。对于质控不合格或结果不典型病例,报告时应加备注,并建议使用其他技术平台进行复检	推荐
6.ALK检测的标本类型		
6.1	检测标本优先使用肿瘤组织标本	强烈推荐
6.2	肿瘤组织标本不满足要求时,推荐使用细胞学标本	推荐
6.3	对于少数客观上不能获得组织或细胞学标本的晚期肺癌患者,可尝试血液/脑脊液检测	专家共识意见
7.ALK检测策略优化		
7.1	优先应用Ventana-D5F3 IHC进行ALK检测	强烈推荐
7.2	当和其他基因(如EGFR、ROS1等)一起检测时,可以联合FISH和RT-PCR,或进行RT-PCR或NGS多基因检测	推荐
7.3	当怀疑检测标本有质量问题时,优先应用FISH检测	推荐
7.4	临床病理特征可用于优先检测项目及方法的选择	推荐
8.ALK检测临床实践中存在的问题及解决策略		
8.1	所有病例包括本单位检测或外送检测的肿瘤组织或细胞学标本应由病理医师进行肿瘤细胞含量的评估	强烈推荐
8.2	当存在IHC、FISH、RT-PCR、NGS检测结果不一致时,临床医师应与检测医师或相关人员沟通,确保检测结果均无异议时,可进行ALK抑制剂的治疗	推荐
8.3	临床医师应对外送检测的独立实验室进行质量评价	推荐
8.4	临床医师与组织病理医师及分子检测人员应及时就ALK基因检测进行必要的沟通,包括ALK基因检测前、ALK基因检测后及服用ALK抑制剂耐药后再次检测时	专家共识意见
9.ALK检测的室内外质控		
9.1	检测实验室应在临床应用前建立及优化ALK检测规范化操作流程,并进行必要的性能验证	强烈推荐
9.2	检测实验室应定期参加ALK检测室间质评活动,每年至少2次	强烈推荐
9.3	检测实验室均应设置阴阳性对照	强烈推荐
9.4	检测实验室应制定专人负责ALK基因检测的质量控制,定期组织人员比对、培训及数据总结和分析	强烈推荐
10.ALK抑制剂耐药机制检测		
10.1	对于ALK抑制剂耐药的患者,基因检测内容应由临床医师和分子病理检测医师共同讨论决定	专家共识意见
10.2	耐药患者进行基因检测时,建议优先应用NGS检测,检测内容包括获得性突变和融合突变类型等	专家共识意见

注:基于文献报道及专家组的实践经验,本共识中涉及的推荐分级按以下基本原则:(1)强烈推荐:基于高或中级别证据,可信度高;(2)推荐:基于中级别或低级别证据,但具有一些局限性,专家组同意推荐;(3)专家共识意见:基于低级别证据或缺乏证据,但专家组同意意见

## 参考文献

- [1] Gou LY, Wu YL. Prevalence of driver mutations in non-small-cell lung cancers in the People's Republic of China [J]. Lung Cancer (Auckl), 2014, 5: 1-9. DOI: 10.2147/LCTT.S40817.
- [2] Yang L, Ling Y, Guo L, et al. Detection of ALK translocation in non-small cell lung carcinoma (NSCLC) and its clinicopathological significance using the Ventana immunohistochemical staining method: a single-center large-scale investigation of 1,504 Chinese Han patients[J]. Chin J Cancer Res, 2016, 28(5): 495-502. DOI: 10.21147/j.issn.1000-9604.2016.05.04.
- [3] Ying J, Li L, Li W, et al. ALK testing in Chinese advanced NSCLC patients: a national-wide multicenter prospective real-world data study (The RATICAL Study) [C]. World Conference on Lung Cancer(WCLC), 2019: P1.09.
- [4] 张绪超, 陆舜, 张力, 等. 中国间变性淋巴瘤激酶(ALK)阳性非小细胞肺癌诊断专家共识(2013版)[J]. 中华病理学杂志, 2013, 42(6): 402-406. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2013.06.012.
- [5] Solomon BJ, Mok T, Kim DW, et al. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer[J]. N Engl J Med, 2014, 371(23): 2167-2177. DOI: 10.1056/NEJMoa1408440.
- [6] Nishio M, Kim DW, Wu YL, et al. Crizotinib versus chemotherapy in Asian patients with ALK-positive advanced non-small cell lung cancer[J]. Cancer Res Treat, 2018, 50(3): 691-700. DOI: 10.4143/crt.2017.280.
- [7] Chafit JE, Dagogo-Jack I, Santini FC, et al. Clinical outcomes of patients with resected, early-stage ALK-positive lung cancer [J]. Lung Cancer, 2018, 122: 67-71. DOI: 10.1016/j.lungcan.2018.05.020.
- [8] Caliò A, Nottegar A, Giloli E, et al. ALK/EML4 fusion gene may be found in pure squamous carcinoma of the lung[J]. J Thorac Oncol, 2014, 9(5): 729-732. DOI: 10.1097/JTO.000000000000109.
- [9] Vergne F, Quéré G, Andrieu-Key S, et al. ALK-rearranged squamous cell lung carcinoma responding to crizotinib: a missing link in the field of non-small cell lung cancer? [J]. Lung Cancer, 2016, 91: 67-69. DOI: 10.1016/j.lungcan.2015.11.010.
- [10] Liang H, Song X, Zhang Y, et al. Real-world data on EGFR/ALK gene status and first-line targeted therapy rate in newly diagnosed advanced non-small cell lung cancer patients in Northern China: a prospective observational study[J]. Thorac Cancer, 2019, 10(7): 1521-1532. DOI: 10.1111/1759-7714.13090.
- [11] Dragnev KH, Gehr G, Memoli VA, et al. ALK-rearranged adenosquamous lung cancer presenting as squamous cell carcinoma: a potential challenge to histologic type triaging of NSCLC biopsies for molecular studies[J]. Clin Lung Cancer, 2014, 15(3):e37-e40. DOI: 10.1016/j.cllc.2014.01.003.
- [12] Hida T, Nokihara H, Kondo M, et al. Alectinib versus crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer (J-ALEX): an open-label, randomised phase 3 trial[J]. Lancet, 2017, 390(10089): 29-39. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)30565-2.
- [13] Zhou C, Kim SW, Reungwetwattana T, et al. Alectinib versus crizotinib in untreated Asian patients with anaplastic lymphoma kinase-positive non-small-cell lung cancer (ALESIA): a randomised phase 3 study[J]. Lancet Respir Med, 2019, 7(5): 437-446. DOI: 10.1016/S2213-2600(19)30053-0.
- [14] Soria JC, Tan D, 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. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)30123-X.
- [15] Li W, Zhang J, Guo L, et al. Combinational analysis of FISH and immunohistochemistry reveals rare genomic events in ALK fusion patterns in NSCLC that responds to crizotinib treatment[J]. J Thorac Oncol, 2017, 12(1): 94-101. DOI: 10.1016/j.jtho.2016.08.145.
- [16] Lin JJ, Zhu VW, Yoda S, et al. Impact of EML4-ALK variant on resistance mechanisms and clinical outcomes in ALK-positive lung cancer[J]. J Clin Oncol, 2018, 36(12): 1199-1206. DOI: 10.1200/JCO.2017.76.2294.
- [17] Li Y, Zhang T, Zhang J, et al. Response to crizotinib in advanced ALK-rearranged non-small cell lung cancers with different ALK-fusion variants[J]. Lung Cancer, 2018, 118: 128-133. DOI: 10.1016/j.lungcan.2018.01.026.
- [18] Conklin CM, Craddock KJ, Have C, et al. Immunohistochemistry is a reliable screening tool for identification of ALK rearrangement in non-small-cell lung carcinoma and is antibody dependent[J]. J Thorac Oncol, 2013, 8(1): 45-51. DOI: 10.1097/JTO.0b013e318274a83e.
- [19] 《常规免疫组织化学初筛 ALK 阳性非小细胞肺癌专家共识》专家组. 常规免疫组织化学初筛 ALK 阳性非小细胞肺癌专家共识[J]. 中华病理学杂志, 2015, 44(7): 476-479. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2015.07.012.
- [20] Ren S, Hirsch FR, Varella-Garcia M, et al. Atypical negative ALK break-apart FISH harboring a crizotinib-responsive ALK rearrangement in non-small-cell lung cancer[J]. J Thorac Oncol, 2014, 9(3): e21-23. DOI: 10.1097/JTO.000000000000013.
- [21] Bordi P, Tiseo M, Rofí E, et al. Detection of ALK and KRAS mutations in circulating tumor DNA of patients with advanced ALK-positive NSCLC with disease progression during crizotinib treatment[J]. Clin Lung Cancer, 2017, 18(6): 692-697. DOI: 10.1016/j.cllc.2017.04.013.
- [22] van der Wekken AJ, Pelgrim R, 't Hart N, et al. Dichotomous ALK-IHC is a better predictor for ALK inhibition outcome than traditional ALK-FISH in advanced non-small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2017, 23(15): 4251-4258. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1631.
- [23] Presley CJ, Tang D, Soulos PR, et al. Association of broad-based genomic sequencing with survival among patients with advanced non-small cell lung cancer in the community oncology setting[J]. JAMA, 2018, 320(5): 469-477. DOI: 10.1001/jama.2018.9824.
- [24] Gainor JF, Varghese AM, Ou SH, et al. ALK rearrangements are mutually exclusive with mutations in EGFR or KRAS: an analysis of 1,683 patients with non-small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(15): 4273-4281. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0318.
- [25] 宋鹏, 张力, 尚聪聪. ALK融合基因阳性非小细胞肺癌的研究进展[J]. 中国肺癌杂志, 2018, 21(9): 703-711. DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2018.09.10.

(收稿日期: 2019-08-03)

(本文编辑: 常秀青)

## · 标准与规范 ·

# 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

张绪超 陆舜 张力 廖美琳 王长利 程颖 李甘地 Tony Mok(莫树锦)  
 黄诚 刘晓晴 王洁 王孟昭 张沂平 周建英 周晓军 周晓燕 林冬梅  
 杨衿记 宋勇 胡成平 王凯 何勇 李慧 钟文昭 吴一龙

代表中国临床肿瘤学会肿瘤标志物专家委员会

原发性肺癌(简称肺癌)是我国最常见的恶性肿瘤之一。根据国家癌症中心公布的 2015 年癌症统计数据显示,2015 年,我国新发肺癌患者例数达 73.3 万,死亡例数 60.0 万,居所有恶性肿瘤之首<sup>[1]</sup>,其中 80%以上的患者为非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer)。近十多年来,随着分子医学的进展和靶向药物的不断涌现,非小细胞肺癌的治疗已由化疗为主进入到个体化分子靶向精准治疗的时代。目前美国食品药品管理局(FDA)批准的临床应用的个体化分子靶向治疗主要针对表皮生长因子受体(EGFR)突变型、间变性淋巴瘤激酶(ALK)融合基因型、ROS1 融合基因型及 BRAF 基因突变型肺癌,这 4 种基因变异型肺癌均具有明确的分子靶点、靶点检测技术及上市的靶向药物,临床疗效得到明显提高。免疫检查点药物在美国及部分欧洲国家已经批准上市,在我国正进行注册试验。

肺癌中 ALK 变异主要为 ALK 基因与其他基因发生断裂重排。其中,棘皮动物微管结合样蛋白 4-ALK(EML4-ALK)融合基因变异是其主要类型,除了 EML4 外,与 ALK 基因融合的其他基因还包括

TFG 和 KIF5B 等。国内外研究数据表明,发生 ALK 重排的非小细胞肺癌患者约占所有非小细胞肺癌的 3%~7% 左右,且发病率在亚裔和高加索人群之间差异无统计学意义<sup>[2-4]</sup>。肺癌中另一个驱动基因 ROS1 活化主要是基因重排所致,ROS1 与 ALK 二者氨基酸序列上具有近 49% 的相似性,而在激酶催化区的 ATP 结合位点同源性高达 77%<sup>[5]</sup>。ALK 与 ROS1 两个基因型的肺癌在临床特征上也非常相似。ROS1 融合基因在非小细胞肺癌中的阳性率为 1.0%~3.4%<sup>[6]</sup>。近期一项来自国人的多中心数据显示,在 EGFR 突变阴性的人群中,ALK 基因融合和 ROS1 基因融合的发生率分别高达 12.2% 和 4.4%<sup>[7]</sup>。

目前,在中国获批的针对 ALK 靶点的小分子抑制剂为克唑替尼(Crizotinib),针对 ALK 靶点的其他小分子抑制剂如 Ceritinib 和 Alectinib 已被 FDA 批准用于 ALK 阳性晚期非小细胞肺癌患者的治疗。在我国相关适应证目前还处在临床试验阶段。克唑替尼是一种 ATP 竞争性酪氨酸激酶抑制剂,可特异度靶向抑制 ALK, c-MET 和 ROS1 等信号通路。PROFILE1014 和 PROFILE1029 临床试验均显示对于 ALK 阳性的晚期非小细胞肺癌患者,一线克唑替尼的疗效显著优于传统化疗<sup>[8-9]</sup>。2016 欧洲临床肿瘤学会(ESCO)大会上,Shaw 等<sup>[10]</sup>更新了克唑替尼在 ROS1 阳性晚期非小细胞肺癌患者 1 期扩展临床研究结果。在本次研究更新中,克唑替尼在 53 例 ROS1 阳性非小细胞肺癌总体缓解率达到 69%,中位无进展生存为 19.3 个月。基于 1 期扩展临床研究结果,2016 年 3 月,FDA 批准了克唑替尼用于治疗 ROS1 阳性的晚期非小细胞肺癌患者中的适应证。由中国专家领衔为中国 ROS1 适应证注册的 OO-1201 研究的具体结果已经在 2016 年美国临床

DOI:10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2018.04.003

作者单位:广东省肿瘤研究所 广东省人民医院 广东省医学科学院(张绪超、杨衿记、钟文昭、吴一龙);上海交通大学附属胸科医院(陆舜、廖美琳);中山大学肿瘤医院(张力);天津肿瘤医院(王长利);吉林省肿瘤医院(程颖、李慧);四川大学华西医院病理科(李甘地);香港中文大学医学院[Tony Mok(莫树锦)];福建省肿瘤医院(黄诚);解放军第三〇七医院(刘晓晴);北京大学肿瘤医院(王洁、林冬梅);北京协和医院(王孟昭);浙江省肿瘤医院(张沂平);浙江大学医学院附属第一医院(周建英);解放军南京总医院(周晓军、宋勇);复旦大学附属肿瘤医院病理科(周晓燕);中南大学湘雅医院(胡成平);浙江大学医学院附属第二医院(王凯);陆军军医大学大坪医院(何勇)

通信作者:吴一龙,Email:syylwu@live.cn

肿瘤学会(ASCO)大会上首次公布,克唑替尼在127例ROS1阳性非小细胞肺癌总体缓解率达到69.3%,中位无进展生存为13.4个月<sup>[11]</sup>。基于这些研究结果,2017年9月中国食品药品监督管理总局(CFDA)批准了克唑替尼在ROS1阳性的晚期非小细胞肺癌的适应证。

ALK、ROS1阳性非小细胞肺癌作为非小细胞肺癌两个独特的分子亚型,目前均有多种诊断方法可以用于它们的诊断,但每一种诊断方法均有各自的优缺点,因此,如何准确和规范的诊断和治疗它们便成了临床上的当务之急。基于此,中国临床肿瘤学会(Chinese Society of Clinical Oncology,CSCO)肿瘤标志物专家委员会于2013年组织诊断和治疗领域专家制定了中国ALK阳性非小细胞肺癌的诊断专家共识(2013版)<sup>[12]</sup>。并在2015年对共识进行更新,将共识升级为指南,及补充治疗指南<sup>[13]</sup>。基于近年来新出现的循证医学证据,专家委员会决定对2015版指南进行更新,并补充ROS1诊断和治疗相关内容。

### 一、ALK阳性非小细胞肺癌和ROS1阳性非小细胞肺癌的定义

2007年Rikova等<sup>[14]</sup>和Soda等<sup>[15]</sup>两个小组分别发现肺癌中存在EML4-ALK融合基因变异现象,且该基因变异具有致癌性,明确了EML4-ALK融合基因是肺癌的驱动基因之一。2009年Shaw等<sup>[16]</sup>将ALK基因重排阳性的肺癌列为非小细胞肺癌的一个特定分子亚型。根据已有的研究结果,CSCO肿瘤标志物专家委员会讨论认为,从检测方法学角度考虑,ALK融合型非小细胞肺癌不仅是基因序列层面的改变即序列重排,ALK融合蛋白也是该类疾病中的重要变异特征(基因重排后),因此将ALK基因重排荧光原位杂交(FISH)检测、ALK融合序列变异即时荧光定量PCR(RT-PCR)检测或ALK融合蛋白免疫组织化学检测阳性的肺癌统称为“ALK阳性非小细胞肺癌”,是非小细胞肺癌的一个重要分子亚型,常见于腺癌,该类患者通常可从ALK抑制剂(ALK-TKI)治疗中获益。

2007年Rikova等<sup>[17]</sup>在肺癌细胞系中发现了CD74-ROS1融合蛋白及其基因重排。2011年Li等<sup>[18]</sup>从202例肺腺癌非吸烟患者中检测出2例CD74-ROS1融合蛋白阳性患者。2012年,Bergethon等<sup>[19]</sup>在肺癌患者中发现SLC34A2-ROS1基因融合,并将ROS1基因重排阳性的肺癌列为非小细胞肺癌的另一个特定分子亚型。根据已有的研究结果,

CSCO肿瘤标志物专家委员会讨论认为,ROS1阳性非小细胞肺癌是指含有ROS1基因重排或融合蛋白异常表达的肺癌,它的临床与ALK阳性非小细胞肺癌有高度的相似性,且用克唑替尼治疗均有良好的效果。

### 二、ALK和ROS1检测适宜人群

CSCO肿瘤标志物专家委员会讨论了肺癌中ALK、ROS1检测的标本条件及与其他分子标志物分析的关系,做出以下推荐或建议。

1.晚期非小细胞肺癌患者治疗前推荐常规检测ALK融合变异和ROS1融合变异状态。推荐所有含腺癌成分的非小细胞肺癌患者,应在诊断时常规进行ALK、ROS1融合基因或融合蛋白检测(1类推荐;证据级别定义请见文章末注解)。

2.对于小活检标本或者不吸烟的鳞状细胞癌患者也建议进行ALK、ROS1检测(1类推荐)。

3.检测前应有送检样本的质控,包括亚型确认和样本量确认。送检样本类型包括手术样本、活检组织样本、胸水等细胞学样本。对于部分活检组织标本因临床取材样本小的局限性,有时无法保证肺腺癌的准确诊断,应考虑对不能判断组织学类型的肺癌也进行ALK、ROS1检测(1类推荐)。

4.目前非小细胞肺癌中需要检测靶点越来越多,为了提高检测的有效性,同时兼顾技术的可行性,专家组推荐,关于ROS1的检测,推荐ROS1和ALK、EGFR同时检测(2A类推荐)。推荐使用经过认证的多靶点检测技术,同时检测ALK、EGFR和ROS1。对于不具备同时检测条件的医院,实验室可先进行ALK/ROS1的免疫组织化学方法检测。Ventana IHC检测ALK阳性可作为确认的结果作为临床决策参考。鉴于目前ROS1抗体的非特异性,ROS1免疫组织化学方法检测结果阳性的患者,必须进一步使用FISH或者RT-PCR确诊。

5.为了避免样本浪费和节约检测时间,对于晚期非小细胞肺癌活检样本,建议一次性切出需要诊断组织类型和进行ALK、EGFR及ROS1检测的样本量,避免重复切片浪费样本(2A类推荐)。一次性制片和留取样本时需注意避免污染。

6.有研究表明,发病年龄是ALK阳性非小细胞肺癌一项显著的独立预测因子,在年轻非小细胞肺癌患者中,发生ALK融合的概率显著高于发生EGFR突变的概率<sup>[20]</sup>,在年龄小于51岁的患者中,发生ALK重排的概率高达18.5%<sup>[20]</sup>。因此对于样本量有限可能不能满足同时进行ALK和EGFR检

测的样本,对于年龄相对比较年轻的患者,建议考虑优先检测 ALK 融合状态(2B 类推荐)。

### 三、ALK 阳性非小细胞肺癌的检测

目前,CFDA 已经批准多个 ALK 阳性非小细胞肺癌的诊断试剂盒,最早获批包括雅培贸易(上海)有限公司的 ALK 基因重排检测试剂盒(FISH 法)、罗氏诊断产品(上海)有限公司的 Ventana anti-ALK 抗体诊断试剂盒(免疫组织化学法)、厦门艾德生物医药科技有限公司的 EML4-ALK 融合基因检测试剂盒(RT-PCR 法),此外,近年来,国内也有其他公司的 RT-PCR 和 FISH 检测试剂盒获得 CFDA 批准。

1.对于 ALK 阳性非小细胞肺癌的诊断,肿瘤原发或转移部位的组织或细胞学标本均可进行 ALK 融合基因检测,推荐使用 CFDA 批准的诊断试剂和方法进行诊断(1 类推荐)。

2.专家组推荐 Ventana IHC 可以作为 ALK 阳性非小细胞肺癌的临床首选的常规诊断方法。诊断报告中应该注明 Ventana IHC 方法,以区别于初筛的常规免疫组织化学方法。ASCEND-4 研究和 ALEX 研究均证实了使用 Ventana IHC 可以有效的筛选出 ALK 阳性非小细胞肺癌<sup>[21-22]</sup>,因此专家组将证据级别由 2A 类改成 1 类。

3.对于不能开展 ALK Ventana IHC 检测的实验室,鼓励患者尤其是小活检样本患者,送样到周边能开展 Ventana IHC 检测的实验室进行 ALK 融合基因检测(2A 类推荐)。

4.在条件缺乏的地区建议采用常规免疫组织化学法进行 ALK 阳性非小细胞肺癌患者的初筛,筛查 ALK 阳性或疑似阳性的患者必须接受 FISH、Ventana IHC 或者 RT-PCR 技术中任意一种技术确诊(2A 类推荐)。

5.对于 ALK 常规免疫组织化学,建议采用国内病理专家达成共识的规范化操作和判读标准进行操作<sup>[23]</sup>。推荐使用经过证实,具有高灵敏度和特异度的抗体,主要为 D5F3(Cell Signaling Tech 公司)、5A4(Abcam 公司)和 1A4(OriGene 公司),它们检测 ALK 融合蛋白的灵敏度和特异度分别达到了 100% 和 95%~99%<sup>[24]</sup>。

6.RT-PCR 能够灵敏地检测出已知类型的融合基因,开展基于 PCR 技术检测 ALK 融合变异的实验室环境要求应该能够保证检测质量,建议 PCR 实验室需要符合我国卫生计生委临床检测中心的临检 PCR 室资格认证条件。鼓励各检测实验室应做好室内质控,并积极参与外部质控评价项目。

7.使用血液(血浆)标本进行 ALK 融合状态的评估,相关的研究工作才刚刚开始,相关技术的灵敏度和特异度均不是很高。因此,当组织样本不可评估时,鼓励各中心可以根据实际情况,进行相关研究的探索,专家组暂不推荐使用血液(血浆)标本作为补充进行 ALK 融合检测。

上述多种技术,各有优缺点,也会存在一定的互补性。结合临床可获得的各类生物材料样本(手术或穿刺活检组织、胸水细胞学和痰液细胞学等),在保证样本质控前提下有效利用各种检测分析技术获得最高检出率具有重要科学意义和临床意义。具体使用何种方法,各检测实验室应参考推荐方法并根据组织标本类型选择合适的检测技术。当怀疑一种技术的可靠性时(如 FISH 的肿瘤细胞融合率接近 15% 时),可以考虑采用另一种技术加以验证。

适合 ALK 融合基因诊断的肿瘤样本,包括各种组织样本和细胞学标本。组织标本获取手段包括手术切除、支气管镜检、经皮肺穿刺、淋巴结活检、手术活检等。对于恶性胸腔积液、心包积液、痰液或支气管灌洗液和细胞学穿刺等样本,在细胞数量充足条件下可制备细胞学样本蜡块(cell block),检测方法可采用 FISH 或免疫组织化学或 RT-PCR<sup>[25]</sup>,如果是新鲜细胞标本可考虑采用特异性 PCR 方法。考虑到细胞学样本的细胞数量少等特点,细胞学标本的检测结果解释需格外谨慎。

### 四、ROS1 阳性非小细胞肺癌的检测

关于 ROS1 融合基因检测,国际多中心临床研究通常采用 FISH 或者 RT-PCR 方法。

目前,CFDA 已经批准 ROS1 阳性非小细胞肺癌的诊断试剂盒包括厦门艾德生物医药科技有限公司的人类 ROS1 基因融合检测试剂盒(RT-PCR 法)和武汉友芝友科技有限公司的人类 ROS1 基因融合检测试剂盒(RT-PCR 法)。

专家组推荐:

1.使用经过 CFDA 批准的试剂盒进行 ROS1 融合基因的检测(1 类推荐)。此外,临床研究使用的经过验证的技术如 FISH 也可以作为补充诊断 ROS1 融合基因(2A 类推荐)。

2.对于晚期非小细胞肺癌小活检样本,推荐 ROS1 和 ALK、EGFR 同时检测(2A 类推荐),推荐使用经过认证的多靶点检测技术,同时检测 ALK、EGFR 和 ROS1。

3.对于不能同时检测的患者,可以先使用 ROS1 的免疫组织化学检测,ROS1 检测结果阳性的患者,

进一步进行 FISH 或 RT-PCR 确诊。对于 ROS1 免疫组织化学,研究证实 D4D6 抗体 (Cell Signaling Tech 公司)具有较高的灵敏度,但检测结果仍具有较高的假阳性。因此,对于免疫组织化学检测 ROS1 阳性的标本必须采用 FISH 或 RT-PCR 方法进行确诊<sup>[26]</sup>。

### 五、ALK 和 ROS1 阳性非小细胞肺癌诊断流程

表 1 列举了基因重排或融合蛋白的常用分子诊断各种方法的优缺点,对于 ALK 阳性非小细胞肺癌的筛查。FISH、Ventana IHC 和 RT-PCR 已获 CFDA 批准用于临床检测,适合于最终的确诊。对于 ROS1 阳性非小细胞肺癌的筛查,FISH 和 RT-PCR 已被验证可以用于临床检测,以上 3 种方法的具体操作流程和注意事项可参见相关的产品说明书。

**检测总体原则:**综合各类受检生物材料的特征、分子检测方法特点、实验室自身条件等进行多学科协作,采取合理有效检测方法和流程,以保证 ALK 或 ROS1 融合型非小细胞肺癌的检出率和准确率。

综合考虑上述受检生物材料和检测技术等因素,CSCO 肿瘤标志物专家组推荐以下用于临床实践的检测流程图(图 1)。

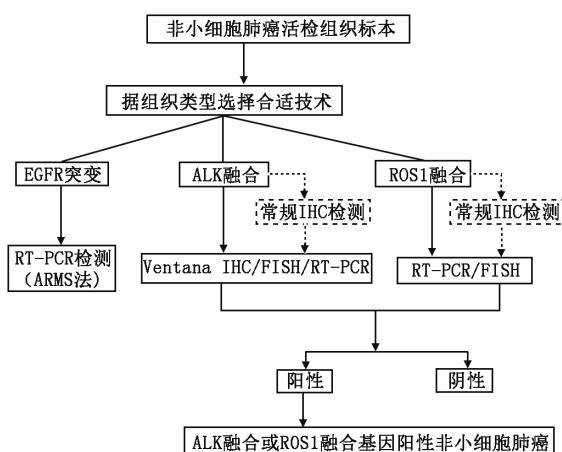
#### 注意事项:

1.对于部分无条件行 Ventana IHC 检测的医疗机构或中心,常规 ALK IHC 可作为初筛方法,但阳性标本须以 CFDA 批准的 FISH、Ventana IHC 或 RT-PCR 技术进一步确诊。

2.常规 ROS1 IHC 可作为初筛方法,但阳性标本须以 CFDA 批准的 RT-PCR 技术或者临床研究使用的 FISH 方法进一步确诊。

3.目前 ROS1 FISH 方法在我国还没有获得 CFDA 的批准。

4.ALK 抗体使用推荐:常规 IHC 建议使用 Cell Signaling Tech 公司的 D5F3 克隆号或 Abcam 公司的 5A4 克隆号抗体;Ventana IHC 使用专用抗体试剂盒



EGFR:表皮生长因子受体; ALK: 间变性淋巴瘤激酶;  
RT-PCR:即时荧光定量聚合酶链反应; ARMS:扩增阻滞突变系统; IHC:免疫组织化学; FISH:荧光原位杂交

图 1 中国 ALK、ROS1 阳性非小细胞肺癌患者的诊断流程图

(D5F3)。

5.美国国家综合癌症网络(NCCN)肺癌指南在 2014 年第 3 版开始,推荐使用二代测序(NGS)来同时检测 EGFR 基因突变和 ALK 基因融合。NGS 虽然具有很多优势,但目前,关于 NGS 检测样本的质控、数据的解析等一系列问题还没有明确的规范。国内也没有一款获批的基于 NGS 的肿瘤生物标志物检测试剂盒,且目前 NGS 的收费还比较高,因此在临床检测中,暂不推荐使用 NGS 来常规检测 EGFR 基因突变和 ALK 基因融合。但各自中心可以根据实际情况,在临床研究中使用 NGS 来筛查 ALK 等相关基因的融合突变情况。

### 六、ALK 阳性晚期非小细胞肺癌的治疗

对于 ALK 阳性晚期非小细胞肺癌,PROFILE 1029 研究证实,在东亚人群中,一线患者无进展生存期可达 11.1 个月,有效率可达 88%<sup>[9]</sup>,并且患者的疾病相关症状(如咳嗽、胸痛和呼吸困难等)和整

表 1 免疫组织化学、荧光原位杂交和即时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测方法的比较

项目	荧光原位杂交	免疫组织化学	RT-PCR
灵敏度 <sup>[27]</sup>	10%~15%	5%~10%	1%~5%
检测费用	高	低	高
可检测的融合型	所有融合型但不能区分	所有融合型但不能区分	已知的融合型
操作要求	高,需经过培训且有经验的医师判读结果	简便,几乎所有病理科医师均可诊断	简便,但需特定的试剂盒及仪器
所需组织量	厚度 3~5 μm 石蜡切片	厚度 3~5 μm 石蜡切片	100~500 ng RNA 的组织
优点	特异度高	操作简便、价格便宜	操作简便、灵敏度高
不足之处	操作要求高、价格昂贵、尚不适用于 ALK 融合阳性患者的筛查	判定标准主观、无法直接检测融合基因	无法检测未知的融合型、对 RNA 质量要求高

体生活质量得到显著的改善。值得注意的是,亚组分析显示,脑转移患者也能从克唑替尼的治疗中明显获益。对于 ALK 阳性非小细胞肺癌患者的二线治疗,PROFILE 1007 研究证实<sup>[28]</sup>,与标准二线化疗(培美曲塞或多西他赛单药)相比,克唑替尼治疗组患者无进展生存期显著延长(7.7 个月比 3.0 个月),肿瘤缓解率明显提高(65% 比 20%),并且患者的整体生活质量和疾病相关症状(如疲乏、咳嗽、胸痛及呼吸困难等)改善更显著,2017 年的一项中国患者 ALK 阳性肺癌患者的真实世界研究也得到同样的结果<sup>[29]</sup>。此外,基于 ASCEND-4 研究结果<sup>[21]</sup>,2017 年 5 月 29 日,FDA 批准 Ceritinib 用于 ALK 阳性的一线转移性非小细胞肺癌的治疗。在与克唑替尼头对头的 ALEX 研究中,Alectinib 也取得阳性结果<sup>[22]</sup>,2017 年 FDA 批准了 Alectinib 的一线适应证。但到目前为止,Ceritinib 和 Alectinib 在我国均未获批一线适应证。

#### 专家组推荐:

1. 对于初诊为 ALK 阳性晚期非小细胞肺癌患者,应一线使用克唑替尼治疗(1 类推荐)。
2. 确诊 ALK 前由于各种原因接受了化疗的患者,在确诊 ALK 阳性后可中断化疗或在化疗完成后接受克唑替尼治疗(2A 类推荐)。

克唑替尼治疗最常见的不良反应( $\geq 25\%$ )为视觉异常、恶心、腹泻、呕吐、便秘、水肿、转氨酶升高及疲乏。但通常这些反应的级别较低,主要为 1 或 2 级。在 PROFILE 1029 研究中 3/4 级不良反应发生率相对较高的为转氨酶升高(12%)及中性粒细胞减少(16%)<sup>[8]</sup>,因此,在临床应用过程中,要注意患者肝功能及全血细胞计数的监测。而对于较少发生但严重的不良反应——间质性肺病,在 PROFILE 1014 研究中发生率为 1%<sup>[8]</sup>。治疗过程中要注意监测患者肺部的症状和影像学征象,一旦疑似药物相关间质性肺病发生,应立即停药;确诊间质性肺病,永久停药。克唑替尼推荐起始治疗剂量为 250 mg 每日 2 次,口服。在治疗的过程中,如果患者出现 3/4 级不良事件,需一次或多次减少剂量。第一次减少剂量:200 mg 每日 2 次,口服;第二次减少剂量:250 mg 每日 1 次,口服;如果每日一次口服 250 mg 仍不能耐受,则永久停服。

克唑替尼治疗出现疾病进展,NCCN 指南推荐根据患者症状、转移部位、单发/多发病灶等 3 大因素决定克唑替尼耐药后的治疗<sup>[30]</sup>。回顾性研究表明克唑替尼治疗进展模式主要表现为 3 种模式:仅

新发病灶、仅靶病灶进展、新发病灶和非靶病灶进展,约各占 1/4,全面进展较少,仅 5% 如患者进展无症状<sup>[31]</sup>,推荐继续使用克唑替尼治疗或者换用二代 ALK-TKI;如患者出现有症状的单发脑转移或系统性转移灶,考虑局部治疗结合继续克唑替尼治疗或者换用二代 ALK-TKI;如患者出现有症状的多发脑转移,考虑全脑放疗结合继续克唑替尼治疗<sup>[32]</sup>;如患者出现有症状的系统性多发转移灶,考虑二代 ALK-TKI 治疗或腺癌的其他优选治疗(根据患者功能状态评分进行双药化疗)<sup>[32]</sup>(2A 类推荐)。目前,FDA 已经批准的克唑替尼治疗进展后二代 ALK-TKI 包括 Ceritinib、Alectinib 和 Brigatinib。回顾性研究显示,克唑替尼后续 Ceritinib 治疗,患者中位无进展生存期达 17.4 个月,中位总生存期达 49.4 个月<sup>[33]</sup>,克唑替尼后续 Alectinib 治疗,中位总生存期达 51.1 个月<sup>[34]</sup>。2017 年 ESMO 大会公布了 PROFILE 1014 总生存期的更新数据,一线使用克唑替尼,进展后序贯使用其他 ALK-TKI 或者其他治疗的患者的总生存期还没有达到;而一线使用化疗,后使用 ALK-TKI 等治疗患者的总生存期为 47.5 个月。一线使用克唑替尼的患者,4 年的总生存率为 56.6%,而一线使用化疗的患者 4 年总生存率为 49.1%。这是到目前为止,肺癌靶向治疗中,在前瞻性 3 期临床研究中观察到的最长的总生存期数据。目前关于 ALK-TKI 治疗进展后,未出现类似 EGFR 突变的单个耐药点突变占主导地位的情况。二代 ALK 抑制剂临床研究也未曾按照具体位点分组分析疗效与突变的关系。具体耐药基因也未能如 T790M 突变一样对临床治疗选择产生巨大的影响<sup>[32]</sup>。故此仅为基础或临床研究参考。

#### 专家组推荐:

1. ALK 阳性患者接受克唑替尼治疗后出现耐药进展,考虑到二代药物在我国尚未上市,鼓励患者参加临床试验,以期获得新药进行治疗。对有条件获得二代 ALK-TKI 的患者,条件允许,建议二次活检后全面分析耐药点突变状态,选用敏感的二代 ALK-TKI 进行治疗。
2. 经 ALK-TKI 治疗后的患者出现局部进展或缓慢进展后,继续克唑替尼治疗或局部治疗(2A 类推荐)。若患者出现多部位的全面进展,且临床症状出现恶化后,含铂双药化疗或含铂双药化疗+贝伐珠单抗(非鳞状细胞癌;2A 类推荐),再次出现进展后,可根据患者功能评分,酌情选用之前未选用的化疗药物进行治疗(2A 类推荐)。

## 七、ROS1 阳性晚期非小细胞肺癌的治疗

对于 ROS1 阳性晚期非小细胞肺癌, OO-1201 研究显示, 在东亚人群中, ROS1 阳性患者无进展生存期可达 13.4 个月, 有效率可达 69.3%, 并且患者报告的整体生活质量得到显著的改善<sup>[11]</sup>。克唑替尼对于 ROS1 阳性非小细胞肺癌的安全性与之前克唑替尼治疗报道研究相一致, 最常见的不良反应为视觉异常、恶心、腹泻、呕吐、便秘、水肿、转氨酶升高及疲乏。但通常这些反应的级别较低, 主要为 1 或 2 级。3/4 级不良反应中发生率相对较高的为转氨酶升高(5.5%)及中性粒细胞减少(7.9%)<sup>[11]</sup>。

### 专家组推荐:

1. 对于初诊为 ROS1 阳性晚期非小细胞肺癌患者, 应一线使用克唑替尼治疗(1类推荐)。

2. 确诊 ROS1 前由于各种原因接受了化疗的患者, 在确诊 ROS1 阳性后可中断化疗或在化疗完成后接受克唑替尼治疗(2A 类推荐)。

3. 对于 ROS1 阳性患者, 克唑替尼治疗出现疾病进展的后续治疗, 目前缺乏相应的循证医学证据, 可以根据具体治疗情况, 采取后续化治疗方案进行治疗。

## 八、小结

基于 EGFR 基因突变、ALK 基因融合变异、ROS1 基因融合变异、BRAF 基因突变等分子标志物的肺癌分子靶向个体化治疗模式已经在临床建立和应用。吉非替尼、厄洛替尼和克唑替尼等 EGFR 或 ALK、ROS1 抑制剂已经应用于临床, 在我国正在向更多的肺癌患者推广应用。非小细胞肺癌的精准靶向治疗依赖于分子靶点变异的准确诊断。临床实践中分子检测的标准化和检测流程的建立对于提高临床实践能力起关键作用。ALK、ROS1 等融合变异作为晚期肺癌中重要的分子改变, 其诊断方法和流程仍需进一步结合临床数据进行优化。本文根据目前融合基因检测各种方法的优缺点、临床样本的特点和实验室的条件, 提出合理的检测流程、推荐应用方法和注意事项。希望各诊疗中心能客观准确地筛查 ALK 融合变异患者, 合理开展基于明确分子诊断的靶向治疗, 真正造福广大肺癌患者。

本次“中国 ALK 阳性、ROS1 阳性非小细胞肺癌诊疗指南”是在 CSCO 肿瘤生物标志物专家委员会的倡导下, 从临床诊断和治疗角度出发, 结合我国肺癌患者众多(约占全球 1/3)的现状, 综合最新的循证医学研究数据和 CFDA 批准的药物和伴随诊断方法, 在 2015 年指南基础上进行了补充和完善, 供临

床实践参考。本指南将根据实际情况定期更新, 期望能为未来进一步优化 ALK、ROS1 阳性肺癌患者的诊断和治疗提供指导。

**附件 CSCO 肿瘤标志物专家委员会证据或共识水平的定义:**

1 类表示该推荐内容基于高水平的依据, 并且在本指南制定专家成员中具有广泛的共识, 建议值得信赖。

2A 类表示该项推荐基于临床经验在内的较低水平证据, 本指南制定专家成员达成共识, 因此该推荐是可以信赖的。

2B 类表示该项推荐内容基于临床经验在内的较低水平证据, 本指南制定专家成员对于该建议的适宜性意见不一致, 但无较大分歧。

3 类表示 CSCO 肿瘤标志物专家委员会专家存在较大分歧。

本文中所推荐的共识证据级别除了少数作特别说明之外, 均在 2A 类以上。

## 参 考 文 献

- [1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2):115-132. DOI: 10.3322/caac.21338.
- [2] Shackelford RE, Vora M, Mayhall K, et al. ALK-rearrangements and testing methods in non-small cell lung cancer: a review[J]. Genes Cancer, 2014, 5(1-2): 1-14. DOI: 10.18632/genesandcancer.3.
- [3] Vidal J, Clavé S, de Muga S, et al. Assessment of ALK status by FISH on 1000 Spanish non-small cell lung cancer patients[J]. J Thorac Oncol, 2014, 9(12): 1816-1820. DOI: 10.1097/JTO.0000000000000361.
- [4] Pan Y, Zhang Y, Li Y, et al. ALK, ROS1 and RET fusions in 1139 lung adenocarcinomas: a comprehensive study of common and fusion pattern-specific clinicopathologic, histologic and cytologic features[J]. Lung Cancer, 2014, 84(2):121-126. DOI: 10.1016/j.lungcan.2014.02.007.
- [5] Ou SH, Tan J, Yen Y, et al. ROS1 as a ‘druggable’ receptor tyrosine kinase: lessons learned from inhibiting the ALK pathway [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2012, 12(4):447-456. DOI: 10.1586/era.12.17.
- [6] Kim HR, Lim SM, Kim HJ, et al. The frequency and impact of ROS1 rearrangement on clinical outcomes in never smokers with lung adenocarcinoma[J]. Ann Oncol, 2013, 24(9):2364-2370. DOI: 10.1093/annonc/mdt220.
- [7] Song Z, Zheng Y, Wang X, et al. ALK and ROS1 rearrangements, coexistence and treatment in epidermal growth factor receptor-wild type lung adenocarcinoma: a multicenter study of 732 cases[J]. J Thorac Dis, 2017, 9(10):3919-3926. DOI: 10.21037/jtd.2017.09.79.
- [8] Solomon BJ, Mok T, Kim DW, et al. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer[J]. N Engl J Med, 2014, 371(23):2167-2177. DOI: 10.1056/NEJMoa1408440.
- [9] Lu S, Mok T, Lu Y, et al. Phase 3 study of first-line Crizotinib vs Pemetrexed-Cisplatin/Carboplatin in east Asian patients with ALK + advanced non-squamous non-small cell lung cancer (NSCLC)

- [J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34(Suppl): Abstr 9058.
- [10] Shaw AT, Riely GJ, Bang YJ, et al. Crizotinib in advanced ROS1-rearranged non-small cell lung cancer (NSCLC): updated results from PROFILE 1001[C]. ESMO. Copenhagen: Denmark. 2016. Poster 1206PD.
- [11] 吴一龙, 周建英, 杨矜记, 等. 克唑替尼东亚人群 ROS1 阳性非小细胞肺癌Ⅱ期研究[C]. 厦门, 2016. 中国临床肿瘤学会年会.
- [12] 张绪超, 陆舜, 张力, 等. 中国间变性淋巴瘤激酶(ALK)阳性非小细胞肺癌诊断专家共识(2013 版)[J]. 中华病理学杂志, 2013, 42(6): 402-406. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2013.06.012.
- [13] 张绪超, 陆舜, 张力, 等. 中国间变性淋巴瘤激酶(ALK)阳性非小细胞肺癌诊疗指南[J]. 中华病理学杂志, 2015, 44(10): 696-703. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2015.10.003.
- [14] Rikova K, Guo A, Zeng Q, et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer[J]. *Cell*, 2007, 131(6): 1190-1203. DOI: 10.1016/j.cell.2007.11.025.
- [15] Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer [J]. *Nature*, 2007, 448(7153): 561-566. DOI: 10.1038/nature05945.
- [16] Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK[J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(26): 4247-4253. DOI: 10.1200/JCO.2009.22.6993.
- [17] Rikova K, Guo A, Zeng Q, et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer[J]. *Cell*, 2007, 131(6): 1190-1203. DOI: 10.1016/j.cell.2007.11.025.
- [18] Li C, Fang R, Sun Y, et al. Spectrum of oncogenic driver mutations in lung adenocarcinomas from East Asian never smokers [J]. *PLoS One*, 2011, 6(11): e28204. DOI: 10.1371/journal.pone.0028204.
- [19] Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers[J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30(8): 863-870. DOI: 10.1200/JCO.2011.35.6345.
- [20] Hong S, Fang W, Hu Z, et al. A large-scale cross-sectional study of ALK rearrangements and EGFR mutations in non-small-cell lung cancer in Chinese Han population[J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 7268. DOI: 10.1038/srep07268.
- [21] Soria JC, DSW T, 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. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)30123-X.
- [22] Peters S, Camidge DR, Shaw AT, et al. Alectinib versus Crizotinib in untreated ALK-positive non-small-cell lung cancer [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(9): 829-838. DOI: 10.1056/NEJMoa1704795.
- [23] 《常规免疫组织化学初筛 ALK 阳性非小细胞肺癌专家共识》
- 专家组. 常规免疫组织化学初筛 ALK 阳性非小细胞肺癌专家共识[J]. 中华病理学杂志, 2015, 44(7): 476-479. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2015.07.012.
- [24] Mino-Kenudson M, Chiriac LR, Law K, et al. A novel, highly sensitive antibody allows for the routine detection of ALK-rearranged lung adenocarcinomas by standard immunohistochemistry[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(5): 1561-1571. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2845.
- [25] Zhou J, Yao H, Zhao J, et al. Cell block samples from malignant pleural effusion might be valid alternative samples for anaplastic lymphoma kinase detection in patients with advanced non-small-cell lung cancer [J]. *Histopathology*, 2015, 66(7): 949-954. DOI: 10.1111/his.12560.
- [26] Zhou J, Zhao J, Zheng J, et al. A prediction model for ROS1-rearranged lung adenocarcinomas based on histologic features[J]. *PLoS One*, 2016, 11(9): e0161861. DOI: 10.1371/journal.pone.0161861.
- [27] Tuononen K, Sarhadi VK, Wirtanen A, et al. Targeted resequencing reveals ALK fusions in non-small cell lung carcinomas detected by FISH, immunohistochemistry, and real-time RT-PCR: a comparison of four methods[J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 757490. DOI: 10.1155/2013/757490.
- [28] Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(25): 2385-2394. DOI: 10.1056/NEJMoa1214886.
- [29] Chen G, Chen X, Zhang Y, et al. A large, single-center, real-world study of clinicopathological characteristics and treatment in advanced ALK-positive non-small-cell lung cancer [J]. *Cancer Med*, 2017, 6(5): 953-961. DOI: 10.1002/cam4.1059.
- [30] NCCN. Non-small cell lung cancer[EB/OL]. Version 9. 2017. [2017-09-28]. www.nccn.org.
- [31] Ou SH, Jänne PA, Bartlett CH, et al. Clinical benefit of continuing ALK inhibition with crizotinib beyond initial disease progression in patients with advanced ALK-positive NSCLC [J]. *Ann Oncol*, 2014, 25(2): 415-422. DOI: 10.1093/annonc/mdt572.
- [32] 吴一龙, 程颖, 周清, 等. 中国临床肿瘤学会(CSCO)原发性肺癌诊疗指南[M]. 北京: 人民卫生出版社. 2017.
- [33] Gainor JF, Tan DS, De Pas T, et al. Progression-free and overall survival in ALK-positive NSCLC patients treated with sequential Crizotinib and Ceritinib[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(12): 2745-2752. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-3009.
- [34] Watanabe S, Hayashi H, Okamoto K, et al. Progression-free and overall survival of patients with ALK rearrangement-positive non-small cell lung cancer treated sequentially with Crizotinib and Alectinib[J]. *Clin Lung Cancer*, 2016, 17(6): 528-534. DOI: 10.1016/j.cllc.2016.05.001.

(收稿日期:2017-12-18)

(本文编辑:常秀青)

## · 标准与规范 ·

# ROS1 阳性非小细胞肺癌诊断病理专家共识

中国抗癌协会病理专业委员会肺癌学组

肺癌是全球范围内发病率和病死率最高的恶性肿瘤,其中非小细胞肺癌(NSCLC)约占80%。根据国家癌症中心公布的2015年癌症统计数据显示,2015年,我国新发肺癌患者达73.33万,居所有恶性肿瘤之首<sup>[1]</sup>。近十多年来,随着分子医学的进展和靶向药物的不断涌现,NSCLC的治疗已由化疗为主进入到个体化分子靶向治疗的时代。目前美国食品药品管理局(FDA)批准的临床应用的个体化分子靶向治疗主要针对表皮生长因子(EGFR)突变型、BRAF突变型、间变性淋巴瘤激酶(ALK)融合基因型和ROS1融合基因型肺癌。其中在我国获批的靶向药物,主要针对EGFR突变型和ALK融合基因型肺癌。克唑替尼(Crizotinib)针对ROS1融合基因型肺癌的适应证在我国刚刚获批。中国抗癌协会肿瘤病理专业委员会肺癌病理专家协作组(以下简称协作组),结合多中心的实验数据和国内外已报道的研究成果,尤其是亚太地区药物临床试验,推荐适合我国国情的ROS1阳性NSCLC检出方案。

2007年Rikova等<sup>[2]</sup>在肺癌细胞系中发现了CD74-ROS1融合基因。2011年Li等<sup>[3]</sup>从202例肺腺癌非吸烟患者中检测出2例ROS1融合基因阳性患者,其类型为CD74-ROS1。2012年,Bergethon等<sup>[4]</sup>在肺癌患者中发现SLC34A2-ROS1融合,并将ROS1基因重排阳性的肺癌列为非小细胞肺癌的另一个特定分子亚型。ROS1基因重排是一种独特的受体酪氨酸激酶,与ALK同属胰岛素样受体酪氨酸激酶超家族成员,二者氨基酸序列上具有近49%的相似性,在激酶催化区的ATP结合位点同源性高达77%<sup>[5]</sup>,且在临床特征上也非常相似。ROS1融合基因在NSCLC中的阳性率为1.0%~3.4%,在EGFR、KRAS和ALK均阴性的人群中发生率达到5.7%<sup>[6]</sup>。目前发现ROS1基因重排主要发生的组织类型为腺癌,在大细胞癌和鳞状细胞癌中很少见。

DOI:10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2018.04.004

通信作者:林冬梅,100142北京大学肿瘤医院暨北京市肿瘤防治研究所病理科 恶性肿瘤发病机制及转化研究教育部重点实验室;  
Email:lindm3@163.com

ROS1基因位于6q22.1,多个伴侣基因均可与ROS1发生重排从而激活基因。迄今为止已有27种伴侣基因被确定<sup>[7-10]</sup>,其中22个基因位于第6号染色体外,包括CD74-ROS1、EZR-ROS1、SLC34A2-ROS1等。其中,最常见的融合基因亚型是CD74-ROS1,约占30%,其次是EZR-ROS1。而在NSCLC中最常见的两种融合基因亚型是CD74-ROS1和SLC34A2-ROS1,二者均是跨膜蛋白<sup>[11]</sup>。随着检测技术的不断发展与突破,可能还存在着其他未知的ROS1融合型将被发现。

目前,获批的针对ROS1靶点的小分子抑制剂为克唑替尼。2014年9月The New England Journal of Medicine发表了克唑替尼在ROS1阳性晚期NSCLC患者1期扩展临床研究结果,在该研究中,克唑替尼在ROS1阳性NSCLC总体缓解率达到72%,中位缓解持续时间为17.6个月,中位无进展生存时间为19.2个月,且ROS1融合基因的种类不影响疗效<sup>[7]</sup>。基于该项研究,2016年3月11日,FDA批准了克唑替尼用于治疗ROS1阳性的晚期NSCLC患者中的适应证,但与克唑替尼在ALK适应证中不同,FDA在ROS1适应证批准时没有批准一种伴随诊断方法。由中国专家领衔为中国ROS1适应证注册的OO-1201研究的具体结果已经在2016年美国临床肿瘤学会会议上首次公布,与PROFILE1001扩展临床研究采用荧光原位杂交(FISH)检测ROS1融合不同,OO-1201研究采用中国食品药品监督管理总局(CFDA)批准的厦门艾德生物医药科技有限公司即时荧光定量PCR(RT-PCR)检测试剂盒作为克唑替尼泛亚太国际大型临床研究的ROS1的伴随诊断方法,在克唑替尼组127例ROS1阳性NSCLC总体缓解率达到69.3%,中位无进展生存为13.4个月。因此克唑替尼在ROS1阳性的晚期NSCLC的适应证已在中国获批。

准确的分子靶标检测是NSCLC患者获取靶向治疗的前提。与ALK融合基因检测类似,目前针对ROS1融合基因的常用方法有3种:FISH、RT-PCR和免疫组织化学法。上述3种方法各有其优缺点。

FISH 方法为美国国家综合癌症网络(NCCN)指南推荐的检测 ROS1 融合基因的检测方法,但价格昂贵,操作规范要求较高,目前还没有一家公司的 FISH 获得 FDA 的批准;RT-PCR 对标本质量要求较高,需专用的试剂盒进行检测,目前国内已有多个试剂盒获 CFDA 批准;免疫组织化学简便易行,但阳性标准不统一,有一定的假阳性。由于 ROS1 融合基因型肺癌发病率低,在临床实践中,怎样有效规范地应用现有的检测体系,最大化地筛选出 ROS1 阳性的患者,是 ROS1 阳性患者获得靶向药物治疗的关键。基于这些因素,协作组结合多中心的试验数据和国内外已报道的研究成果,讨论适合我国国情的 ROS1 阳性 NSCLC 检测方法,并达成以下专家共识。

1. 推荐所有含腺癌成分的晚期非小细胞肺癌患者,应在诊断时常规进行 ROS1 融合基因检测。

2. 对于小活检标本或者不吸烟的鳞状细胞癌患者也进行 ROS1 检测。对于部分活检标本,由于临床取材小,有时无法保证肺腺癌的准确诊断,对不能判断组织学类型的肺癌也进行 ROS1 检测。

3. 结合靶向药物临床试验数据,推荐使用经过验证的技术进行 ROS1 融合基因的检测,首选 CFDA 批准的 RT-PCR 检测 ROS1 试剂盒,其次是经过验证的 FISH 检测平台。

4. 对于晚期病例的小活检标本,考虑到 NSCLC 中需要检测靶点越来越多,专家组建议 ROS1、ALK 和 EGFR 同时检测,并推荐首选经 CFDA 批准的经过认证的检测试剂盒和技术。

5. ROS1 免疫组织化学结果不能直接指导临床用药。ROS1 免疫组织化学检测结果阳性的患者,需进一步进行 RT-PCR 或 FISH 技术确认。

6. 为了避免标本浪费和节约检测时间,对于晚期 NSCLC 活检标本,建议一次性切出需要诊断组织类型和 ALK/EGFR/ROS1 检测的标本量,避免反复切片浪费标本。操作中应避免污染环节。

### 一、FISH 法进行 ROS1 融合基因检测

应用 FISH 法进行 ROS1 融合基因检测的技术原理与检测 ALK 融合是类似的,均采用分离探针试剂设计。ROS1 分离探针包括两部分,一部分识别分离点 5' 端(端粒)附近点基因序列,另一部分识别融合分离点 3' 端(着丝粒)附近点基因序列。目前,在欧盟获得认证的 FISH 试剂盒包括 Cytocell FISH 试剂盒和 Zytovision/Zytomed。然而我国还没有一款 FISH 试剂盒获得批准。ROS1 FISH 的判读标准与 ALK FISH 的判读标准类似但稍有不同,其中红、

绿信号标记的 3' 和 5' 端正好相反,即 3' 端探针通常被标记成绿色,5' 端探针标记为橘红色或红色。另外,橘红色或红色信号与绿色信号之间点物理距离大于这对信号中点最大信号直径,可判读为 ROS1 分离信号形态。因为 ROS1 酪氨酸激酶结构域由基因 3' 端部分编码,故分离信号形态和含有单一的 3' 信号形态的细胞都可归为重排阳性细胞,而含有单一 5' 信号状态的细胞不应被判读为重排阳性细胞。

很多研究报道在临床样本中使用 15% 作为 ROS1 基因 FISH 阳性的分界值,且经过 RT-PCR 检测验证,这个阈值结果能够很好地体现 ROS1 融合状态<sup>[11]</sup>,即当肿瘤重排阳性细胞比例  $\geq 15\%$  时,诊断为 ROS1 阳性。按照国际肺癌研究协会(IASLC)肺癌 ALK 和 ROS1 检测手册推荐,建议两步法进行评估,第一步:由一位技术专家或人员计数 50 个肿瘤细胞,当重排阳性细胞比例低于 10% 时(即在 50 个被计数的肿瘤细胞中重排细胞数少于 5 个),该样本被判读为 ROS1 重排阴性;而重排细胞比例大于 30% 时(即 50 个被计数的肿瘤中重排细胞数大于 15 个),判读样本为 ROS1 重排阳性。若重排阳性细胞比例在 10%~30% 之间(即 50 个肿瘤细胞中的重排细胞数为 5~15 个),则由第二位技术专家或人员再额外计数 50 个肿瘤细胞。这种情况下重排阳性细胞最终比例是将两位计数者的结果合并计算,再根据 15% 的分界值判读样本结果<sup>[10]</sup>。ROS1 FISH 技术适用的组织样本类型:3.7% 中性甲醛液固定后石蜡包埋标本,采用防脱落技术处理的玻片切片,厚度 3~5  $\mu\text{m}$ 。

FISH 检测对于操作和判读技术要求较高,诊断医师必须经过严格的 FISH 操作和结果判读培训。只有经 FISH 操作经验丰富的医师判定的结果才具有可靠性。晚期 NSCLC 患者通常只能提供 2 mm 左右的小活检组织,很难保证每个视野均存在 50 个以上的肺癌细胞进行判读。因此,对于不能满足 50 个以上的肺癌细胞的活检组织,FISH 不能有效地确定 ROS1 是否发生融合。在单纯细胞学标本中进行 ROS1 FISH 检测目前研究报道较少,个别小标本病例报道包括未染色涂片或脱色涂片,均可进行 ROS1 FISH 检测<sup>[12]</sup>。而细胞蜡块标本则和组织学标本一样,经病理评估及质控合格后可进行 ROS1 FISH 检测。

### 二、RT-PCR 技术检测 ROS1 融合基因

目前,CFDA 已经批准多个 ROS1 阳性 NSCLC 的 real-time RT-PCR 诊断试剂盒,包括厦门艾德生

生物医药科技有限公司的人类 ROS1 基因融合检测试剂盒( RT-PCR 法)和武汉友芝友科技有限公司的人类 ROS1 基因融合检测试剂盒( RT-PCR 法)。此外,厦门艾德生物医药科技有限公司的人类 ALK 基因融合和 ROS1 基因融合联合检测试剂盒和人类 EGFR/ALK/ROS1 基因突变联合检测试剂盒也获得 CFDA 的批准。虽然普通 RT-PCR 技术是直接检测基因融合状态的一种方法,但检测灵敏度低,需开盖操作,容易造成环境污染,引起假阳性。目前,对于 ROS1 PCR 检测多数采用 real-time RT-PCR 技术, real-time RT-PCR 技术是 RNA 逆转录 cDNA 和荧光定量 PCR 扩增相结合的一种技术。首先经逆转录酶和特异性引物作用下,将 RNA 逆转录成 cDNA, 再以 cDNA 为模板扩增目的片段。该技术在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程,最后通过 Ct 值对未知模板进行定性和定量分析直接检测基因融合状态的一种方法。real-time RT-PCR 技术快速灵敏,但需要高质量的 RNA 且只能对已知的融合基因类型进行检测。Cai 等<sup>[13]</sup>采用 AmoyDx-ROS1 基因融合检测试剂盒( RT-PCR 法)和 Sanger 测序方法对 392 例 NSCLC 患者样本进行检测,发现 4 例为 SLC34A2-ROS1 融合基因阳性,3 例标本为 CD74-ROS1 融合基因阳性,1 例标本为 SDC4-ROS1 融合基因阳性。开展基于 PCR 技术检测 ROS1 融合变异的实验室,其环境要求应能保证检测质量,PCR 实验室需符合我国卫生计生委临床检测中心的临检 PCR 室资格认证条件。各检测实验室应做好室内质控,并积极参与外部质控评价项目。ROS1 RT-PCR 检测技术适用的组织标本类型:经过质控的所有组织标本类型及细胞学标本。

### 三、免疫组织化学法检测 ROS1 融合蛋白

目前全球范围尚无法规批准可用于临床的 ROS1 免疫组织化学检测试剂盒。ROS1 免疫组织化学检测起步较晚,抗体的灵敏度和特异度与 ALK 检测抗体 D5F3 相比在我国还存在一定的差距。Ventana ALK 免疫组织化学已经成为 ALK 阳性 NSCLC 的首选检测方法。Ventana ALK 免疫组织化学具有操作简便、检测准确度较高、相对于其他诊断方法价格便宜等优势,已经在我国大规模普及用于 ALK 融合基因的检测。由于 ROS1 融合基因和 ALK 有很多相似的特征,在 ROS1 融合基因免疫组织化学方面进行了大量的探索。目前使用 Ventana 的放大技术进行 ROS1 融合蛋白的检测存在一定的假阳

性。在 NSCLC 患者中,目前可以用于 ROS1 融合基因筛选的抗体主要为 D4D6( Cell Signaling Tech 公司),检测 ROS1 融合蛋白的灵敏度和特异度分别达到了 100% 和 85%~100%<sup>[11]</sup>,免疫组织化学检测的强阳性与 RT-PCR/FISH 检测阳性之间存在高度的一致性,但中度阳性及弱阳性与 RT-PCR/FISH 检测阳性之间一致性较差<sup>[14]</sup>。而使用常规免疫组织化学进行 ROS1 免疫组织化学检测,操作方法、判读标准也不统一,导致各检测中心的检测结果存在较大的波动性。结合多中心的实验数据和国内外已报道的研究成果,对常规免疫组织化学检测 ROS1 融合基因的一些关键点讨论,达成如下共识。

**1.抗原修复:**目前手工免疫组织化学常用的抗原修复方法主要有高温高压修复和微波修复方法两种,使用的修复液以弱酸性和碱性修复液为主。专家组对国内外研究文献和国内常用修复方法进行讨论,建议使用煮沸热修复方法,具体可以采用如下方法之一对抗原进行修复:(1)0.01 mol/L 柠檬酸缓冲液(pH 6.0)修复 10 min;(2)EDTA 缓冲液(pH 8.0)修复 5 min;(3)EDTA 缓冲液(pH 9.0)修复 3 min。修复维持时间和冷却方式各实验室可以根据各自成熟的方法酌情使用。

**2.过氧化物酶灭活:**建议使用 3% 过氧化氢室温孵育 10 min 以灭活内源性过氧化物酶。

**3.抗体:**建议使用 D4D6 抗体用于 ROS1 的免疫组织化学,抗体稀释度为:1:(100~250)稀释(具体的抗体稀释度,可以根据各批次抗体的预实验结果确定)。抗体常温孵育 1 h,或者 4 ℃ 过夜。抗体孵育后使用 pH 7.4 磷酸缓冲液洗涤 3 次,每次 5 min 以确保充分洗涤,始终保持切片潮湿。

**4.对照:**建议每批次检测设立阳性对照、阴性对照和空白对照。有条件的单位最好采用一对一的阳性对照。阳性对照可采用已被 FISH 证实 ROS1 阳性,且免疫组织化学 3+ 的 NSCLC 组织;阴性对照,被检测切片上癌旁组织中正常的肺组织是很好的阴性内对照;以磷酸缓冲液代替一抗,作为空白对照。

**5.结果判读和评分:**(1)观察程序:先在低倍镜下观察整张切片,判断染色是否满意。然后在较高倍数下观察着色部位。观察胞质着色癌细胞的比例和着色强度。(2)结果判读:关于 ROS1 染色结果的判读,多数研究采用 0 到 3+ 的评分系统,但具体的判读细则还未统一。(3)判读标准:考虑到 ROS1 染色的模式存在多种方式,综合国内外的研究结果和专家组的经验,专家组建议采用已有文献研究结果,

且在国内多家机构使用,检测结果确诊比较高的判读标准。具体如下:IHC 3+:>10%的肿瘤细胞呈现深棕色强着色;IHC 2+:>10%的肿瘤细胞呈现棕色着色;IHC 1+:>10%的肿瘤细胞呈现微弱棕色着色,且无任何背景染色;IHC 0:肿瘤细胞无明显着色或≤10%微弱棕色着色。

**6. 结果验证:**对于免疫组织化学 1+以上的患者,建议使用 RT-PCR 或者 FISH 进行 ROS1 融合基因的确诊。

免疫组织化学判读和评分时需要注意,在肺泡上皮细胞、破骨巨细胞等细胞中会观察到一些强的染色,这种染色在 ROS1 判读时应注意排除。

目前,关于二代测序(NGS)检测样本及检测平台的质控、数据的解析等一系列问题还没有明确的规范,国内尚无一款获批的基于 NGS 的肿瘤靶向治疗检测试剂盒。另外,利用血液样本进行 ROS1 基因检测也无肯定的数据依据。因此,在临床常规检测中,暂不推荐利用血检或 NGS 等进行 ROS1 基因融合靶向治疗检测。

ROS1 融合基因作为晚期 NSCLC 中另一个明确的分子分型,其检测的标准化非常重要。本共识是病理专家结合我国临床检测的实际情况,参考中国临床肿瘤学会肿瘤标志委员会推荐,提出 ROS1 规范化检测和诊断流程,即推荐优先使用获批的 RT-PCR 试剂盒,其次是 FISH 检测(也需获得 CFDA 批准);对于 ROS1 免疫组织化学,研究证实 D4D6 抗体(Cell Signaling Tech 公司)具有较高的灵敏度,但特异度有待提高。因此,对于免疫组织化学检测 ROS1 阳性的标本必须采用 RT-PCR 或 FISH 方法进行验证确诊。本专家共识将依据检测进展情况定期更新,希望为优化 ROS1 筛查及规范检测提供指导。

**专家组成员(按单位名称汉语拼音字母顺序排列):**北京大学医学部病理学系/北京大学第三医院病理科(朱翔);北京大学肿瘤医院病理科(林冬梅);北京医院病理科(王征);福建省肿瘤医院病理科(陈刚);复旦大学附属中山医院病理科(纪元);复旦大学附属肿瘤医院病理科(李媛);广东省人民医院病理医学部(颜黎栩);哈尔滨医科大学附属肿瘤医院病理科(耿敬姝);河北医科大学第二医院病理科(吴文新);河北医科大学第四医院病理科(刘月平);河南省人民医院病理科(孔令非);华中科技大学附属协和医院病理科(聂秀);吉林省肿瘤医院病理科(郝彦勇);解放军南京总医院病理科(沈勤);解放军总医院病理科(高杰);空军军医大学西京医院病理科(闫庆国);南方医科大学南方医院病理科(林洁);山东省千佛山医院病理科(孙青);山西省肿瘤医院病理科(郗彦凤);上海交通

大学附属胸科医院病理科(朱蕾);四川大学华西医院病理科(王威亚);四川大学华西医院病理研究室(张立);天津医科大学附属肿瘤医院病理科(孙蕾娜);武汉大学人民医院病理科(袁静萍);西安交通大学第一附属医院病理科(宫惠琳);浙江省肿瘤医院病理科(吴伟);中国医科大学附属盛京医院病理科(杨向红);中国医学科学院北京协和医学院北京协和医院病理科(冯瑞娥);中山大学附属肿瘤医院(林素暇)

## 参 考 文 献

- [1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66 (2):115-132. DOI: 10.3322/caac.21338.
- [2] Rikova K, Guo A, Zeng Q, et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer [J]. Cell, 2007, 131 (6):1190-1203. DOI: 10.1016/j.cell.2007.11.025.
- [3] Li C, Fang R, Sun Y, et al. Spectrum of oncogenic driver mutations in lung adenocarcinomas from East Asian never smokers [J]. PLoS One, 2011, 6 (11):e28204. DOI: 10.1371/journal.pone.0028204.
- [4] Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers [J]. J Clin Oncol, 2012, 30 (8):863-870. DOI: 10.1200/JCO.2011.35.6345.
- [5] Ou SH, Tan J, Yen Y, et al. ROS1 as a ‘druggable’ receptor tyrosine kinase: lessons learned from inhibiting the ALK pathway [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2012, 12 (4):447-456. DOI: 10.1586/era.12.17.
- [6] Kim HR, Lim SM, Kim HJ, et al. The frequency and impact of ROS1 rearrangement on clinical outcomes in never smokers with lung adenocarcinoma [J]. Ann Oncol, 2013, 24 (9):2364-2370. DOI: 10.1093/annonc/mdt220.
- [7] Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer [J]. N Engl J Med, 2014, 371 (21):1963-1971. DOI: 10.1056/NEJMoa1406766.
- [8] Arai Y, Totoki Y, Takahashi H, et al. Mouse model for ROS1-rearranged lung cancer [J]. PLoS One, 2013, 8 (2):e56010. DOI: 10.1371/journal.pone.0056010.
- [9] Yoshida A, Kohno T, Tsuta K, et al. ROS1-rearranged lung cancer: a clinicopathologic and molecular study of 15 surgical cases [J]. Am J Surg Pathol, 2013, 37 (4):554-562. DOI: 10.1097/PAS.0b013e3182758fe6.
- [10] Tsao MS, Hirsch FR, Yatabe Y. IASLC atlas of ALK and ROS1 testing in lung cancer [M]. Aurora: IASLC Press, 2016.
- [11] Bubendorf L, Büttner R, Al-Dayel F, et al. Testing for ROS1 in non-small cell lung cancer: a review with recommendations [J]. Virchows Arch, 2016, 469 (5):489-503. DOI: 10.1007/s00428-016-2000-3.
- [12] Bozzetti C, Nizzoli R, Tiseo M, et al. ALK and ROS1 rearrangements tested by fluorescence in situ hybridization in cytological smears from advanced non-small cell lung cancer patients [J]. Diagn Cytopathol, 2015, 43 (11):941-946. DOI: 10.1002/dc.23318.
- [13] Cai W, Li X, Su C, et al. ROS1 fusions in Chinese patients with non-small-cell lung cancer [J]. Ann Oncol, 2013, 24 (7):1822-1827. DOI: 10.1093/annonc/mdt071.
- [14] Shan L, Lian F, Guo L, et al. Detection of ROS1 gene rearrangement in lung adenocarcinoma: comparison of IHC, FISH and real-time RT-PCR [J]. PLoS One, 2015, 10 (3):e0120422. DOI: 10.1371/journal.pone.0120422.

(收稿日期:2017-12-18)

(本文编辑:常秀青)

## ·共识与指南·

# 中国非小细胞肺癌 RET 基因融合临床检测专家共识

中国抗癌协会肿瘤病理专业委员会分子病理协作组 中华医学会病理学分会分子病理学组 国家病理质控中心

执笔人:马杰(郑州大学附属肿瘤医院临床病理中心分子病理科 450003);李研(国家癌症中心 国家肿瘤临床医学研究中心 中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院病理科 100021)

通信作者:应建明(国家癌症中心 国家肿瘤临床医学研究中心 中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院病理科 100021, Email: jmying@cicams.ac.cn);周晓燕(复旦大学附属肿瘤医院病理科 200032, Email: xyzhou100@163.com);梁智勇(中国医学科学院北京协和医学院北京协和医院病理科 100730, Email: liangzhiyong1220@yahoo.com)

**【摘要】** 我国非小细胞肺癌患者中 RET 基因融合的发生率占 1.4%~2.5%。目前国内外已有针对 RET 基因融合的靶向药物获批上市,疗效显著。准确检测 RET 基因融合是实施 RET 抑制剂治疗的前提。然而,相对于常见的 EGFR、ALK 基因变异的检测,我国 RET 基因融合检测起步较晚,临床检测尚需进一步规范。本编写组在组织国内多中心研究的基础上,结合临床实践经验、文献阅读并组织专家讨论,制定了本共识,以期指导对临床 RET 基因融合检测的实践。

## Expert consensus on clinical practice of RET fusion detection in non-small cell lung cancer in China

Molecular Pathology Collaboration Group of Tumor Pathology Committee of Chinese Anti-Cancer Association, Molecular Pathology Group of Chinese Society of Pathology, Pathology Quality Control Center

Corresponding author: Ying Jianming (Department of Pathology, National Cancer Center/National Clinical Research Center for Cancer/Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100021, China, Email: jmying@cicams.ac.cn); Zhou Xiaoyan (Department of Pathology, Fudan University Shanghai Cancer Center, Shanghai 200032, China Email: xyzhou100@163.com); Liang Zhiyong (Department of Pathology, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100730, China, Email: liangzhiyong1220@yahoo.com)

肺癌是我国最常见的恶性肿瘤之一。根据国家癌症中心发布的数据显示,我国的肺癌发病率和病死率均居所有恶性肿瘤之首<sup>[1]</sup>。近十余年来,靶向药物治疗极大地延长了晚期非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)的生存期,提

高了患者生活质量。除常见基因变异(如 EGFR、ALK 等),越来越多的罕见基因变异(如 ROS1、RET、MET、NTRKs、FGFRs、NRGs 等)被发现。针对这些罕见基因变异的靶向药物也逐渐上市应用于临床,并表现出显著的疗效。近期,RET 抑制剂普

DOI: 10.3760/cma.j.cn112151-20210411-00273

收稿日期 2021-04-11 本文编辑 王世贤

引用本文:中国抗癌协会肿瘤病理专业委员会分子病理协作组,中华医学会病理学分会分子病理学组,国家病理质控中心. 中国非小细胞肺癌 RET 基因融合临床检测专家共识[J]. 中华病理学杂志, 2021, 50(6): 583-591. DOI: 10.3760/cma.j.cn112151-20210411-00273.



拉替尼(pralsetinib)首先被国家药品监督管理局(NMPA)批准用于既往接受过铂类化疗的有RET基因融合的局部晚期或转移性NSCLC患者的治疗。其他RET抑制剂还包括塞尔帕替尼(selpercatinib)等。目前我国已制定了针对NSCLC中EGFR、ALK、ROS1基因变异检测的专家共识及指南。相对于EGFR、ALK常见基因变异的检测,我国RET检测起步较晚<sup>[2]</sup>,随着检测技术的不断涌现及RET抑制剂靶向药物的获批,规范地检测出携带有RET基因融合的NSCLC患者便成了分子病理检测的当务之急。大规模回顾性研究数据表明,中国肺癌患者中RET融合的发生率为1.4%~2.5%<sup>[3-4]</sup>。然而,目前我国临床RET基因融合检测尚缺乏指导性专家共识或指南。本文针对不同检测人群、检测标本、恰当的检测方法的选择进行了阐述,并制定、优化了检测流程,以期指导临床检测获得准确的结果,使患者得到最大限度的获益。

### 一、RET基因变异形式及致病机制

RET原癌基因位于第10号染色体长臂(10q11.21),编码一种具有酪氨酸激酶活性的单次跨膜糖蛋白受体,作用于神经胶质细胞胞外信号分子,该类分子隶属神经营养因子家族<sup>[5]</sup>。RET激酶受体可通过细胞内酪氨酸残基的自磷酸化激活,触发包括RAS-MARK、PI3K-AKT、JAK-STAT、PLC $\gamma$ 等与细胞增殖及存活相关的信号通路。大量研究认为多种肿瘤的发生发展与RET基因异常激活密切相关,主要包括两种改变形式:RET基因点突变及RET基因融合。RET基因点突变常发生于甲状腺髓样癌(MTC),最常见的突变位点是M918T。RET基因融合变异常见于甲状腺乳头状癌(PTC)、NSCLC,亦可见于结直肠癌、唾液腺癌、卵巢癌等其他多种癌种中<sup>[6-12]</sup>。RET基因融合具有驱动肿瘤发生、发展的作用。本共识专注于肺癌RET基因融合检测。

RET原癌基因发生融合的分子机制类似于ALK融合,主要通过本身断裂与其他基因接合的方式发生重组,形成一个含有RET基因C端与另一基因N端的新的融合基因<sup>[13]</sup>。RET基因断裂位点常常发生在第11号内含子,其3'端残基含有酪氨酸活化结构域。而RET基因的融合伴侣基因断点较多,其5'端残基含有螺旋折叠二聚体结合域。基因融合发生时5'端残基反转并移位,在胞质内形成融合基因序列。由于伴侣基因失去泛素化降解,使RET基因酪氨酸活化结构域变构,暴露磷酸化位点

引起RET活化,从而增强信号转导功能,导致肿瘤发生<sup>[14]</sup>。除此之外,RET激酶持续活化能使肿瘤细胞分泌趋化因子、细胞因子,对肿瘤转移、炎性微环境及内分泌抵抗具有一定作用。RET融合基因及其产生的融合蛋白为体外检测提供了靶标,同时为靶向药物的研发提供了靶点。

### 二、RET基因融合检测意义

尽管RET基因融合在NSCLC中发生率仅为1.4%~2.5%,但以我国每年的NSCLC患者基数估算,中国每年新发RET阳性肺癌患者约上万人。RET基因最常见的断裂位点位于第11号内含子,部分融合断点位于第11号外显子和第10号内含子,至今已发现至少50余种RET融合变体。基于国内多中心研究成果,非小细胞肺癌中KIF5B-RET为最常见的RET融合亚型,约占所有RET融合的68.3%,其最常见断裂位点为K15: R12及K16: R12;其次为CCDC6-RET(16.8%,常见断点C1: R12)及NCOA4-RET(1.2%)。对于未接受过靶向治疗的人群,RET融合通常与EGFR、ALK、ROS1、BRAF和METex14跳跃等驱动基因变异相排斥;但是有研究表明,靶向治疗(如EGFR抑制剂治疗、ALK抑制剂治疗)耐药后RET基因融合可作为耐药机制存在<sup>[15-16]</sup>。

在晚期肺癌患者中检测RET基因融合状态可以指导靶向用药。两款高选择性RET抑制剂普拉替尼(pralsetinib)和塞尔帕替尼(selpercatinib)因在晚期RET基因融合阳性NSCLC中显示出良好的抗肿瘤活性和安全性,已获得美国FDA批准用于转移性RET基因融合阳性NSCLC,2021年3月普拉替尼胶囊已获得国家药品监督管理局(NMPA)批准,用于治疗经含铂类化疗的RET融合阳性的局部晚期或转移性NSCLC成人患者。在我国批准用于临床的普拉替尼是一种强效、高选择性的RET激酶抑制剂,通过抑制RET/SHC/ERK1/ERK2蛋白磷酸化,抑制MAPK信号通路,从而抑制肿瘤细胞的增殖,达到抗肿瘤的作用<sup>[8]</sup>。在ARROW I/II研究中,普拉替尼在RET融合阳性的NSCLC患者中客观缓解率(ORR)达63%,完全缓解达6%;中国亚组数据显示,普拉替尼在经铂类治疗失败后的患者中ORR达56%,疾病控制率(DCR)达97%,其中半数的患者经历了≥3线的系统治疗<sup>[17]</sup>。另外,其他几种选择性RET抑制剂正在研发中,包括TPX-0046,它是一种RET和SRC的大环抑制剂,在临床前研究中证实对RET溶剂前沿突变引起的耐药有效<sup>[18]</sup>。

有研究结果发现,NSCLC 术后患者中,与 EGFR 阳性患者相比,RET 融合患者无复发生存期更短(20.9 个月比 28.4 个月),约 50% 的患者分期更晚(ⅢA 期)<sup>[19]</sup>,因此 RET 基因检测可以指导手术患者预后。对于晚期不可手术的 RET 融合 NSCLC 患者,目前在国内的标准一线治疗方案为含铂化疗,无进展生存期(PFS)为 5~9 个月,RET 融合的患者对免疫治疗获益有限<sup>[20-23]</sup>。此外,有研究表明,不同的 RET 融合类型对 RET 抑制剂的疗效亦有差异,在接受 RET 抑制剂治疗后 CCDC6-RET 患者总生存期显著优于 KIF5B-RET 患者<sup>[24]</sup>。

目前,RET 基因融合检测标准和推荐方法还无定论,NCCN 指南推荐 NSCLC 患者进行包括 RET 融合基因在内的更广泛的基因变异谱检测,以鉴别有可及药物的罕见驱动基因变异,或就临床试验的可能性向患者提供适当的建议。中国临床肿瘤学会(CSCO)NSCLC 诊疗指南(2020)推荐通过二代测序确定包括 RET 基因融合在内的具有临床意义的目标靶点(2B 类证据)。由于 RET 基因融合也是 EGFR 激酶抑制剂及 ALK 激酶抑制剂(TKI)获得性耐药机制之一<sup>[15-16]</sup>,RET 基因融合的检测对于 EGFR-TKI 及 ALK-TKI 耐药患者的预后及耐药后治疗也有指导意义。

### 三、RET 基因融合检测适用人群

1. 强烈推荐所有经病理诊断为肺腺癌(包括含腺癌成分的 NSCLC)的晚期患者进行 RET 基因检测。对于晚期 NSCLC 患者,RET 基因融合检测能够有效筛选 RET 抑制剂获益人群。

2. 推荐经活检组织病理学证实为非腺癌的晚期 NSCLC 患者进行 RET 基因检测。部分活检为鳞状细胞癌的患者,经术后病理证实存在肺腺癌成分;其他非腺非鳞 NSCLC 也可存在 RET 基因融合。因此,本共识推荐经活检组织病理学证实为非腺癌的晚期 NSCLC 患者进行 RET 基因检测,以期使这部分患者获得更多治疗方案的选择。

3. 推荐 EGFR-TKI 及 ALK-TKI 耐药患者进行 RET 基因融合检测。已有文献报道,对于 EGFR-TKI 及 ALK-TKI 用药人群,RET 基因融合可作为耐药机制存在。因此,本共识推荐对于曾接受过 EGFR-TKI 及 ALK-TKI 治疗的患者,耐药后无论之前是否进行过 RET 基因融合检测,除进行常见耐药机制(如 T790M 等)检测外,应考虑通过二代测序技术检测包括 RET 融合在内的耐药靶点,以期使这部分患者明确耐药机制,为后续治疗方案的选择提

供依据。

4. 推荐术后明确为浸润性腺癌的患者,除检测常见驱动基因变异(EGFR、ALK)外,应考虑检测包括 RET 基因融合在内其他罕见基因变异。有研究表明,RET 基因融合与手术患者预后相关。实验室平台可及时推荐 RET 与 EGFR、ALK、ROS1 等同时行多基因检测。

### 四、常见送检标本类型

1. 肿瘤组织样本。病理医师需要对组织病理切片进行评估,包括有无出血、坏死和不利于核酸检测的前处理(例如强酸脱钙处理),肿瘤细胞的总量和比例。组织标本中肿瘤细胞含量建议达到 20% 以上,低于此标准可富集后检测。肿瘤组织样本若保存时间过长或者未经规范化前处理,可能会影响检测结果。若肿瘤组织需要进行脱钙处理,推荐使用 EDTA 为基础的脱钙液以保证核酸的保存及质量。

2. 细胞学样本。包括胸腹积液、支气管刷检、支气管内超声引导细针穿刺活检(EBUS FNA)样本、痰、肺泡灌洗液等。此种样本进行基因检测结果同样有效,是晚期肺癌患者较为常用的检测样本类型。但此种样本往往量少,需要评估样本中的肿瘤细胞含量及比例,评估满足检测要求后方可进行基因检测。

3. 液体活检。对于不能获得组织或细胞学样本的晚期肺癌患者,可采用血液、胸腹积液上清、脑脊液上清等进行基因检测,但存在一定的假阴性率。晚期 NSCLC 患者的血液中存在循环肿瘤 DNA(ctDNA),其血浆中 ctDNA 有相对更高的检出率。推荐使用含有游离 DNA 保护剂及防细胞裂解保护剂的专用采血管收集血浆。若使用常规 EDTA 抗凝管,应在血液离体后 2 h 内及时进行血浆分离冻存或提取。严禁使用肝素抗凝管采集的血液进行 ctDNA 检测。对于部分晚期发生脑膜转移的 NSCLC 患者,脑脊液上清对颅内肿瘤的 ctDNA 具有富集作用,可通过腰椎穿刺获取脑脊液上清提取 ctDNA 并进行相关基因检测。与肿瘤组织和细胞学样本相比,血液和脑脊液中的 ctDNA 含量较低,应选择高灵敏度的二代测序方法,其基因结果具有较高的特异度,但灵敏度较差。因此液体活检为无法获得组织/细胞学样本时的补充检测,具有一定假阴性,若液体活检未检测到相关变异,可考虑再取组织或细胞学样本进行检测。

### 五、常用 RET 基因融合检测方法(表 1)及判读

表 1 非小细胞肺癌 RET 基因融合检测常见方法比较及推荐级别

检测方法	适用范围	适用样本	灵敏度	特异度	伴侣基因检测	检测周期(d)	主要优缺点	推荐级别
IHC	检测蛋白表达	组织样本(FFPE),组织量要求低	中	中	否	1~2	检测平台可及性高,廉价、快捷,但抗体可及性差,存在一定的假阴性和假阳性	不推荐
FISH	检测基因易位	组织样本、细胞学样本,样本量要求低	高	高	否/是 <sup>1</sup>	2~3	基因易位检测的“金标准”,但性价比差,罕见变异类型存在假阴性	推荐
RT-PCR	检测已知融合 mRNA	组织样本、细胞学样本,样本质量要求高	高 <sup>2</sup>	高	是/否 <sup>2</sup>	2~3	检测平台较普遍,检测周期相对快,但不能检测罕见变异类型	强烈推荐
基于DNA的二代测序	同时检测多个基因的多种已知或未知变异类型	组织样本、细胞学样本、体液样本,样本质量要求高	高	高	是/否 <sup>3</sup>	5~7	高通量检测(基因数量和变异类型),灵敏度及特异度高,但与产品探针设计覆盖度及生物信息分析能力有关	强烈推荐
基于RNA的二代测序	可同时检测多种融合基因	组织样本、细胞学样本,样本量要求最高	高 <sup>4</sup>	高	是/否 <sup>5</sup>	5~7	高通量检测(融合基因),特异度最高,灵敏度与产品覆盖度有关	推荐

注:IHC:免疫组织化学,FISH:荧光原位杂交,RT-PCR:即时荧光聚合酶链反应;<sup>1</sup>使用特异融合伴侣的探针时;<sup>2</sup>无法检测引物未覆盖的罕见融合伴侣;<sup>3</sup>无法检测断裂区未覆盖的罕见融合伴侣;<sup>4</sup>与产品设计有关;<sup>5</sup>扩增子建库时无法检测引物未覆盖的罕见融合伴侣

## 标准

目前常见的分子病理检测方法包括免疫组织化学(IHC)、荧光原位杂交(FISH)、即时荧光聚合酶链式反应(RT-PCR)、二代测序技术等。其他技术平台,如数字 PCR、Nanostring 等也逐渐成熟,有待进入临床应用积累更多的临床实践经验。所有分子病理检测方法均具有优缺点,也受所检基因变异类型和数量、标本类型、标本数量和质量、实验室条件等影响。必要时需行多平台检测互补和验证<sup>[25]</sup>。

以上五种方法基本可分为三类:基于蛋白表达的检测,基于组织/细胞学样本核酸(DNA 或 RNA)的检测,及基于体液游离肿瘤 DNA 的检测。以下详细阐述各方法的优势及局限性。

1. 基于蛋白的 RET 基因融合检测:免疫组织化学主要是利用抗原-抗体特异性结合的原理,通过化学反应使标记抗体的显色剂显色来确定组织细胞内抗原(多肽和蛋白质),对其进行定位、定性及相对定量的检测技术。在临床病理诊断中广泛应用。最新研究表明 IHC 检测 RET 融合其灵敏度 50%~100%,特异度 30%~90%,综合评价灵敏度和特异度,IHC 不是作为 RET 诊断的最佳手段。另外,RET 融合蛋白的表达均位于胞质中,少见胞膜表达,因此 IHC 判读较为困难。并且,在实际操作过程中,存在抗体克隆选择多样、参照标准选择不明确、阳性阈值不确定等问题,且病理报告解读也是制约 IHC 检测在临床应用的因素。此外,通过 IHC 检测确定 RET 表达量指导临床靶向治疗疗效也存在偏差,有报道证实存在 RET 无表达的患者使

用 RET 抑制剂有效的现象<sup>[19]</sup>。因此,参考其他指南,目前暂不推荐直接用 IHC 检测 RET 基因融合表达。特异性抗体选择和 IHC 标准化流程制定是推动免疫组织化学技术在 RET 融合基因检测应用的关键。

2. 基于肿瘤组织或细胞 DNA/RNA 的 RET 基因融合检测:(1)FISH 检测:FISH 技术利用荧光标记的特异核酸探针与细胞内相应的靶 DNA 分子杂交,通过观察荧光信号,来确定目的基因分离或融合状态,是检测基因易位/融合的“金标准”。FISH 检测技术对肿瘤细胞的含量要求较低(样本中存在 50 个以上的肿瘤细胞即可进行判读),但是在检测 RET 融合时也存在以下几点限制:首先 FISH 检测不能提供关于融合伴侣基因的充分信息<sup>[24, 26]</sup>,需进一步明确定义阳性结果的临界值(cut-off 值);其次,FISH 检测对于操作和判读要求相对较高,需有经验丰富的医师判定结果;再者,有文献报道 FISH 是一种敏感但是非特异的 RET 融合检测方法,对于发生了 RET 基因重排但未产生实质性基因融合的病例,FISH 可能会出现假阳性的情况,因此对于非典型的 FISH 结果(如单色、伴有信号扩增等),建议使用 RT-PCR 或 RNA NGS 进行进一步验证<sup>[27]</sup>。除上述因素外,FISH 检测经典 RET 融合(KIF5B-RET, CCDC6-RET)的灵敏度最高,分别为 100% 和 95%,其他非经典融合如 NCOA4-RET 灵敏度仅为 66.7%<sup>[28]</sup>。这些因素检测时均应引起关注。综上所述,推荐在 NGS 或 RT-PCR 不可及的情况下使用 FISH 进行检测,或样本量较少或质量不佳时,首选 FISH 检测。若遇非经典分离/融合信号或位

于判断阳性阈值交界时,应用其他检测方法进行验证。(2)NGS高通量测序:NGS根据检测基因分子的类型不同分为基于DNA水平和RNA水平进行检测RET基因融合。①DNA-NGS:通过捕获平台在DNA水平能够检测到包括已知和未知位点在内的所有RET基因易位,但是其准确性会受捕获探针的覆盖度、标本DNA质量,以及生物信息学分析等关键因素影响<sup>[29]</sup>。且DNA水平检测到部分罕见融合断裂位点可能并不能代表RNA水平的融合位点,在极少数情况下,DNA水平上检测到的基因易位并不会引起融合基因的表达。目前文献报道灵敏度为87.2%~100%,特异度为98.1%~100%。因此,基于DNA的靶向测序分析通常辅以RNA测序方法验证,在临床应用前明确其灵敏度和特异度。②RNA-NGS:通过扩增子平台在RNA水平上进行检测,仅需要极少量的RNA就能检测到RET融合基因表达,但是检测范围一般仅局限于特定的常见融合类型,罕见融合可能会漏检。此外,RNA水平检测对样本质量要求较高,保存时间较长导致RNA降解、FFPE组织在制作过程中导致RNA交联无法完整提取等情况都对结果产生较大影响,高度降解或者交联的RNA因片段太短而不能提供完整的基因信息,并且会妨碍文库构建和测序<sup>[30-31]</sup>。基于捕获的文库构建能检测所有基因融合变异,但同样受到临床样本质量的限制。NGS能有效鉴定出FISH不能明确诊断的RET阳性肺癌患者。除了检测灵敏度比较高外,NGS还可以同时检测多个其他靶点。这样既节约了标本,也节省了患者等待检测结果的时间,对于突变频率不高的靶点,重要性显著提高。基于这些优势,NCCN肺癌指南从2014年第3版开始,推荐使用NGS同时检测ALK、ROS、RET融合。在检测多基因的时候也需要考虑组织标本的量。小活检标本应优化检测流程,合理设计检测项目和方法,避免二次活检<sup>[32-35]</sup>。(3)RT-PCR:RT-PCR法检测RET融合基因的特点在于快速、简便易行、能同时明确RET已知的融合变体的类型,但因为RT-PCR只能检测已知RET融合基因类型,所以存在假阴性可能,在临床应用中可能会低估RET融合发生率<sup>[36]</sup>。因涉及基于mRNA的PCR扩增,其对于检测环境和标本质量都有比较高的要求,因此开展基于PCR技术检测RET融合变异的实验室环境要求较高,应强化内、外部质控,避免污染。对于Ct值在阈值范围附近的患者,在进行结果判读时需要谨慎对待,需结合标本质量、肿瘤细

胞含量、质控情况等综合分析。必要时使用其他技术平台进行进一步复检。该方法适用于中性甲醛溶液固定石蜡包埋的肿瘤组织标本和各类新鲜组织或细胞学标本<sup>[37]</sup>。(4)NanoString技术:数字化基因分析系统是最新的多重基因定量检测技术。该技术可直接检测条形码探针标记的单个mRNA转录子,并通过数字计数进行定量。它仅需100 ng的RNA即可对逾800个特异的mRNA转录子进行准确的定量。有文章报道NanoString和FISH检测在检测肺癌ALK、ROS、RET基因融合方面一致性可高达100%。技术准确性层面NanoString应用于临床检测具有可行性。NanoString技术平台自动化程度非常高,通过机器就可以直接读数,并且单次反应能够同时检测800多条序列,高通量检测可以大大节约临床标本,针对单个基因的检测成本也大大降低。但是目前国内由于设备未能普及,另外还有融合探针的合成、试剂性能验证、NMPA批准等因素,短期内应用于临床尚不现实<sup>[38]</sup>。

3. 基于液体活检标本ctDNA的RET基因融合检测:液体活检标本(包括血液、胸腹积液、脑脊液等)中存在游离DNA(cell-free DNA, cfDNA),其中携带肿瘤特有变异信息的为ctDNA。目前ctDNA被NMPA推荐用于晚期NSCLC中血EGFR等多项基因检测。由于ctDNA在肿瘤患者体内的含量很低,约占整体cfDNA的1%,半衰期短,约为2 h。因此需要灵敏度高的检测技术,并且可能存在假阴性。多项研究证实使用ctDNA检测RET融合可行<sup>[39]</sup>,但存在局限性。有报道认为转移性NSCLC在初始发病或疾病进展时检出率较高,RET融合在ctDNA中的含量随肿瘤负荷和治疗过程变化而变化;经典KIF5B-RET、CCDC6-RET融合均可用NGS-DNA检出,但在大多数情况下,RET融合探针的覆盖度有限<sup>[40-41]</sup>,因此在用外周血检测RET融合时,必须考虑到这些检测的局限性,当出现阴性结果时,应在报告中注明假阴性的可能性。

## 六、RET基因融合检测流程及注意事项

1. RET基因融合临床检测流程推荐:在临床实践中,多种检测方式已应用于检测RET基因融合,但灵敏度和特异度不同,各具有优缺点。检测医师应根据送检标本的类型、数量及质量、所检基因变异类型和数量,以及实验室条件等合理选择检测方式,必要时行多平台检测互补和验证。依据文献及真实实践,专家组推荐下列流程,以有效筛选出RET基因融合的患者(图1)。对于组织、细胞学标

本可获取的非小细胞肺癌患者,依据实验室条件,推荐包含 RET 在内的多基因 DNA-NGS 检测,对于检出的复杂融合形式或罕见配体,建议通过 RNA-NGS/RT-PCR 进行验证。对于包括 RET 基因融合在内的驱动基因均阴性时,建议进行 RNA-NGS 检测。如果 NGS 平台不可及,或者已接受过 EGFR、ALK、ROS1 检测为阴性的 NSCLC 患者,需要进行 RET 基因单独检测时,依据实验室平台的适用性、成本和(或)肿瘤细胞的数量,选择 FISH 或 RT-PCR 检测;如果检测结果为阴性或判读模糊,建议使用 NGS 验证。对于少数晚期非小细胞肺癌患者无法获得组织学或细胞学样本的,专家共识建议尝试使用液体活检标本(血液、胸腔积液、脑脊液等)进行 NGS 检测。如果液体活检未检测到 RET 基因融合及其他驱动基因变异,仍然需要进行肿瘤组织检测,以排除 RET 融合假阴性的可能性。

**2.RET 基因融合临床检测注意事项:**(1)组织样本或者细胞学样本在 RET 基因融合检测前均需要由专业的病理医师进行肿瘤细胞含量评估,并根据样本类型、肿瘤细胞含量、样本质量合理选择检测方式。血液 ctDNA 可用于组织或者细胞学样本不可及的补充检材,但临床使用时需向患者阐明其假阴性可能。(2)为了避免样本浪费和节约检测时间,对于晚期非小细胞肺癌活检样本,建议一次性切出需要病理诊断和分子诊断的样本量,以保证基因检测的可行性。对于晚期初诊或者靶向治疗耐药后再次活检的患者,需要联合检测其他驱动基因变异或者检测可能的多种耐药机制时,建议患者使用高通量多基因检测方法,以保证使用有限的样本获得更多基因变异状态,选取最佳治疗策略,避免由于标本缺乏导致患者二次活检。(3)RET 融合在 NSCLC 中突变率 1.4%~2.5%,临床应用时应考虑效率和成本。RET 基因融合检测需做好室内外质控,并建立有效的临床病理沟通机制<sup>[42]</sup>。

中国非小细胞肺癌 RET 基因融合检测专家共识要点见表 2。

**免责声明** 本文中公布的临床实践专家共识内容由专家组成员依据现有医学证据及实践经验共同讨论形成,以帮助相关人员进行非小细胞肺癌 RET 基因融合检测或临床决策。其中的内容可能不够全面或不够充分。医学知识发展迅速,在本共识产生到发表期间均可能出现新的证据,而这些可能并没有体现在本共识中。另外,因检测流程复杂、实验室条件差异以及患者之间存在个体差异等影响检测决策或结果,因此,本共识中内容的采用应结合检测条件、政策许可以及专业人员的独立专业判断。对本共识内容的使用是自愿的。专家组成员明确否认对文中所提及的任何产品具有

**表 2 中国非小细胞肺癌 RET 基因融合检测  
专家共识要点**

项目	专家共识推荐要点	推荐级别
<b>一、RET 基因融合检测的临床意义</b>		
1.伴有 RET 基因融合的晚期 NSCLC 患者可从 RET 抑制剂治疗中显著获益		强烈推荐
2.伴有 RET 基因融合的 NSCLC 手术患者无复发生 存期较短		推荐
<b>二、RET 基因融合检测的适用人群</b>		
1.经病理诊断为晚期肺腺癌(包括所有含腺癌成分)的患者		强烈推荐
2.经活检组织病理学证实为非腺癌的晚期 NSCLC		推荐
3.EGFR-TKI 及 ALK-TKI 耐药患者		推荐
4.术后明确为浸润性腺癌的患者		推荐
<b>三、RET 基因融合检测方法</b>		
1.NGS-DNA/RNA		强烈推荐
2.RT-PCR		强烈推荐
3.荧光原位杂交		推荐
4.免疫组织化学		不推荐
<b>四、RET 基因融合的标本类型</b>		
1.组织标本(小活检、手术等)		强烈推荐
2.细胞学标本(胸腔积液、细针穿刺、EBUS-FNA 等)		强烈推荐
3.液体活检标本(血液、胸腹积液、脑脊液等,组织学标本不足时)		推荐
<b>五、RET 基因融合检测策略优化</b>		
1.RET 与 EGFR、ALK、ROS1、MET 等同时检测		强烈推荐
2.先检测 EGFR、ALK 等,阴性者再检测 RET 等		推荐
3.RET 单独首次检测		不推荐
<b>六、RET 基因融合检测流程及注意事项</b>		
1.组织/细胞学样本在检测前应由病理医师进行肿瘤含量评估		强烈推荐
2.对于晚期 NSCLC 活检样本,一次性切出病理诊断及分子诊断所需标本量,以提高基因检测的成功率		强烈推荐
3.RET 基因融合在 NSCLC 中突变率约 2%,临床应用时应考虑效率和成本		推荐

注: NSCLC: 非小细胞肺癌

商业性目的。专家组对因使用本共识内容而造成的或与之相关的任何人身伤害或财产损失,或任何错误或遗漏不承担任何责任。

**《中国非小细胞肺癌 RET 基因融合临床检测专家共识》编写专家组成员:**国家癌症中心 国家肿瘤临床医学研究中心 中国医学科学院 北京协和医学院 肿瘤医院病理科(应建明、李研);郑州大学附属肿瘤医院临床病理中心 分子病理科(马杰、冯君楠);复旦大学附属肿瘤医院病理科(周晓燕、柏乾明);中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院病理科(梁智勇)

**RET 基因融合多中心研究主要研究者**(按单位名称汉语拼音字母排列):复旦大学附属中山医院病理科(纪元);复旦大学附属肿瘤医院病理科(周晓燕);国家癌症中心 国家肿瘤临床医学研究中心 中国医学科学院 北京协和医学院 肿瘤医院病理科(应建明);哈尔滨医科大学附属肿瘤医院病

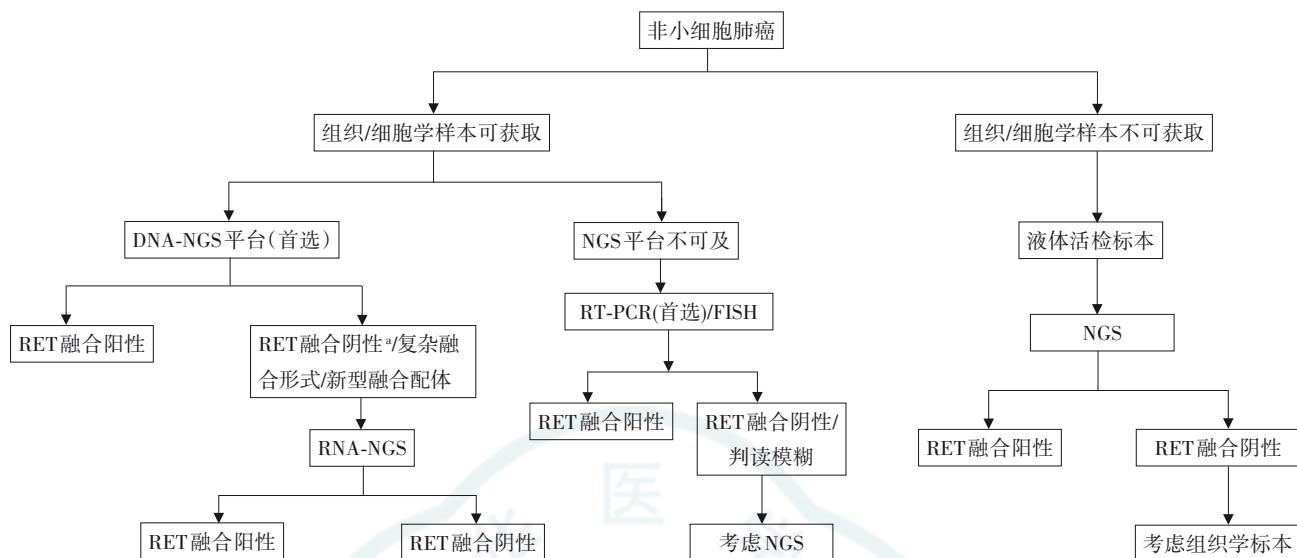


图1 非小细胞肺癌 RET 基因融合临床检测推荐路径

理科(孟宏学);南京医科大学第一附属医院病理科(张智弘);山西省肿瘤医院病理科(郗彦凤);首都医科大学附属北京胸科医院北京市结核病胸部肿瘤研究所病理科(车南颖);郑州大学第一附属医院病理科(姜国忠);郑州大学附属肿瘤医院临床病理中心分子病理科(马杰)

共识讨论及投票临床和病理专家(按单位名称汉语拼音字母排列):北京大学医学部病理科系(张波);北京医院病理科(王征);滨州医学院附属医院病理科(李红);福建医科大学附属协和医院病理科(姚梅宏);复旦大学附属中山医院病理科(侯英勇、纪元);复旦大学附属肿瘤医院病理科(柏乾明)、肿瘤内科(王佳蕾)、胸外科(陈海泉);吉林大学第二医院病理科(孙平丽);吉林大学第一医院病理科(段秀梅);吉林省肿瘤医院肿瘤内科(程颖);解放军东部战区总医院病理科(饶秋);解放军陆军特色医学中心病理科(王秋实);解放军总医院第一医学中心病理科(王琼);广东省人民医院病理科(崔倩);哈尔滨医科大学附属第一医院病理科(吴鹤);海南医学院第一附属医院病理科(郑晶);河北医科大学第二医院病理科(李月红);河北医科大学第四医院病理科(刘月平);河南省人民医院病理科(徐紫光);湖北省肿瘤医院病理科(郭芳);湖南省肿瘤医院内科(邬麟);华中科技大学同济医学院附属同济医院胸部肿瘤科(褚倩);空军军医大学西京医院病理科(胡沛臻);联勤保障部队第九〇〇医院病理科(曲利娟);辽宁省肿瘤医院病理科(何莲);陆军军医大学西南医院病理科(罗韬);南京大学医学院附属鼓楼医院病理科(杨军);南通市肿瘤医院病理科(朱兴华);青岛大学附属医院分子病理诊断科(邢晓明);山东大学齐鲁医院病理科(韩博、邢爱艳);山东省千佛山医院病理科(房磊);陕西省肿瘤医院病理科(袁勇);上海交通大学医学院附属仁济医院病理科

(刘泽兵);上海交通大学医学院附属瑞金医院病理科(董磊);上海市第十人民医院病理科(郑佳谊);上海市肺科医院病理科(吴伟、武春燕)、肿瘤科(周彩存);上海胸科医院病理科(韩昱晨)、肿瘤科(陆舜);首都医科大学附属北京朝阳医院病理科(路军);首都医科大学宣武医院病理科(滕梁红);四川大学华西医院病理科(唐源);四川省肿瘤医院病理科(廖琼、刘洋);苏州大学附属第一医院病理科(朱卫东);天津医科大学总医院病理科(张丹芳);西安交通大学第一附属医院病理科(刘希、张冠军)、肿瘤内科(郭卉);新疆医科大学第一附属医院病理科(崔文丽);徐州医科大学附属医院病理科(刘慧);右江民族医学院附属医院病理科(朱晓莹);浙江大学医学院附属邵逸夫医院病理科(胡晓彤);浙江省肿瘤医院病理科(苏丹)、内科(范云);郑州大学第一附属医院病理科(姜国忠);郑州大学附属肿瘤医院临床病理中心分子病理科(魏冰),呼吸内科(马智勇、王慧娟);中国科学技术大学附属第一医院临床病理中心(叶庆);中国医科大学附属第一医院病理科(刘楠、王亮);中国医学科学院北京协和医学院北京协和医院病理科(吴焕文);中国医学科学院肿瘤医院病理科(李卫华、郭蕾)、内科(李峻岭、王燕、王志杰);中南大学湘雅医院病理科(肖德胜);中日友好医院病理科(陈皇);中山大学附属第一医院分子诊断与基因检测中心(柯尊富);中山大学附属中山医院(中山市人民医院)分子诊断中心(孙世珺);中山大学孙逸仙纪念医院细胞分子诊断中心(欧阳能太);中山大学肿瘤医院分子诊断科(何彩云)

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] Zhang S, Sun K, Zheng R, et al. Cancer incidence and

- mortality in China, 2015[J]. *J National Cancer Center*, 2021, 1(1):2-11.
- [2] Li W, Lyu Y, Wang S, et al. Trends in molecular testing of lung cancer in mainland China over the decade 2010-19[J]. *JTO Clinical and Research Reports*, 2021, 2(4): 100163.
- [3] Li W, Guo L, Liu Y, et al. Potential unreliability of uncommon ALK, ROS1, and RET genomic breakpoints in predicting the efficacy of targeted therapy in NSCLC[J]. *J Thorac Oncol*, 2021, 16(3): 404-418. DOI: 10.1016/j.jtho.2020.10.156.
- [4] 杨科, 李峻岭. RET 基因融合突变的非小细胞肺癌的治疗进展[J]. 癌症进展, 2019, 17(23): 2749-2753, 2770. DOI: 10.11877/j.issn.1672-1535.2019.17.23.04.
- [5] Knowles PP, Murray-Rust J, Kjaer S, et al. Structure and chemical inhibition of the RET tyrosine kinase domain[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(44): 33577-33587. DOI: 10.1074/jbc.M605604200.
- [6] Romeo C, Ciampi R, Elisei R. A comprehensive overview of the role of the RET proto-oncogene in thyroid carcinoma [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2016, 12(4): 192-202. DOI: 10.1038/nrendo.2016.11.
- [7] 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. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-18-0338.
- [8] Yakushina VD, Lerner LV, Lavrov AV. Gene fusions in thyroid cancer[J]. *Thyroid*, 2018, 28(2): 158-167. DOI: 10.1089/thy.2017.0318.
- [9] 丁思洁, 王融, 王玮. RET 基因变异肿瘤的靶向治疗现状[J]. 中外医学研究, 2020, 18(25): 185-188. DOI: 10.14033/j.cnki.cfmr.2020.25.074.
- [10] Le Rolle AF, Klempner SJ, Garrett CR, et al. Identification and characterization of RET fusions in advanced colorectal cancer[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(30): 28929-28937. DOI: 10.18632/oncotarget.4325.
- [11] Kato S, Subbiah V, Marchlik E, et al. RET Aberrations in diverse cancers: next-generation sequencing of 4, 871 patients[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(8): 1988-1997. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1679.
- [12] Li AY, McCusker MG, Russo A, et al. RET fusions in solid tumors[J]. *Cancer Treat Rev*, 2019, 81: 101911. DOI: 10.1016/j.ctrv.2019.101911.
- [13] Richardson DS, Gujral TS, Peng S, et al. Transcript level modulates the inherent oncogenicity of RET/PTC oncoproteins[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(11): 4861-4869. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4425.
- [14] Mulligan LM. RET revisited: expanding the oncogenic portfolio[J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(3): 173-186. DOI: 10.1038/nrc3680.
- [15] Xu H, Shen J, Xiang J, et al. Characterization of acquired receptor tyrosine-kinase fusions as mechanisms of resistance to EGFR tyrosine-kinase inhibitors[J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 6343-6351. DOI: 10.2147/CMAR.S197337.
- [16] McCoach CE, Le AT, Gowan K, et al. Resistance mechanisms to targeted therapies in ROS1(+) and ALK(+) non-small cell lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(14): 3334-3347. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-2452.
- [17] Zhou Q, Wu Y, Chang J, Fan Y, et al. Efficacy and safety of pralsetinib in Chinese patients with advanced RET fusion+non-small cell lung cancer after platinum-based chemotherapy[J]. *J Thoracic Oncol*, 2021, 16(3):S235.
- [18] Takahashi M, Asai N, Iwashita T, et al. Characterization of the ret proto-oncogene products expressed in mouse L cells[J]. *Oncogene*, 1993, 8(11):2925-2929.
- [19] Wang R, Hu H, Pan Y, et al. RET fusions define a unique molecular and clinicopathologic subtype of non-small-cell lung cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30(35):4352-4359. DOI: 10.1200/JCO.2012.44.1477.
- [20] Gautschi O, Milia J, Filleron T, et al. Targeting RET in patients with RET-rearranged lung cancers: results from the global, multicenter RET registry[J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(13):1403-1410. DOI: 10.1200/JCO.2016.70.9352.
- [21] Lee J, Ku BM, Shim JH, et al. Characteristics and outcomes of RET-rearranged Korean non-small cell lung cancer patients in real-world practice[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2020, 50(5):594-601. DOI: 10.1093/jjco/hyaa019.
- [22] Shen T, Pu X, Wang L, et al. Association between RET fusions and efficacy of pemetrexed-based chemotherapy for patients with advanced NSCLC in China: a multicenter retrospective study[J]. *Clin Lung Cancer*, 2020, 21(5): e349-e354. DOI: 10.1016/j.cllc.2020.02.006.
- [23] Guisier F, Dubos-Arvis C, Viñas F, et al. Efficacy and safety of anti-PD-1 immunotherapy in patients with advanced NSCLC with BRAF, HER2, or MET mutations or RET translocation: GFPC 01-2018[J]. *J Thorac Oncol*, 2020, 15(4):628-636. DOI: 10.1016/j.jtho.2019.12.129.
- [24] Tan AC, Seet A, Lai G, et al. Molecular characterization and clinical outcomes in RET-Rearranged NSCLC[J]. *J Thorac Oncol*, 2020, 15(12): 1928-1934. DOI: 10.1016/j.jtho.2020.08.011.
- [25] Go H, Jung YJ, Kang HW, et al. Diagnostic method for the detection of KIF5B-RET transformation in lung adenocarcinoma[J]. *Lung Cancer*, 2013, 82(1):44-50. DOI: 10.1016/j.lungcan.2013.07.009.
- [26] Tsuta K, Kohno T, Yoshida A, et al. RET-rearranged non-small-cell lung carcinoma: a clinicopathological and molecular analysis[J]. *Br J Cancer*, 2014, 110(6): 1571-1578. DOI: 10.1038/bjc.2014.36.
- [27] Radonic T, Geurts-Giele W, Samsom KG, et al. RET fluorescence in situ hybridization analysis is a sensitive but highly unspecific screening method for RET fusions in lung cancer[J]. *J Thorac Oncol*, 2021, 16(5):798-806. DOI: 10.1016/j.jtho.2021.01.1619.
- [28] Yang SR, Aypar U, Rosen EY, et al. A performance comparison of commonly used assays to detect RET fusions[J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27(5):1316-1328. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-20-3208.
- [29] Sun Y, Pei L, Luo N, et al. A Novel MYH9-RET fusion occurrence and EGFR T790M loss as an acquired resistance mechanism to osimertinib in a patient with lung adenocarcinoma: a case report[J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13:11177-11181. DOI: 10.2147/OTT.S267524.
- [30] Reeser JW, Martin D, Miya J, et al. Validation of a targeted RNA sequencing assay for kinase fusion detection in solid tumors[J]. *J Mol Diagn*, 2017, 19(5): 682-696. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2017.05.006.
- [31] Benayed R, Offin M, Mullaney K, et al. High yield of RNA sequencing for targetable kinase fusions in lung adenocarcinomas with no mitogenic driver alteration

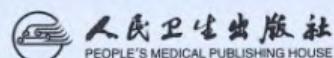
- detected by DNA sequencing and low tumor mutation burden[J]. Clin Cancer Res, 2019, 25(15):4712-4722. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-0225.
- [32] Abel HJ, Al-Kateb H, Cottrell CE, et al. Detection of gene rearrangements in targeted clinical next-generation sequencing[J]. J Mol Diagn, 2014, 16(4): 405-417. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2014.03.006.
- [33] Zheng Z, Liebers M, Zhelyazkova B, et al. Anchored multiplex PCR for targeted next-generation sequencing[J]. Nat Med, 2014, 20(12): 1479-1484. DOI: 10.1038/nm.3729.
- [34] Beadling C, Wald AI, Warrick A, et al. A multiplexed amplicon approach for detecting gene fusions by next-generation sequencing[J]. J Mol Diagn, 2016, 18(2): 165-175. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2015.10.002.
- [35] Levin JZ, Berger MF, Adiconis X, et al. Targeted next-generation sequencing of a cancer transcriptome enhances detection of sequence variants and novel fusion transcripts[J]. Genome Biol, 2009, 10(10): R115. DOI: 10.1186/gb-2009-10-10-r115.
- [36] Ferrara R, Auger N, Auclin E, et al. Clinical and translational implications of RET rearrangements in non-small cell lung cancer[J]. J Thorac Oncol, 2018, 13(1): 27-45. DOI: 10.1016/j.jtho.2017.10.021.
- [37] Sasaki H, Shimizu S, Tani Y, et al. RET expression and detection of KIF5B/RET gene rearrangements in Japanese lung cancer[J]. Cancer Med, 2012, 1(1): 68-75. DOI: 10.1002/cam4.13.
- [38] Lee SE, Lee B, Hong M, et al. Comprehensive analysis of RET and ROS1 rearrangement in lung adenocarcinoma[J]. Mod Pathol, 2015, 28(4): 468-479. DOI: 10.1038/modpathol.2014.107.
- [39] Rich TA, Reckamp KL, Chae YK, et al. Analysis of cell-free DNA from 32, 989 advanced cancers reveals novel co-occurring activating RET alterations and oncogenic signaling pathway aberrations[J]. Clin Cancer Res, 2019, 25(19): 5832-5842. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-4049.
- [40] Supplee JG, Milan M, Lim LP, et al. Sensitivity of next-generation sequencing assays detecting oncogenic fusions in plasma cell-free DNA[J]. Lung Cancer, 2019, 134:96-99. DOI: 10.1016/j.lungcan.2019.06.004.
- [41] Rolfo C, Mack PC, Scagliotti GV, et al. Liquid biopsy for advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): a statement paper from the IASLC[J]. J Thorac Oncol, 2018, 13(9):1248-1268. DOI: 10.1016/j.jtho.2018.05.030.
- [42] 中国非小细胞肺癌 ALK 检测模式真实世界多中心研究专家组, 中华医学会病理学分会分子病理学组. 中国非小细胞肺癌 ALK 检测临床实践专家共识[J]. 中华病理学杂志, 2019, 48(12): 913-920. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2019.12.001.



# 中国临床肿瘤学会 (CSCO) 非小细胞肺癌诊疗指南 2021

GUIDELINES OF CHINESE SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY (CSCO)  
**NON-SMALL CELL LUNG CANCER**

中国临床肿瘤学会指南工作委员会 组织编写



## 病理学诊断

诊断手段	I 级推荐	II 级推荐	III 级推荐
形态学 (常规 HE 染色)	组织形态学明确小细胞肺癌和非小细胞肺癌； 非小细胞肺癌需进一步明确鳞癌和腺癌 <sup>[1]</sup>	细胞学检查制作细胞 蜡块； 依据 2021 版 WHO 肺 癌组织学分类 <sup>[1]</sup>	
免疫组化 (染色)	形态学不明确的 NSCLC，手术标本使用一 组抗体鉴别腺癌、鳞癌 <sup>[1, 2]</sup> ，手术标本应 给出明确亚型，如 AIS, MIA, 附壁型为主 的腺癌、肉瘤样癌、腺鳞癌、大细胞癌， 以及神经内分泌癌中的类癌、不典型类癌 等类型，需要充分观察标本病理改变或评 估肿瘤类型所占比例； 晚期活检病例，尽可能使用 TTF-1、P40 两 个免疫组化指标鉴别腺癌或鳞癌 <sup>[2, 3]</sup>	小细胞癌标志物： CD56, Syno, CgA, TTF-1, CK, Ki-67； 腺癌、鳞癌鉴别标志 物：TTF-1, NapsinA, P40, CK5/6 (P63)	

# 分子分型

分子分型	I 级推荐	II 级推荐	III 级推荐
可手术 I ~ III 期 NSCLC	术后 II / III 期非鳞癌进行 EGFR 突变检测，指导辅助靶向治疗 <sup>[1-4]</sup>		
不可手术 III 期及 IV 期 NSCLC	病理学诊断后保留足够组织标本进行分子检测，根据分子分型指导治疗 <sup>[5-9]</sup> （1类）；对于非鳞癌组织标本进行：EGFR 突变，ALK 融合，ROS1 及 RET 融合检测（3类）	<i>BRAF V600E</i> 突变、 <i>KRAS</i> 突变、 <i>ERBB2 (HER-2)</i> 扩增 / 突变， <i>MET</i> 扩增和 <i>MET14</i> 外显子跳跃突变以及 <i>NTRK</i> 融合等基因变异可通过单基因检测技术或二代测序技术（NGS）在肿瘤组织中进行，若组织标本不可及，可考虑利用 cf/ctDNA 进行检测（2B 类）	采用 NGS 技术检测肿瘤突变负荷（TMB）（2B 类） <sup>[20]</sup>

分子分型（续表）

分子分型	I 级推荐	II 级推荐	III 级推荐
	<p>肿瘤标本无法获取或量少不能行基因检测时，可通过外周血游离 / 肿瘤 DNA（cf/ctDNA）进行 EGFR 突变检测<sup>[10-19]</sup>；</p> <p>EGFR-TKIs 耐药患者，建议再次活检进行 EGFR T790M 检测<sup>[14]</sup>。不能获取肿瘤标本的患者，建议行 cf/ctDNA EGFR T790M 检测<sup>[13, 16]</sup></p> <p>组织标本采用免疫组化法检测 PD-L1 表达（1类）</p>	<p>不吸烟、经小标本活检诊断鳞癌或混合腺癌成分的患者建议 EGFR 突变、ALK 融合及 ROS1 融合等检测（2A 类）</p>	

# 肺癌 常见检测项目列表

货号	产品名称	临床用途
FP-002	人类ALK基因融合检测探针（荧光原位杂交法）	靶向用药
FP-006	6q探针试剂（原位杂交法）-ROS1断裂	靶向用药
FP-046	MET基因探针试剂（原位杂交法）	靶向用药
FP-059	RET基因断裂探针试剂（原位杂交法）	靶向用药
FP-231-1	NTRK1/NTRK2/NTRK3基因断裂探针试剂 (荧光原位杂交法)-NTRK1断裂	靶向用药
FP-092	NTRK2（9q21）基因断裂探针试剂（荧光原位杂交法）	靶向用药
FP-093	NTRK3（15q25）基因断裂探针试剂（荧光原位杂交法）	靶向用药
FP-001	人类HER2基因扩增检测试剂盒（荧光原位杂交法）	靶向用药

\*以上探针均获证，可合规销售

# 快速FISH智能一体机 ➤➤➤

从白片到FISH染色完成所有步骤，全程不需要手动操作。  
是病理科检测、诊断设备上真正的技术革新！



## 真正的全自动FISH设备

产品用途 ➤➤➤

从白片到阅片前的所有FISH步骤6h内全自动完成，全程无需人工干预

### 一体化

集烤片机、水浴锅、杂交仪、移液器于一体  
所有试剂管道均置于设备内部



### 简单化

仅需此设备和荧光显微镜  
即可开展FISH项目



### 快速化

仅需30分钟烤片、1.5小时前处理  
快速探针2小时杂交、6小时出报告



### 标准化

精准温控，质控简便  
独立反应仓，防止污染



### 智能化

全自动滴加探针、揭盖玻片  
全程无需手工操作、无需人员值守



### 多样化

同批次可检测6-10种探针  
可同时处理不同组织样本

