

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

执笔人: 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: liangzhiyong1220@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^[1-5]。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^[6-7]。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^[8-10], 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^[11-13]。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^[14-17]。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^[18-19]。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^[20-29],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^[30-31],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^[32]。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^[34]。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 PEC/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^[35];MET 变异在肉瘤样癌中发生率高^[36];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^[37]。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) ^a	美国食品药品监督管理局获批药物(适应证) ^a	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 ^b	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	不适用	不适用	排除诊断	II
				靶向治疗	未获批	未获批	伴随诊断	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	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,同时有已上市的确切的伴随诊断试剂;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);^a获批药物会不断更新;^b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 ^c	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 ^a	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 ^b	FFPE、细胞学标本、体液样本 ^c	0.1%~5.0%	高	5~7 d	几个到几百个基因同时检测

注:^a因建库原理及基于 DNA 或 RNA 的检测策略有所不同;^b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;^c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其主要特点: 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^[38-39]。

(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^[40]。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治疗的中位生存时间相关,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^[41-42]。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^[43]。

2. ALK基因变异常用检测方法及其主要特点: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^[44]。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^[45]。

2. ROS1基因检测方法及其主要特点: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^[46-47],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其主要特点: 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^[48]。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^[49],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^[50]。

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^[51]。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,其中最常见基因变异为 HER2 外显子 20 插入性突变,在 NSCLC 的突变率为 2%~4%^[52]。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%^[53]。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^[54]。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%),美国食品药品监督管理局 (FDA) 已批准 Selpercatinib 和 Pralsetinib 用于伴有 RET 易位的肿瘤^[55],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^[56-57]。

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、吴煥文、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/jamaoncol.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, Rekhman 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, Forsys 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 immunohistochemistry 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, Felipe 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, Facchinetti 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 selpercatinib 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.clc.2020.10.013.