

# 肿瘤个体化治疗检测技术指南 (试行)

## 前言

肿瘤的个体化治疗基因检测已在临床广泛应用，实现肿瘤个体化用药基因检测标准化和规范化，是一项意义重大的紧迫任务。本指南从诊断项目的科学性、医学实验室检测方法的准入、样本采集至检测报告发出的检测流程、实验室质量保证体系四个方面展开了相关论述，使临床医生能够了解所开展检测项目的临床目的、理解检测结果的临床意义及对治疗的作用；医学实验室为患者或临床医护人员提供及时、准确的检验报告，并为其提供与报告相关的咨询服务。检测技术的标准化和实验室准入及质量保证对临床和医学实验室提出了具体的要求，以最大程度的保证检测结果的准确性。

本指南是参考现行相关的法规和标准以及当前认知水平下制定的，随着法规和标准的不断完善，以及肿瘤个体化治疗靶点基因的不断发现，本技术规范相关内容也将进行适时调整。

本指南起草单位：中国医学科学院肿瘤医院分子肿瘤学国家重点实验室、苏州生物医药创新中心，经国家卫生计生委个体化医学检测技术专家委员会、中国抗癌协会相关专业委员会、中华医学会检验医学分会、中华医学会肿瘤学分会的专家修订。

本指南起草人：詹启敏、曾益新、王珏、姬云、钱海利、李晓燕、孙石磊

## 目 录

1. 本指南使用范围 .....	1
2. 简介 .....	1
3. 标准术语和基因突变命名 .....	1
3.1 标准术语 .....	1
3.2 基因突变命名 .....	2
3.3 参考序列 .....	2
3.4 各类变异 .....	2
4. 分析前质量保证 .....	5
4.1 样本类型及获取 .....	5
4.2 采样质量的评价 .....	6
4.3 样本采集中的防污染 .....	6
4.4 样本运送和保存 .....	6
5. 分析中质量保证 .....	7
5.1 实验室设计要求 .....	7
5.2 检测方法 .....	7
5.3 DNA 提取方法与质量控制 .....	13
5.4 RNA 提取方法与质量控制 .....	14
5.5 试剂的选择、储存及使用注意事项 .....	14
5.6 核酸扩增质量控制 .....	15
5.7 设备维护和校准 .....	15
5.8 人员培训 .....	15
5.9 方法的性能验证 .....	16

6. 分析后质量保证 .....	17
6.1 检测结果的记录 .....	17
6.2 失控结果的记录与分析 .....	17
6.3 报告及解释 .....	17
6.4 记录保留 .....	18
6.5 检测后基因咨询 .....	18
6.6 样本（及核酸）保留与处理 .....	18
6.7 检测与临床数据收集与分析 .....	19
7. 肿瘤个体化医学检测的质量保证 .....	19
7.1 标准操作程序 .....	19
7.2 质控品 .....	19
7.3 室内质量控制 .....	20
7.4 室间质量评价 .....	20
7.5 PCR 污染控制 .....	21
附录 A：常见的检测项目 .....	22
A.1 基因突变检测项目 .....	22
A.2 基因表达检测项目 .....	30
A.3 融合基因检测项目 .....	33
A.4 基因甲基化检测项目 .....	34
参考文献： .....	37

## 1. 本指南使用范围

本指南由国家卫生计生委个体化医学检测技术专家委员会制定，是国家卫生计生委个体化医学检测指南的重要内容，旨在为临床分子检测实验室进行肿瘤个体化用药基因的检测提供指导。本指南的主要适用对象为开展个体化医学分子检测的医疗机构临床分子检测实验室。

## 2. 简介

肿瘤个体化治疗以疾病靶点基因诊断信息为基础，以循证医学研究结果为依据，为患者提供接受正确治疗方案的依据，已经成为现代医学发展的趋势。临床研究证实，通过检测肿瘤患者生物样本中生物标志物的基因突变、基因 SNP 分型、基因及其蛋白表达状态来预测药物疗效和评价预后，指导临床个体化治疗，能够提高疗效，减轻不良反应，促进医疗资源的合理利用。

## 3. 标准术语和基因突变命名

### 3.1 标准术语

- 1) 基因 (Gene): 是遗传物质的最小功能单位，是指具有一定生物学意义的一段 DNA。
- 2) 突变 (Mutation): 是细胞中 DNA 核苷酸序列发生了稳定的改变。
- 3) 融合基因 (Fusion gene): 是指两个基因的全部或一部分的序列相互融合为一个新的基因的过程。融合基因的表达产物为融合蛋白。
- 4) 基因表达 (Gene Expression): 是基因中的 DNA 序列生产出蛋白质的过程。步骤从 DNA 转录成 mRNA 开始，一直到对于蛋白质进行翻译后修饰为止。
- 5) 基因扩增 (gene amplification): 为一特异蛋白质编码的基因的拷贝数选择性地增加而其他基因并未按比例增加的过程。
- 6) DNA 甲基化 (DNA Methylation): 为 DNA 化学修饰的一种形式，将甲基添加到 DNA 分子上，例如在胞嘧啶环的 5'碳上。DNA 甲基化能在不改变 DNA 序列的前提下，将 DNA 甲基化状态遗传至下一代细胞或个体。
- 7) 聚合酶链反应 (PCR): 是一种体外扩增特异 DNA 片段的技术。利用 DNA 在体外摄氏高温时变性会变成单链，低温时引物与单链按碱基互补配对的原则结合，再调温度至 DNA 聚合酶最适反应温度，DNA 聚合酶沿着磷酸到五碳糖(5'-3')的方向合成互补链。

8) 质控品：是含量或成分已知的处于与实际样本相同的基质中的特性明确的物质，这种物质通常与其他杂质混在一起，专门用于质量控制目的的样本或溶液。

### 3.2 基因突变命名

人类基因组突变学会（HGVS）已建立系统的基因突变命名方法。具体基因突变命名方法可查阅网站<http://www.hgvs.org/mutnomen/index.html>。HGVS基因突变命名指南根据需求不断更新。本文以2011年8月更新版本为准。

当描述某一序列改变时，其前缀表明其参考序列类型。例如“g.”表示基因组序列，“c.”表示cDNA序列，“m.”表示线粒体DNA序列，“r.”表示RNA序列，“p.”表示蛋白序列。在数据库中的收录号以及版本号应当在实验记录报告中列出，当两种突变在反式（in trans）中检测到，则用方括号表示。例如，CF突变为杂合性突变（508号苯丙氨酸缺失和1303号天冬酰胺被赖氨酸替代），则在DNA水平规范描述方式为c.[1521\_1523delCTT]+[3909C>G]。

### 3.3 参考序列

美国国立生物技术信息中心（NCBI）收录的参考序列编码具有权威性及唯一性。其中前缀“NM\_”表示为mRNA序列，“NP\_”表示多肽序列，“NG\_”表示基因组序列。基因组参考序列应列出完整基因序列，包括5'以及3'非编码区（UTR）。当使用某段编码DNA参考序列描述突变时，应选择合适的转录体，且转录体的起始转录点应当明确，例如选择最常见的转录体，或者是已知的最大转录体，或者具有组织特异性的编辑转录体。当某一参考序列具有多种转录方式时，选择NCBI数据库里注释最全面的版本。

### 3.4 各类变异

#### 3.4.1 DNA 序列变异术语规范

DNA 核苷酸用大写字母 A（腺嘌呤）、C（胞嘧啶）、G（鸟嘌呤）以及 T（胸腺嘧啶）来表示。用正链来表示 DNA 序列。当 DNA 序列改变时，以相应核苷酸所在位置及相应字母来描述。“>”符号表示“从某一变化至另一”。在描述突变方式时，数字、字母、箭头、上标以及下标之间不应出现空格。

### 3.4.2 RNA 序列变异术语规范

RNA 序列以小写字母 a（腺嘌呤）、c（胞嘧啶）、g（鸟嘌呤）、u（尿嘧啶）进行描述。RNA 序列改变描述方式与 DNA 相类似。具体术语可参阅 HGVS 网站（<http://www.hgvs.org/mutnomen/index.html>）。

### 3.4.3 蛋白质序列变异术语规范

蛋白质序列改变通常以单个字母或三个字母（第一个字母大写）来描述。尽管单个字母描述氨基酸明确无误，但是由于三联密码子相对于其编码的氨基酸存在冗余性，具体给出发生突变的三联体密码子可以更清楚地描述氨基酸改变方式。例如，用来描述氨基酸的 A（丙氨酸）、C（半胱氨酸）、G（甘氨酸）以及 T（苏氨酸）可能会与核苷酸字母 A（腺嘌呤）、C（胞嘧啶）、G（鸟嘌呤）以及 T（胸腺嘧啶）相混淆。

### 3.4.4 错义突变及无义变异术语规范

由于三联体密码子的简并性，多个位点核苷酸的改变可能不影响最终氨基酸序列。因此，应该分别从 DNA 水平和氨基酸水平描述突变。从 DNA 水平对某一突变位点的描述方式包括碱基位点，正常碱基，“>”符号，突变碱基。例如，某一蛋白第 551 号氨基酸残基由 G（甘氨酸）突变为 D（天冬氨酸），从 DNA 水平描述即 c.1652G>A。

在氨基酸水平，由于错义突变的产物以氨基酸残基位点以及表示氨基酸的单字母或三联体密码子来描述。表示方法是野生型的氨基酸、位点、突变氨基酸，三者之间不要有空格。例如，p.Gly551Asp 表示该蛋白中 551 号甘氨酸残基（G）被天冬氨酸残基（D）所代替。无义突变表示方法与之相类似。需要指出的是“X”符号代表终止密码子。例如，p.Gly542X 表示 542 位点的甘氨酸残基被终止密码子所代替。

### 3.4.5 缺失和插入术语规范

缺失和插入突变分别用前缀“del”和“ins”来表示，并注明突变位点以及碱基。例如，c.441delA 表示在该 DNA 序列中 441 号位点发生 A 碱基缺失。c.241\_243delATC 表示在该 DNA 序列中从 241 号到 243 号缺失 ATC 三个碱基。

在蛋白水平，上述突变描述方式为 p.Ile24del，表示该蛋白质中第 24 号的异亮氨酸残基发生缺失。“indels”则表示该段序列缺失的同时有片段插入。例如，

234\_239delAATTCGinsTA（或者 234\_239delinsTA）表示该 DNA 序列 234 至 239 号位点缺失 AATTCG 六个碱基，同时该段位点被新插入的 TA 碱基所替代。

### 3.4.6 移码突变术语规范

移码突变用“fs”符号来表示。“fs\*#”则用于进一步描述突变类型。例如，p.His62Profs\*21 表示该蛋白发生移码突变，第 62 号氨基酸由组氨酸突变为脯氨酸并产生新的阅读框架，终止于第 62 号密码子下游 21 号密码子处。该突变也可简要描述为 p.His62fs，即该蛋白从第 62 号密码子发生移码突变。

### 3.4.7 碱基重复序列

HGVS 推荐，核苷酸重复序列基因多态性描述时通常以一个重复序列为单元，后面加上“[重复的次数]”，如 CGG[55]。当重复序列的次数在一个范围之内时，需要在小括号“()”中标注出可能的最少和最高的重复次数，如某个人 *HTT* 基因中发现有 12 个和 15 个 CAG 重复，基因水平的表示如下：c.52CAG[12]+[15]，蛋白水平则表示为：p.Gln18[12]+[15]。*HTT* 基因的重复序列范围则描述为：c.52CAG(27\_35) 或 p.Gln18(27\_35)。

### 3.4.8 遗传药理学基因型术语规范

最广泛使用的命名法描述遗传药理学基因型不同于其他遗传学基因检测，例如代谢相关基因细胞色素 p450 家族，人类细胞色素 P450（CYP）等位基因命名委员会（<http://www.cypalleles.ki.se>）推荐用“\*”命名，见图 1。在该系统中，最常见的等位基因被指定为“\*1”。

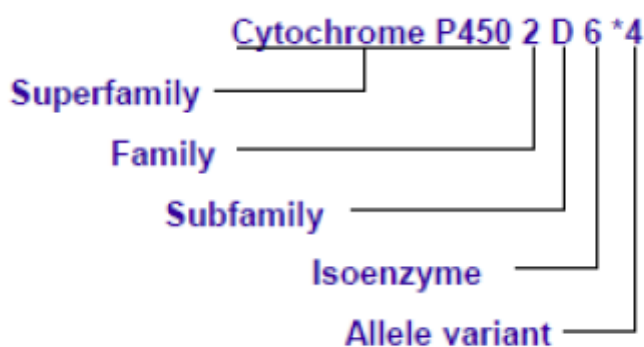


图 1.细胞色素 P4502D6 等位基因命名规范

### 3.4.9 其他

对于更复杂的突变，可参考 HGVS（<http://www.hgvs.org/mutnomen>）建议的命名规则，解决其他复杂的变异的命名。



## 4. 分析前质量保证

### 4.1 样本类型及获取

#### 4.1.1 新鲜组织(包括手术和活检组织)

肿瘤新鲜冷冻材料可提取出最高品质的 DNA、RNA。在手术现场取样的情况也比较多，但需要在显微镜下确认肿瘤细胞含量。周围炎症严重的肿瘤、黏液产生过高的肿瘤、病变中心广泛纤维化的肿瘤细胞不能采集，以免产生假阴性结果。切割后取其中一半，并利用另一半切面制作组织标本，然后进行确认。

手术切除的组织样本理想的保存方法是迅速置于液氮中，然后保存于液氮罐或-80℃冰箱，这一过程应在手术样本离体后 30 分钟内完成。由于组织样本通常需先进行病理学分析，在分析完成后应尽早将组织样本置于稳定剂中，避免核酸降解。

#### 4.1.2 石蜡包埋组织 (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE)

10%中性福尔马林固定手术切除样本，按病理学操作规范进行取材。

制作石蜡切片时，切取 5 片连续切片，其中 1 片进行 HE 染色，确认肿瘤细胞的含量。在高灵敏度检测方法中，可考虑使用活检标本。

DNA 容易受固定的影响，长时间（1 周以上）浸泡在福尔马林中的样本的 DNA 会被片段化，不能检出突变。活检材料的固定时间一般是 24 小时，对于穿刺等活检样本，固定时间控制在 6~24 小时为佳。

#### 4.1.3 胸腹水等细胞学样本

用胸腹水中的肿瘤细胞用于基因检测时，必须确认肿瘤细胞，穿刺获得胸腹水样本提交给细胞病理检查之后，剩余液体冷藏/冷冻保存，也可在含有细胞成分的离心沉淀中加入含有蛋白质变性剂的缓冲液（AL 缓冲液，Qiagen 公司）等室温保存。由于细胞学样本的肿瘤细胞含量较低，因此必须使用高灵敏度检测方法。

#### 4.1.4 血浆样本

循环 DNA(circulating free DNA, cfDNA)是存在于血浆中的游离 DNA，肿瘤来源的 DNA 占血浆游离 DNA 的比例在不同肿瘤及病例中相差悬殊(0.01~93%)，从而限制了外周血在肿瘤分子检测时的应用。目前已有多篇文献证实可利用从血浆游离 DNA 检出突变，但需要使用 ARMS 法等灵敏度非常高的检测方法。

采集外周血提取血浆游离 DNA 进行检测，取样时应使用一次性密闭 EDTA 抗凝真空采血管，采集 6~10ml 全血，冷藏运输，6 小时内分离血浆，提取游离 DNA，保存到-80℃冰箱中，并避免反复冻融。如外周血需长时间运输，建议用商品化的游离 DNA 样本保存管，在常温条件下，cfDNA 在全血中可稳定保存 7 天。

## 4.2 采样质量的评价

肿瘤细胞是否存在，是开展肿瘤个体化治疗基因检测的重要前提。如果要确认肿瘤细胞存在，与病理诊断医生密切合作是非常必要的。

采样评价内容包括：细胞组成、肿瘤细胞的数量，是否按照要求进行处理与运输。评价方法包括肉眼观察、显微镜下观察和浓度分析等。

肿瘤组织切片等应经病理医师审阅，取一张切片 HE 染色后显微镜下观察，确保肿瘤细胞存在，并记录肿瘤组织含量，标注肿瘤细胞密集区域。

## 4.3 样本采集中的防污染

样本采集最好采用一次性材料，不用处理便可直接使用；

制备不同患者病理切片样本时，需更换新刀片，并清除操作器皿上先前样本的残留；

采集中要特别注意防止污染，防止混入操作者的毛发、表皮细胞、痰液等；

如使用玻璃器皿，必须经高压灭菌，以使可能存在的 DNase 失活；

如提取 RNA 样品，必须采用 RNase 抑制剂措施和无 RNase 材料。

## 4.4 样本运送和保存

原则上按照《个体化医学检测质量保证指南》要求进行。

实验室应建立详细的样本运送标准操作规程（SOP），对临床医生提供样本采集手册，要求物流人员填写相关运送记录表，确保运送过程中样本的安全性和过程的可控性。

需要转送的样本：用于 RNA 检测的样本，如果未经稳定化处理，则必须速冻后，放在干冰中运送。

经过适当稳定化处理的样本可在常温下运送，如用于 DNA 扩增检测的 EDTA 抗凝全血样本及用于 RNA 扩增检测的经稳定化处理的样本。

## 5.分析中质量保证

### 5.1 实验室设计要求

原则上按照《个体化医学检测质量保证指南》要求进行。在符合国家卫生计生委要求的个体化医学检测实验室和通过审核验收的临床基因扩增检验实验室完成。

### 5.2 检测方法

#### 5.2.1 Sanger 测序法

##### 5.2.1.1 技术原理

Sanger 测序法即双脱氧链终止法(Chain Termination Method),利用一种 DNA 聚合酶来延伸结合在待定序列模板上的引物。直到掺入一种链终止核苷酸为止。每一次序列测定由一套四个单独的反应构成,每个反应含有所有四种脱氧核苷酸三磷酸(dNTP),并混入限量的一种不同的双脱氧核苷三磷酸(ddNTP)。由于 ddNTP 缺乏延伸所需要的 3-OH 基团,使延长的寡聚核苷酸选择性地在 G、A、T 或 C 处终止。终止点由反应中相应的双脱氧而定。每一种 dNTPs 和 ddNTPs 的相对浓度可以调整,使反应得到一组长几百至几千碱基的链终止产物。它们具有共同的起始点,但终止在不同的核苷酸上,可通过高分辨率变性凝胶电泳分离大小不同的片段,凝胶处理后可用 X-光胶片放射自显影或非同位素标记进行检测。

##### 5.2.1.2 技术特点

该方法是 DNA 序列分析的经典方法,最直接的、可检测已知和未知突变的一种方法。由于该方法可直接读取 DNA 的序列,因此被认为是基因分型的金标准。

主要优点:测序长度较长,可发现新的变异位点,包括一些新的少见的突变形式及突变的确切类型,如点突变、片段缺失。

局限性:灵敏度不高,突变等位基因需要超过 20%才能检出。对样本中肿瘤细胞的含量和比例要求较高,一般要求肿瘤细胞含量不低于 50%,如果肿瘤细胞比例低于 50%,则假阴性出现的概率会显著增加;不适用于活检或细胞学样本。

#### 5.2.2 焦磷酸测序法(Pyrosequencing)

##### 5.2.2.1 技术原理

焦磷酸测序技术是由 4 种酶催化的同一反应体系中的酶级联化学发光反应。当测序引物与模板 DNA 退火后，在 DNA 聚合酶、ATP 硫酸化酶、荧光素酶和三磷酸腺苷双磷酸酶等 4 种不同酶的协同作用下，将引物上每一个 dNTP 聚合时释放的焦磷酸基团（PPi）与一次荧光信号的释放偶联起来，通过检测荧光的释放和强度，达到实时测定 DNA 序列和定量分析序列变化的目的。

#### 5.2.2.2 技术特点

焦磷酸测序技术是一种新型的酶联级联测序技术，其重复性和精确性可与 Sanger 测序相媲美，而测序速度则大大提高，非常适合对已知的短序列进行重测序分析。

主要优点：检测灵敏度为 10%，相对 Sanger 测序法高，对体细胞突变和甲基化等可实现定量检测；分型准确可靠，通量较高，实验设计灵活，可发现新的突变或遗传变异。

局限性：测序长度较短，不能对长片段进行分析。检测灵敏度中等，难以检出低于 10% 的突变。不适用于活检或细胞学样本。

### 5.2.3 新一代测序（next generation sequencing, NGS）

#### 5.2.3.1 技术原理

NGS 又称大规模平行测序（MPS），包含多种可以一次性产生大量数字化基因序列的测序技术，是继 Sanger 测序的革命性进步，采用平行测序的理念，能够同时对上百万甚至数十亿个 DNA 分子进行测序，实现了大规模、高通量测序的目标。不同厂家的产品测序原理不同，主要分为边合成边测序（Sequencing by synthesis, SBS）、基于“DNA 簇”和“可逆性末端终结（Reversible Terminator）”大规模平行测序、4 色荧光标记寡核苷酸的连续连接反应测序和半导体芯片测序。

#### 5.2.3.2 技术特点

高通量测序技术不仅可以进行大规模基因组测序，还可用于基因表达分析、非编码小分子 RNA 的鉴定、转录因子靶基因的筛选和 DNA 甲基化等相关研究。

主要优点：高通量测序技术有三大优点是传统 Sanger 测序法所不具备的。第一，它利用芯片进行测序，可以在数百万个点上同时阅读测序。第二，高通量测序技术有定量功能，样品中 DNA 被测序的次数反映了样品中这种 DNA 的丰度。

第三、利用传统 Sanger 测序法完成的人类基因组计划总计耗资 27 亿美元，而现在利用高通量测序技术进行人类基因组测序，测序成本只需 1 千美金。

局限性：检测灵敏度和测序深度相关，一般来说，NGS 在肿瘤体细胞突变检测时，检测灵敏度为 10%；已知的与肿瘤相关驱动基因数量有限，疾病表型和基因型的关系还有赖于生物信息的解读，目前 NGS 应用于肿瘤细胞突变检测的标准化和质量控制尚未形成共识。

## 5.2.4 扩增阻滞突变系统（ARMS）-PCR 法

### 5.2.4.1 技术原理

扩增阻碍突变系统（amplification refractory mutation system, ARMS）是 PCR 技术应用的发展，也称等位基因特性 PCR（allele-specific PCR, AS-PCR）等，用于对已知突变基因进行检测。该法通过设计两个 5' 端引物，一个与正常 DNA 互补，一个与突变 DNA 互补，对于纯合性突变，分别加入这两种引物及 3' 端引物进行两个平行 PCR，只有与突变 DNA 完全互补的引物才可延伸并得到 PCR 扩增产物。如果错配位于引物的 3' 端则导致 PCR 不能延伸。

### 5.2.4.2 技术特点

ARMS-PCR 是目前实验室常用的基因突变检测方法。

主要优点：ARMS-PCR 法检测灵敏度高，可检测肿瘤细胞中突变比例为 1% 甚至更低的突变基因。

局限性：只能检测已知的突变类型，不能发现一些新的、未知的突变；如果检测的突变位点或类型较多，则随着引物数目增加出现非特异性结合的概率也相应增加；当检测位点较多时，对 DNA 样本量的需求增加。

## 5.2.5 高分辨率熔解曲线（HRM）法

### 5.2.5.1 技术原理

高分辨率熔解曲线（high-resolution melting, HRM）是一种基于 PCR 新型技术，用于检测基因变异包括未知的基因变异、单核苷酸多态性以及基因甲基化。HRM 是基于在加热过程中双链变性为单链的原则。DNA 双链体的熔解温度差异反应了基因的变异。双链 DNA 片段在其特定的温度熔解，熔解的温度由片段的 CG 含量、序列组成、长度以及一个和多个杂合碱基决定。用 DNA 嵌合的染料可以看到任何双链片段的熔解峰图，在有荧光嵌合染料的情况下 PCR 扩增片段，

扩增后的产物通过一个快速的可控的加热处理开始熔解。荧光水平在升温的过程中实时监测，染料随着双链 DNA 的熔解，荧光信号逐渐减少。

#### **5.2.5.2 技术特点**

由于 HRM 分析不受碱基突变位点和种类的限制，可用于突变扫描、基因分型、序列匹配、DNA 甲基化等方面的研究。

主要优点：检测灵敏度 1%，特异性高，重复性好；封闭体系，减少污染的可能性；扩增和检测同时进行，无需 PCR 后进行处理。

局限性：通过熔解曲线的图不能判断某一特异性的变异体，下游分析中检测需要有测序等补充。

### **5.2.6 数字 PCR (Digital PCR)**

#### **5.2.6.1 技术原理**

数字 PCR 是一种核酸分子绝对定量技术。相较于 qPCR，数字 PCR 能够直接数出 DNA 分子的个数，对起始样品绝对定量。通过将一个样本分成几万到几百万份，分配到不同的反应单元，每个单元包含一个或多个拷贝的目标分子 (DNA 模板)，在每个反应单元中分别对目标分子进行 PCR 扩增，扩增结束后对各个反应单元的荧光信号进行统计学分析。数字 PCR 技术不断发展，Bio-Rad、LIFE Technologies、Fluidigm 及 RainDance 等厂家相继推出技术较为成熟的数字 PCR 产品。

#### **5.2.6.2 技术特点**

数字 PCR 目前的应用包括：稀有等位基因检测、基因表达绝对定量、核酸标准品绝对定量、二代测序文库绝对定量等。

主要优点：灵敏度可达 0.001~0.0001%，高特异性，可检测复杂背景下的靶标序列；可高度耐受 PCR 反应抑制剂；不必依赖对照品或标准品，可对目标拷贝数直接进行精确的鉴定，分析微小的浓度差异；实验数据分析便捷，每个微滴的检测结果以阴性、阳性判读，数据分析自动化；可统计突变率，通过统计分析可得出靶点的突变率。

局限性：数字 PCR 仪通量较低，目前通常能检测的信号为 FAM 和 HEX。一般单个反应 2 重反应效果最佳；数字 PCR 优点是灵敏度高，但是对于 DNA 浓度大的样本处理就没有优势，而且核酸浓度高时，每个微滴里面包含的拷贝数不

符合泊松分布；数字 PCR 虽然不依赖标准曲线，但是每次反应之间存在差异，短期内不能代替 qPCR，也不能代替其他金标准而作为首选方法。QX200 等数字 PCR 仪目前仅用于科研用途，数字 PCR 走向临床检验还需要一段时间。

## 5.2.7 荧光原位杂交（FISH）

### 5.2.7.1 技术原理

荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)是通过荧光标记的 DNA 探针与细胞核内的 DNA 靶序列杂交，并在荧光显微镜下观察分析其结果的一种分子细胞遗传学技术。它的基本原理是：如果被检测的染色体或 DNA 纤维切片上的靶 DNA 与所用的核酸探针是同源互补的，二者经变性-退火-复性，即可形成靶 DNA 与核酸探针的杂交体。将核酸探针的某一种核苷酸标记上报告分子如生物素、地高辛，可利用该报告分子与荧光素标记的特异亲和素之间的免疫化学反应，经荧光检测体系在镜下对待测 DNA 进行定性、定量或相对定位分析。

### 5.2.7.2 技术特点

FISH 主要可对基因缺失、基因融合、基因扩增进行检测。

主要优点：可多种荧光标记，显示 DNA 片段及基因之间的相对位置与方向，空间定位精确；灵敏、特异性好，可同时分析分裂期和间期的多个细胞，并进行定量；可以检测隐匿或微小的染色体畸变及复杂核型。

局限性：FISH 检测对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；目前 FISH 检测的成本昂贵、通量低。

## 5.2.8 免疫组化（IHC）

### 5.2.8.1 技术原理

免疫组化（Immunohistochemistry, IHC）分析利用抗体和抗原之间的结合的高度特异性，借助于组织化学的方法将抗原抗体结合的部位和强度显示出来，以其达到对组织或细胞中的相应抗原进行定性、定位或定量的研究。

### 5.2.8.2 技术特点

IHC 作为筛查工具优于 FISH，具有经济快捷的优点，尤其适用于大量样本的检测分析。影响 IHC 结果的因素主要包括抗体的选择、检测前组织的固定，观察者解释方面的差别等。

## 5.2.9 荧光定量逆转录 PCR(Q-RT-PCR)

### 5.2.9.1 技术原理

逆转录 PCR (reverse transcription PCR) 或者称反转录 PCR(reverse transcription-PCR, RT-PCR), 是聚合酶链式反应(PCR)的一种广泛应用的变形。由一条 RNA 单链转录为互补 DNA(cDNA)称作“逆转录”, 由依赖 RNA 的 DNA 聚合酶(逆转录酶)来完成。随后, DNA 的另一条链通过脱氧核苷酸引物和依赖 DNA 的 DNA 聚合酶完成, 随每个循环倍增, 即通常的 PCR。原先的 RNA 模板被 RNA 酶 H 降解, 留下互补 DNA。

### 5.2.9.2 技术特点

荧光定量 PCR 是检测拷贝数变化的一种快速且经济的技术方法, 该方法技术可用于 RNA 表达水平检测该技术主要优点是检测快速、通量高、灵敏度好, 主要不足是对肿瘤组织提取 RNA 的质量要求较高, 在检测基因表达量时判读标准尚未统一。FISH、IHC 和 Q-RT-PCR 三种方法在检测 ALK 基因重排时的优缺点分析见表 1。

表 1: FISH、IHC 和 Q-RT-PCR 检测 ALK 基因重排的优缺点比较

	IHC	FISH	Q-RT-PCR
检测对象	蛋白	DNA	RNA
特异性	+	+	++++
发现的融合类型	已知、未知	已知、未知	已知
通量	++	+	++++
费用	+	++++	+++

### 5.2.3 检测方法选择策略

实验室应优选国际和国内“金标准”的检测方法, 同类方法中优先选择结果稳定性、重复性好、特异性高的技术, 同时也应考虑样本量, 检测项目的多少等, 综合选择合适的方法。

由于肿瘤组织的异质性, 检测的组织样本中混有大量正常组织、石蜡样本提取的 DNA 质量和数量有限, 就检测灵敏度而言, 目前 ARMS-PCR>焦磷酸测序>Sanger 测序。



在检测肿瘤基因突变时，不能一味追求检测方法的灵敏度，灵敏度高的检测方法对整个实验过程中的质控要求更为严格，需防止因污染而产生假阳性。

在肿瘤靶基因表达检测时，由于肿瘤样本的不可再生性，需谨慎选择使用的方法，如选用荧光定量PCR要求提取的总RNA量达1 $\mu$ g以上，如果肿瘤组织过小，提取的RNA量可能达不到检测要求，此时应考虑选用对样本量要求低的检测方法。

#### 5.2.4 检测项目

本指南根据检测靶分子（DNA 或 RNA）类型及基因表达调控机制类型的不同，将肿瘤个体化治疗检测项目分为基因突变、基因表达、融合基因、基因甲基化检测四个类型。所述检测项目均为目前在肿瘤临床诊疗中，经过严格的循证医学实验，且具有明确的临床应用价值，详见附录 1。实验室在开展肿瘤个体化检测项目时，应评估所开展的检测项目的科学性，并遵循实验室的质量管理相关规定。

#### 5.3 DNA 提取方法与质量控制

DNA 提取之前的病理质量控制非常重要，它决定了最终检测结果的可靠性。样本进行检测前均先行常规病理检查和诊断（HE 染色），必须经有经验的病理医师确定肿瘤细胞的百分比（肿瘤细胞 / 整张切片所有细胞，必要时应采取富集肿瘤细胞的方法，如手工刮取或显微切割法。选取以肿瘤细胞为主的、没有明显的坏死、黏液和炎性改变的组织进行检测。

肿瘤细胞比例尚无统一标准，理想情况下，石蜡样本中肿瘤细胞的比例不应低于 50%，新鲜样本不低于 25%，对于 ARMS 等敏感性较高的方法，肿瘤细胞的含量和比例可以低一些。具体视所采用的 DNA 提取方法和突变检测方法的敏感度等而定。

对于新鲜和冻存的手术组织样本，可采用常规的商品化 DNA 提取试剂盒。对于活检样本，推荐使用能提取石蜡包埋组织微量 DNA 的试剂盒。对于商品化核酸提取试剂盒，临床实验室在使用前，必须对其核酸提取纯度和效率进行评价。纯化的靶核酸的完整性可使用凝胶电泳将样本的核酸提取物与核酸标准品比较测定。

**核酸提取的产率：**可在  $A_{260}$  读数测定，DNA 可溶于 TE 溶液中，建议浓度控制在 50~100ng/ul，总量 20~40  $\mu\text{g}$  或以上。

**核酸纯度：**可通过提取物  $A_{260}/A_{280}$  比率判定，DNA 的比值为 1.8，RNA 的比值为 2.0。若 DNA 比值高于 1.8，说明制剂中 RNA 尚未除尽。RNA、DNA 溶液中含有酚和蛋白质将导致比值降低。

#### 5.4 RNA 提取方法与质量控制

RNA 提取常比较困难，尤其是保存年限较长的肿瘤组织，RNA 降解非常严重。造成 RNA 降解的原因有两个方面：RNA 核糖残基的 2' 和 3' 位置带有羟基，易被水解；生物体内和外部环境中存在大量 RNA 酶，并且 RNA 酶不易失活，高温后仍然能够正确折叠恢复活性。因此从样本的储存、RNA 的提取及保存，都需要格外小心，防范 RNase 对 RNA 的降解作用。

RNA 提取的经典方法是胍盐提取结合酚-氯仿抽提，石蜡样本或活检样本可使用商品化 RNA 提取试剂盒纯化。细胞或组织的彻底匀浆是 RNA 提取过程中关键的步骤，它能够防止 RNA 的损失和降解。匀浆的方法应根据细胞或组织的类型来选择。

**核酸提取的产率：**RNA 可溶于无 RNase 的纯水中，建议浓度控制在 100ng/ul 以上，总量达 30 $\mu\text{g}$  以上。

纯化后的 RNA 应测定 OD260/OD280 比值，RNA：1.7<OD260/OD280<2.0 (<1.7 时表明有蛋白质或酚污染；>2.0 时表明可能有异硫氰酸残存)，进行琼脂糖凝胶电泳观察有无 DNA 污染和 RNA 的完整程度。

#### 5.5 试剂的选择、储存及使用注意事项

临床检测试剂必须为 CFDA 批准的试剂，或具有严格标准操作规程 (SOP) 的自配试剂 (LDT)。

所采用的测定方法特异性好，灵敏度、准确度、精密度符合国家卫生计生委临床检验中心、IFCC、WHO 等推荐的方法性能。所用标准品或标准参考物符合国家卫生计生委临床检验中心推荐的标准和要求。

## 5.6 核酸扩增质量控制

临床 PCR 检测方法不但要求特异性好、灵敏度高、还要求具有高的可重复性、准确性，尽量降低假阳性、假阴性和非特异性扩增。临床样本扩增时，经常出现假阳性和假阴性，导致检测结果得出错误结论，有时可造成严重后果。

在核酸提取中，应至少带有 1 份已知弱阳性质控样本。其最后的检测结果，应是核酸提取和扩增检测有效性的综合反映。同时，还应至少带一份已知阴性质控样本，扩增测定的结果可以判断核酸提取过程中是否发生污染。

如靶核酸为 DNA，为判断 DNA 扩增的有效性，可使用 1 份已制备好的弱阳性靶 DNA 样本，直接与靶核酸同时扩增检测。如靶核酸为 RNA，则除了可用上述弱阳性 cDNA 判断 DNA 扩增有效性外，还可用已制备好的弱阳性 RNA 质控来判断反转录的有效性。另外，须设立阴性对照样品。阴性对照样品检测为阴性时，表明试验全部过程的试剂没有受到核酸污染。在阴性对照样品和阳性对照样品检测结果成立的前提下，才能对检测样品扩增结果进行判定。

## 5.7 设备维护和校准

实验室仪器的保养与维护是实验室实验技术人员的重要组成部分，仪器的保养与维护关系到仪器的适用率、数据的准确率。

仪器设备安装及技术性能验收需由项目负责人、仪器设备使用人、实验室技术人员共同完成，验收内容按采购合同中技术需求部分以服务协议书的要求逐项进行，并且建立仪器设备档案。

仪器设备应定期开展校准计量，未经计量检定、计量检定不合格或未验收的对测试有重要影响的仪器设备不得投入使用。

实验室日常工作中，应重视仪器设备的清洁及维护，做到日维护、周维护、月维护，并及时记录。

## 5.8 人员培训

检测人员应该有相关的教育背景、相应的工作经验，接受过专业培训。培训主要有内部和外部培训，内部培训包括所使用的试剂方法原理、仪器设备操作维护及校准、质量控制等，外部培训包括国家卫生计生委临床检验中心和国家卫生计生委个体化医学检测培训基地等机构组织开展的各种技术培训。

## 5.9 方法的性能验证

方法学引进初期需对检测系统测定项目各参数的实验或评估性验证，包括精密度、准确度、线性范围、临床可报告范围、特异性、检测下限、抗干扰能力等。

所有项目的方法验证应形成详细的资料备存，资料需详细描述方法验证的目的、过程、检测结果、分析判断及验证结论。验证的结果及结论须经实验室负责人签字后才能用于临床检测。根据项目的特性，一些方法验证指标不需进行或未进行时，需在报告中书面解释原因。推荐用打印的文稿并在专用文件夹保存。

具体的性能验证方法，如使用的是经 CFDA 批准的试剂，可参照试剂盒说明书上相应的性能指标部分进行验证，看是否能在其实验室内复现说明书所显示的上述性能指标。如为自制试剂或自建方法，则参考 LDT 技术指南进行性能评价，建立上述性能指标。以下方法可供参考。

### 【准确度】

- 1) 参加国家卫生计生委临检中心组织的室间质评，从室间质评统计结果评价实验室检测结果的偏倚或符合情况，从而评价和验证实验室检测结果的准确性。
- 2) 方法比较实验：当引进新方法与原有方法进行比较时，最少样本数为 20 例，用两种方法同时测定同样的样品。如结果有不符时，应采用第三种方法或试剂进行确认。
- 3) 检测已知值的标准物质，对于样本来源存在问题的检测方法，可以对已知值的样本稀释成不同浓度再检测，以评估其准确度。

### 【灵敏度】

- 1) 分析灵敏度：就是确定检测方法的检测下限：将一份已知定值的标准品，用野生型的基因组稀释突变型基因组，设定不同的突变含量，一直稀释到检测下限以下为止，平行检测 3 管，3 管全部检出且其线性  $|r| \geq 0.98$  的最低稀释浓度即为该方法的检测下限。（可根据实际情况在最低稀释浓度附近进行 10 倍以下的稀释）
- 2) 临床灵敏度：主要是验证方法的假阴性率。从三甲医院或专业权威检测机构收集 20~50 例样本，进行检测分析，其灵敏度应满足临床检测要求，灵敏度  $= [TB / (TB + FN)] \times 100$ （TB=true positive、FN=false negative）；有 CFDA 批文的检

测试剂，收集 20 例阳性样本进行验证；没有 CFDA 批文的检测试剂或自己实验室研发的 LDT 试剂，收集 50 例阳性样本进行验证，并应进行室间比对。

### 【特异性】

1) 特异性的验证主要是确认该方法的假阳性率，特异性= $[\text{TN}/(\text{TN}+\text{FP})] \times 100$  (TN=true negative、FN=false positive)。

2) 从三甲医院或专业权威检测机构收集 20~50 例阴性样本，进行检测分析，其特异性应满足临床检测要求。有 CFDA 批文的检测试剂，收集 20 例阴性样本进行验证；没有 CFDA 批文的检测项目或自己研发的项目，收集 50 例阴性样本进行验证。

## 6. 分析后质量保证

### 6.1 检测结果的记录

- 1) 检测结果的报告应准确、清晰、明确、客观和及时，杜绝虚假报告。
- 2) 仪器原始数据要仔细分析，根据质控品判断 PCR 扩增的有效性，只有当质控品的扩增结果符合项目 SOP 有关条件时，才可发出报告，否则应重新测定。
- 3) 患者档案及测定结果一并录入“检验管理系统”。报告内容至少应包括：实验室名称、患者姓名、性别、年龄、测定项目、检测方法、检测结果、参考范围、用药建议及样本号、样本类型、检测日期、实验操作者、审核者、报告日期、实验室联系方式等。否则视为无效或虚假报告单。

### 6.2 失控结果的记录与分析

如发现质控数据违背了控制规则，操作员应填写失控记录或失控报告单，上交实验室主管，由专业主管做出是否发出与失控质控品同批患者样本检测报告的决定。失控信号一旦出现就意味着与失控质控品同批患者样本报告可能作废。此时，首先要尽量查明引起失控的原因，如为假失控，可由实验室指定的资深人员决定、签字后发出报告。如为真失控，最好是纠正原因后，全部样本重新检测，质控品测定合格后再签字发出。

### 6.3 报告及解释

1) 报告的编写需要有严谨有效的流程，以确保检验信息的完整、有效、及时、正确，并保护患者的隐私。检测结果以检测报告单的形式发放，需提供纸质版检

测报告,有条件的检测实验室可以电子版的形式发放报告,并建立网络查询系统,送检医生通过登陆网站进行检测结果的查询。

2) 检验报告单的应具有患者基本信息、样本情况(采集、送检及检测时间、样本性质及状态等)、检测项目、检测方法、结果、结果的意义、用药建议、检测可能的局限性、检测单位联系方式、检测人员与报告审核人员签字,审核者应当是主管技师以上的工作人员、本专业实验室负责人、中级及以上的病理医师,审核者对检验报告的质量负责。

3) 结果解释的责任属于临床实验室,应根据所检测的人群解释结果。临床解释的责任属于临床医生,其应根据检测结果和临床信息向患者解释检测结果。综合临床分子诊断的实验数据和临床信息,为医师和患者描述此结果对疾病诊断的含义,为个体化用药提出建议。

#### **6.4 记录保留**

患者和样本信息:接收样本后,在“样本接收记录本”中记录患者和样本信息,对不符合检测要求的样本在“样本拒收登记本”上记录,并及时通知患者。

《样本检测申请单》最后保存于扩增区,至少1年以上;其它实验记录保存于各自实验操作区内,至少保存1年以上。《检测过程实验记录》保存于扩增区的专用文件柜内,以备查找。扩增过程中由荧光扩增仪产生的数据文件必须保存在非系统分区的专门文件夹中,定期做备份。

#### **6.5 检测后基因咨询**

实验室建立科学的、系统的检验结果解释方案,提供结果的解释意见。报告单上提供咨询服务的方式和途径,如客户服务专线,配置专业的咨询服务人员;方便临床医生和患者随时反馈意见和提出咨询。

#### **6.6 样本(及核酸)保留与处理**

肿瘤个体化治疗基因检测报告发出后的样本应尽可能较长期保存。实验室应制定样本储存制度对样本进行保存,建立样本储存的规章制度,做好样本的标识并按规定存放,保存好样本的原始标码,建立配套的样本存放信息管理系统。

样本的处理和相关材料的处理要符合《医疗废物管理条例》、《医疗卫生机构医疗废物管理办法》及国家、地区的相关要求。

## 6.7 检测与临床数据收集与分析

检测结果收集、整理分析和数据的管理也是保障临床基因检测质量的关键环节。临床的检测结果应定期统计分析，如基因突变的阳性率，如果发现阳性率高于资料报道值，应引起重视，考虑是否存在假阳性情况，如果阳性率偏低，应结合检测方法的局限性考虑假阴性的可能，并进行针对性的改进。

## 7. 肿瘤个体化治疗检测的质量保证

### 7.1 标准操作程序

原则上按照《个体化医学检测质量保证指南》的要求进行。肿瘤个体化治疗的检测 SOP，应包括试剂准备、样本采集、样本接收与预处理、核酸提取、检测方法、结果分析和报告、仪器操作、实验室安全措施等临床检验的所有环节。SOP 的编写应注意通俗易懂、注重细节、清晰明了、图文并茂。实验室工作人员应严格遵循 SOP 中的步骤要求进行操作，应每年定期根据实验室的运行状况进行 SOP 审核修订，对于文件的修订、废止、改版或更新，要按照规定的要求，合理且规范进行，并防止无效或作废版本文件使用。

### 7.2 质控品

检测质控品的建立是为了提高实验室检测结果的可靠性和可重复性，一般情况下，针对发现罕见的基因突变、实验运行异常、新批次的试剂与上一批次试剂的比对、储存条件或反应温度发生改变后的样本和试剂、验证整体测试可靠性的样本等，都应合理设置质控品。

#### 7.2.1 质控品类型

**阳性对照：**以含有目的片段的 DNA(或质粒) 作为模板进行扩增，证明 PCR 试剂是否有效、扩增过程是否正确。但阳性样品扩增效率高，应严格控制其浓度和存放位置，避免其成为潜在的污染源。例如，检测基因突变时，应根据选用的检测方法，选择该方法最低检测限的阳性样本。

**阴性对照：**以不含有目的片段的阴性样品作为模板进行扩增，用于证明扩增过程中无假阳性现象。

**空白对照：**以纯水作为模板进行扩增，用于证明扩增过程中无假阳性现象。

**PCR 抑制物对照：**在与阳性对照相同的反应体系中，加入相同数量的待测样品 DNA，如果未扩增出目的片段，证明此待测样品 DNA 中存在 PCR 抑制物。

空白提取对照：空白提取对照扩增结果为阳性，说明 DNA 提取试剂或过程中可能受到污染。

阳性提取对照：阳性提取对照扩增结果为阴性，说明提取过程可能有误。如果 DNA 阳性对照扩增结果为阴性，或者 DNA 阴性对照和空白对照扩增结果为阳性，则说明 PCR 试剂或扩增过程存在问题。

基因检测单核苷酸多态性（SNP）时，需要设置多个阳性对照用于检测野生型纯合子基因型、杂合子基因型，突变纯合子基因型。质控应尽可能模拟临床样本，如基质或采样方法与待测样本相同。

### 7.3 室内质量控制

原则上按照《个体化医学检测质量保证指南》的要求进行。建议按照以下原则设定室内质量控制：

（1）如果只检测 1 个基因突变，定性测定有一份接近 CUT-OFF(2~4 倍)的弱阳性和一份阴性质控样本即可。质控品的设置数量随检测样本数的增加而按比例适当增加，例如临床样本数量达到 50~60 份，则可将阳性和阴性质控样本的数量翻倍。质控品应随机放置在临床样本中间随同临床样本一起同时处理。

（2）当同时检测多个突变基因时，可以根据实验室自身的条件，可只设立能最灵敏地反映检测问题的 2 个或 3 个突变基因的阴阳性质控，下次检测改用跟上次不同的基因突变的阴阳性对照，依次类推，循环往复。另外，质控样本在扩增仪中的位置不应持续性的固定在同一个孔，而应在每次扩增检测时，进行相应的顺延，尽可能在一定时间内可以监测到每一孔的扩增有效性。

如果每次质控品的检测结果均成立，说明结果可信，报告可以发出；反之，就要对这种情况出现的原因进行分析。在找不到合理的解释的情况下，须将不符合的基因突变和其相应的对照重新检测。

此外，临床样本中每次检测阳性和阴性结果的出现频率，以及同一基因型或基因突变出现频率或连续出现频率等，均可作为提示实验室“污染”的质控指标。

### 7.4 室间质量评价

临床检测实验室应参加室间质评（EQA），详细、如实地记录参与 EQA 的全过程，根据反馈结果了解本实验室的能力、自查存在的问题，及时寻求改进方法，解决问题，完善实验室质量控制体系。



## 7.5 PCR 污染控制

由于肿瘤基因突变检测时必须设置阳性质控品，阳性样本加样时、PCR 扩增的产物可能成为 PCR 实验室的主要污染源，而 PCR 的敏感性和效率特别高，所以少量的扩增产物污染样本或反应管即可出现假阳性。尤其是 PCR 扩增产物和质粒分子很容易造成实验室的污染，导致假阳性现象发生。通过规范实验室设计、规范试剂耗材管理、规范实验室操作和技术处理来控制污染。

常见的 PCR 污染有样品间交叉污染、PCR 试剂的污染、PCR 扩增产物污染、气溶胶污染和实验室中克隆质粒的污染。

污染控制：规范实验室设计、规范试剂耗材管理、规范实验室操作和技术处理，如 PCR 扩增实验中使用 dUTP，而不用 dTTP。

## 附录 A：常见的检测项目

### A.1 基因突变检测项目

#### A.1.1 *EGFR* 基因突变检测

【基因简介】 *EGFR* 是原癌基因 *c-erbB1* 的表达产物，是表皮生长因子受体（HER）家族成员之一。HER 家族由 *EGFR/HER1/erbB1*、*HER2/neu/erbB2*、*HER3/erbB3* 及 *HER4/erbB4* 四个分子构成，在细胞的生长、增殖和分化等生理过程中发挥重要的调节作用。

【常见突变】 *EGFR* 的突变主要发生在胞内酪氨酸激酶（TK）区域的前四个外显子上（18~21），目前发现的 TK 区域突变有 30 多种。缺失突变主要发生在外显子 19 上，最常见的是 *del E746-A750*，替代突变最常见的是发生在外显子 21 上的 *L858R*，复制或插入突变发生在外显子 20 上。发生在外显子 20 上的替代突变 *T790M* 为耐药突变，研究还发现 *L858Q*、*D761Y*、*T854A* 等耐药突变。

【*EGFR* 基因突变和 *EGFR*-TKI 敏感性】 *EGFR*-TKI 的有效性也因突变类型而不同，外显子 19 缺失突变的有效率为 81%，*L858R* 的有效率为 71%，*G719X* 的有效率为 56%。吉非替尼初期有效的全部患者，在后期均产生耐药。其中 50% 患者是在 19 外显子缺失或 *L858R* 点突变等的敏感突变的基础上，又发生了第 790 位密码子苏氨酸向蛋氨酸的突变（*T790M*）。研究发现有约 1~3% 的患者在 TKI 治疗前即存在 *T790M*，即原发耐药，这种情况下 TKI 治疗难以有效。

【检测样本类型】 经 10% 中性福尔马林固定、石蜡包埋的非小细胞肺癌肿瘤组织。

【检测方法】 推荐 ARMS 或 Sanger 测序法进行 *EGFR* 突变检测，可考虑采用新一代测序技术同时进行肺癌驱动基因的检测。

【临床意义】 （1）预测药物疗效：*EGFR* 是 HER/ErbB 家族信号通路的首要分子，吉非替尼、厄洛替尼等小分子 TKI 进入细胞内，直接作用于 *EGFR* 胞内的激酶区，干扰 ATP 合成，抑制酪氨酸激酶的活性，阻断激酶的自身磷酸化及底物的磷酸化，彻底阻断异常的酪氨酸激酶信号传导，从而阻止配体介导的受体及下游信号通路的激活，阻滞细胞在 G1 期，促进凋亡，抑制新生血管形成、侵袭和转移，达到治疗的作用。小分子 TKI 的疗效与 *EGFR* 基因突变密切相关，是 TKI 疗效预测因子。

(2) 预后评价：根据是否使用 EGFR-TKI 对肺癌切除后患者进行预后分析，EGFR 敏感性突变并服用 TKI 的患者至少在单因素分析中有预后良好的趋势。但是，EGFR 基因突变与女性、非吸烟者等这些传统的预后良好因子有交叉，只分析基因突变进行预后评价几乎是不可能的。

**【用药建议】**(1) 吉非替尼、厄洛替尼等小分子酪氨酸激酶抑制剂的疗效与 EGFR 基因突变密切相关，特别是当第 19 外显子缺失、第 21 外显子突变 (L858R) 和第 18 外显子突变 (G719X) 的患者，使用吉非替尼、厄洛替尼等小分子 TKI 可获益。

(2) 约 1~3% 未经 TKI 治疗的 NSCLC 患者第 20 外显子存在 T790M 突变，但经 TKI 治疗后超过 50% 后耐药的患者出现 T790M 突变阳性，导致 TKI 治疗失败。也有报道认为 L747S、D761Y、T854A 突变阳性时，患者也会对吉非替尼、厄洛替尼等小分子酪氨酸激酶抑制剂耐药。

**【局限性】** 临床实践表明，并不是所有携有 EGFR 突变的 NSCLC 患者都对酪氨酸激酶抑制剂有效，EGFR-TKI 的有效性因突变类型而不同，如对外显子 19 缺失突变的肿瘤患者有效率为 81%，L858R 的有效率为 71%，G719X 的有效率为 56%，而有些患者发生第 20 外显子插入突变却对 TKI 无效。另外，约 10% 的 EGFR 野生型 NSCLC 患者对酪氨酸激酶抑制剂有效，但其机制尚不明确。

### A.1.2 KRAS 基因突变检测

**【基因简介】** 哺乳动物基因组中普遍存在三种 RAS 癌基因家族成员：*H-RAS*、*K-RAS*、*N-RAS*，这三种基因编码的蛋白质大约有 90% 的氨基酸同源序列，分子量均为 21kDa，故称为 RASp21 蛋白，其在功能上与 G 蛋白相似，可与二磷酸尿苷 (GDP) 结合为非活性状态，与三磷酸尿苷 (GTP) 结合为活性状态，RASp21 蛋白自身具有弱 GTPase 活性，位于细胞膜内侧参与跨膜信号传递作用。*KRAS* 基因是 RAS 基因家族中三种癌基因的一种，位于 12 号染色体上，含有 4 个编码外显子和 1 个 5' 端非编码外显子，共同编码含 189 个氨基酸的 RAS 蛋白。*KRAS* 是表皮生长因子受体功能信号的下游分子，属膜结合型 GTP / GDP 结合蛋白，通过 GTP 和 GDP 的相互转化作用有节制的调节 *KRAS* 基因对信号系统的开启和关闭，传递细胞生长分化信号。

**【KRAS 基因的常见突变】** KRAS 基因突变发生在肿瘤恶变的早中期，并且原发灶和转移灶的 KRAS 基因状态基本保持一致。目前研究发现，KRAS 基因在膀胱、乳腺、直肠、肾、肝、肺、卵巢、胰腺、胃，还有造血系统等均在一定频率的突变，其中以结直肠癌、胰腺癌和肺癌的发生率比较高，在胰腺癌组织高达 90% 以上，在肺癌中则以肺腺癌为主，突变率为 20~30%，结直肠癌患者突变率为 27~43%。当 KRAS 基因催化活性区突变时，该基因永久活化，不能产生正常的 RAS 蛋白，导致 RAS 蛋白不依赖 EGFR 受体激活而持续活化，造成 RAS 信号通路的异常活化，影响细胞的生长、增殖和分化，促进细胞的恶性转化，导致细胞增殖失控而癌变。

KRAS 基因最常见的突变方式为点突变，90% 的 KRAS 基因突变位于 2 号外显子的第 12 和 13 密码子位点，另有 1~4% 为第 61 和 146 密码子突变。其中结直肠癌中第 12 密码子（约 82%）是最常见的突变位点。一般中国人群样本检测数据 G12A 高于 G12S/C，西方人群相反。

**【检测样本类型】** 经 10% 中性福尔马林固定石蜡包埋的结肠癌/肺癌肿瘤组织，或者与原发灶具有同样病理形态的转移组织。

**【检测方法】** 可以采用 Sanger 测序法，也可采用灵敏度高的 ARMS-PCR 等。

**【临床意义】** 西妥昔单抗和帕尼单抗均通过直接抑制 EGFR 从而发挥抗肿瘤的作用，在结直肠癌和头颈部癌的靶向治疗中都有肯定的效果。西妥昔单抗治疗的有效性受其下游基因 KRAS 状态的影响，突变型的 KRAS 无需接受上游 EGFR 信号即能够自动活化该通路并启动下游信号的转导。因此只有 KRAS 基因野生型的患者才能从抗 EGFR 的治疗中获益，而突变型的患者则不能。

**【用药建议】** KRAS 野生型患者使用西妥昔单抗克隆抗体和帕尼单抗克隆抗体治疗效果确切，可显著提高患者的生存率和改善生活状态，建议使用；而 KRAS 的 2 号外显子的 12 号密码子和（或）13 号密码子或其他密码子任意突变型患者使用西妥昔单抗和帕尼单抗克隆抗体抗治疗无效，建议不使用该类药物。而在进行结肠癌靶向药物治疗时，应询问所有结肠癌患者的家族史，如果怀疑患者有遗传性非息肉病性结直肠癌(HNPCC)、家族性腺瘤性息肉病(FAP)和轻表型家族性腺瘤性息肉病(AFAP)，除非是进行临床试验，否则不应使用贝伐珠单抗克隆抗体、西妥昔单抗克隆抗体、帕尼单抗克隆抗体或伊立替康。

【局限性】临床实践表明，只有 50% 的野生型 *KRAS* 患者对抗 EGFR 治疗有效，提示 *EGFR* 下游信号通路其他分子的激活和变异可能影响了其治疗反应。因此，*KRAS* 基因突变的检测仅用于预测结直肠癌对抗 EGFR 靶向药物的治疗效果。

### A.1.3 *BRAF* 基因突变检测

【基因简介】*BRAF* 基因是 1988 年由 Ikawa 等首先在人类尤因肉瘤中发现并克隆确认的一种能转染 NIH3T3 细胞且有活性的 DNA 序列。*BRAF* 基因与 *ARAF*、*CRAF* 基因同属 RAF 家族，命名为鼠类肉瘤滤过性毒菌致癌同源体 B1，位于人染色体 7q34，长约 190kb，编码 783 个氨基酸的蛋白，相对分子质量为 84436，有 CR1、CR2 和 CR3 三个保守区。*BRAF* 是 Ras-Raf-MEK-ERK 信号转导通路重要的转导因子，具有功能的编码区由 2510 对碱基组成，主要通过有丝蛋白激酶通路中的丝氨酸苏氨酸蛋白激酶来发挥作用，该酶将细胞表面的受体和 RAS 蛋白通过 MEK 和 ERK 与核内的转录因子相连接，启动多种因子参与调控细胞内多种生物学事件，如细胞生长、分化和凋亡。研究表明，在多种人类恶性肿瘤中，如恶性黑色素瘤、结直肠癌、肺癌、甲状腺癌、肝癌及胰腺癌，均存在不同比例的 *BRAF* 突变。

【常见突变】*BRAF* 突变主要有两种类型：1.11% 位于 exon11 上的甘氨酸环，如 G463、G465、G468 的点突变；2.89% 的突变发生在 exon15 上的激活区，其中约 92% 位于第 1799 核苷酸上，T 突变为 A(T1799A 以前认为是 T1796A)，导致其编码的谷氨酸由缬氨酸取代(V600E 以前被认为是 V599E)。此外，仅不到 1% 的癌组织同时存在 *BRAF* 突变与 *RAS* 突变，且在这 1% 中，*BRAF* 突变几乎均为非 V600E 突变。以上两种类型的突变均能使 *BRAF* 激酶活性及 NIH3T3 细胞转化能力提高，但以后者更为重要。V600E 突变能模拟 T598 和 S601 两个位点的磷酸化作用，使 *BRAF* 蛋白激活。

【*BRAF* 突变与维罗非尼 (vemurafenib)】2011 年 FDA 批准维罗非尼用于治疗晚期 (转移性) 或不可切除的黑色素瘤，尤其是携有 *BRAF* V600E 基因变异肿瘤者。该药的安全性和疗效评估基于一项国际单中心研究。该研究纳入 675 例 *BRAF* V600E 变异的初治晚期黑色素瘤患者，入选者被随机分入维罗非尼组或达卡巴嗪组。结果显示，在维罗非尼组患者未达到中位生存期终点时 (77% 的患者生存)，

达卡巴嗪组患者中位生存期为 8 个月（64% 的患者生存）。该药最常见副作用为关节痛、皮疹、脱发、疲乏、恶心和皮肤光敏感。

中国黑色素瘤患者中 *BRAF* V600E 变异率接近 26%，虽然不如白种人（约 50%）的变异率高，但仍有可能通过这个药物治疗我国 1/4 黑色素瘤患者，因此该药物对于黑色素瘤患者的治疗有着十分重要的意义。

【检测样本类型】经 10% 中性福尔马林固定石蜡包埋的结肠癌肿瘤组织和黑色素瘤组织。

【检测方法】*BRAF* 基因突变的检测方法可以采用 Sanger 测序法，也可以使用 ARMS-PCR 等方法进行检测。

【临床意义】（1）*BRAF* 是位于 *KRAS* 下游级联信号通路上的一个重要蛋白，当 *BRAF* 基因发生突变后，其编码生成的蛋白产物无需接受上游信号蛋白的活化便始终处于激活状态，启动下游细胞信号转导途径，引起细胞增殖，从而使 EGFR 抑制剂西妥昔单抗克隆抗体和帕尼单抗克隆抗体等疗效减弱或无效。

（2）*BRAF* 基因可作为患者预后评价的独立性指标，*BRAF* V600E 突变患者呈现预后更差的趋势。

（3）*BRAF* V600E 基因突变的黑色素瘤患者对维罗非尼治疗有效。

【用药建议】（1）对于 *KRAS* 基因野生型但同时具有 *BRAF* 基因 V600E 突变的患者，抗 EGFR 单克隆抗体靶向药物治疗可能无效。（2）回顾性亚组分析显示，无论 *BRAF* 基因 V600E 是否存在突变，一线治疗采用抗 EGFR 单克隆抗体联合有效的化疗药物都有可能使患者获益。目前有限的研究数据提示，一线治疗后病情进展的患者，如果存在 *BRAF* V600E 突变，使用抗 EGFR 单克隆抗体的疗效欠佳。

（3）50% 以上表达 *BRAF*V600 突变的晚期黑色素瘤患者在维罗非尼治疗中可获得临床应答。

【局限性】（1）*BRAF* 基因突变的检测用于预测结直肠癌抗 EGFR 单克隆抗体靶向药物的治疗效果和预后，必要时必须结合 *NRAS*、*KRAS*、*PI3KCA* 等基因的突变的检测。（2）研究发现黑色素瘤患者 *BRAF* V600 突变位点外，如携带 *BRAF* L597 和 K601 突变可能对 *BRAF* 抑制剂药物维罗非尼药物治疗敏感，但目前还需进一步开展研究来证实这些发现。

#### A.1.4 *C-KIT* 基因突变检测

【基因简介】*C-KIT* 基因位于人染色体 4q11-21，属于原癌基因，其 cDNA 全长共 5230bp，含有 21 个外显子，编码一个 145KD 的跨膜酪氨酸激酶受体(tyrosine kinase receptor, RTK)蛋白，命名 CD117。第 1 号外显子编码起始密码子和信号肽，第 2-9 号密码子编码膜外配体结构域，第 10 号外显子编码疏水跨膜结构域，第 11-20 号外显子编码膜内结构域。其中 11 号外显子编码近膜区段。*C-KIT* 受体属于 III 型 RTK 家族，分布于细胞表面，可以用 CD117 单克隆抗体检测，与血小板衍生生长因子受体(platelet-derived growth factor receptors, PDGFR)有很强 的同源性。

【常见突变】多数胃肠道间质瘤(GIST)发生于 *C-KIT* 基因突变，*C-KIT* 突变主要发生在近膜区的外显子 11，然后是外膜区的外显子 9，酪氨酸区段的外显子 13、14、17 也可以发生突变。最近数据显示，约 8~50%的大肿瘤 GIST 中可观察到典型的突变，突变频率约 35%。在不同 GIST 中，*C-KIT* 基因突变型式并不完全一样，最常见为第 11 号外显子突变，导致其编码的近膜结构域的空间结构改变，消弱或丧失对激酶结构域的抑制功能。

【*C-KIT* 基因突变与伊马替尼疗效】甲磺酸伊马替尼(Imatinib mesylate)(商品名：格列卫)是一种口服的酪氨酸激酶抑制剂类药物，能够有效地选择性抑制所有类型的 abl 酪氨酸激酶活性，包括 v-abl、PDGFR 和 *C-KIT* 蛋白等。伊马替尼于 2001 年 5 月在美国上市，同年 11 月在欧洲上市，并于 2002 年 4 月在中国上市。最初被应用于费城染色体阳性的(Ph+)慢性粒细胞白血病(CML)的治疗，之后被批准用于胃肠道间质瘤的治疗，使得 GIST 治疗进入了分子靶向时代。

一般认为 *C-KIT/PDGFR* 突变类型可以预测伊马替尼的疗效，其中 *C-KIT* 外显子 11 突变者的疗效最佳；*PDGFR* D842V 突变可能对伊马替尼与舒尼替尼原发耐药。舒尼替尼治疗 GIST 原发 *C-KIT* 外显子 9 突变者和 *C-KIT* 野生型者优于 *C-KIT* 外显子 11 突变患者；治疗继发性 *C-KIT* 外显子 13、14 突变患者疗效优于继发 *C-KIT* 外显子 17、18 突变者。

CSCO 胃肠间质瘤专家委员会推荐存在以下情况时，应该进行基因学分析：  
①所有初次诊断的复发和转移性 GIST，拟行分子靶向治疗；②原发可切除 GIST 手术后，中-高度复发风险，拟行伊马替尼辅助治疗；③对疑难病例应进行 *C-KIT*

或 *PDGFRA* 突变分析，以明确 GIST 的诊断；④鉴别 NF1 型 GIST、完全性或不完全性 Carney's 三联征、家族性 GIST 及儿童 GIST；⑤鉴别同时性和异时性多原发 GIST。

检测基因突变的位点，至少应包括 *C-KIT* 基因的第 9、11、13 和 17 号外显子及 *PDGFRA* 基因的第 12 和 18 号外显子。由于大多数 GIST（65~85%）的基因突变发生在 *C-KIT* 基因的第 11 号或第 9 号外显子，对于经济承受能力有限的患者，在鉴别诊断时，可以优先检测这两个外显子；但是，对于继发耐药的患者，宜增加检测 *C-KIT* 基因的 13、14、17 和 18 外显子。

**【检测样本类型】** 经 10% 中性福尔马林固定石蜡包埋的 GIST 肿瘤组织。推荐检测的样本类型为治疗前的原发癌肿瘤组织或转移的肿瘤组织。

**【检测方法】** *C-KIT* 基因突变的检测方法可以采用 Sanger 测序法、ARMS-PCR 等方法检测特定的突变位点。

**【临床意义】**（1）辅助诊断和预测疗效：伊马替尼是一种酪氨酸蛋白酶抑制剂，能阻断酪氨酸蛋白激酶 KIT 受体功能，从而抑制肿瘤的形成。已有研究证实，*C-KIT* 基因突变的位置能影响肿瘤患者对伊马替尼、舒尼替尼等酪氨酸激酶抑制剂的反应。通过检测 *C-KIT* 基因的突变状态，协助 GIST 诊断，也可以进一步的明确诊断 CD117 阴性的患者，诊断家族性 GIST，评价小儿 GIST，指导化疗，预测化疗的效果。（2）预后评价：当 *C-KIT* 基因第 11 外显子发生突变后，患者预后较发生于 *C-KIT* 基因其他外显子或 *PDGFRA* 基因突变的患者或者未检测到 *C-KIT* 基因或 *PDGFRA* 基因突变的患者预后更差。来源于小肠或结肠的 GIST 如发生 *C-KIT* 基因第 9 外显子突变，较发生 *C-KIT* 基因第 11 外显子突变者更具有侵袭性。

**【用药建议】**伊马替尼、舒尼替尼等酪氨酸激酶抑制剂与 *C-KIT* 基因突变密切相关，对发生于外显子 9、11、12 和 17 的原发性突变患者，使用伊马替尼、舒尼替尼等酪氨酸激酶抑制剂时，患者可从抗 C-TKI 靶向药物治疗中获益。当发生位于第 13、14、17、18 外显子的继发性突变时，则使用伊马替尼、舒尼替尼等酪氨酸激酶抑制剂出现耐药。

**【局限性】**由于存在肿瘤异质性，或肿瘤组织中混有大量正常组织，或坏死组织过多等，均有可能导致假阴性结果的产生。同时还有部分患者无法提供检测所需



的组织样本，或组织样本无法满足检测的基本要求，或患者病情发展及治疗过程中会发生 *C-KIT* 基因状态的变化，均可导致治疗的失败。此外，*C-KIT* 基因的突变与伊马替尼、舒尼替尼等酪氨酸激酶抑制剂敏感性之间的关系因人而异。伊马替尼、舒尼替尼等酪氨酸激酶抑制剂在体内的代谢受 *CYP450 3A4* 状态的影响，因此即使 *C-KIT* 基因突变阳性的患者，伊马替尼、舒尼替尼等酪氨酸激酶抑制剂亦不一定能达到预期临床疗效，需要考虑其他因素的干扰。

#### **A.1.5 PDGFRA 基因**

**【基因简介】**PDGFR 是分子量为 180kD 的单链膜糖蛋白，细胞外配体结合区含 5 个免疫球蛋白样结构域，具保守的半胱氨酸残基，单一跨膜片段；胞内的酪氨酸激酶区断裂处，为亲水氨基酸插入序列。受体分子由  $\alpha$ ， $\beta$  两种亚基组成，成熟后的 PDGFR 以二聚体稳态形式 ( $\alpha\alpha$ ， $\alpha\beta$ ， $\beta\beta$ ) 与配体 PDGF (platelet-derived growth factor, PDGF) 相应异构体 (PDGF-AA, AB, BB) 结合。结直肠癌组织中 PDGFR  $\alpha$  和 PDGFR  $\beta$  均有表达分布，PDGFR  $\alpha$  分布于结直肠正常组织、息肉组织及肿瘤组织上；PDGFR  $\beta$  表达于肿瘤细胞、肿瘤间质细胞和微血管细胞（包括微血管周细胞）上。

**【PDGFRA 基因的突变】**PDGFRA 基因突变常见于 GIST、胶质母细胞瘤、恶性外周神经鞘等肿瘤，其中 GIST 中 PDGFRA 基因突变率在 5~10% 左右，突变主要发生于 PDGFRA 基因的近膜端区域 (外显子 12) 和激酶区 (外显子 14 和外显子 18)，突变频率分别为 0.8% 和 3.9%，其中以外显子 18 突变为主。PDGFRA 常见突变类型见。PDGFRA 基因突变后则通过活化 AKT、MAPK 及 STAT 蛋白中 STAT1 和 STAT3 发挥作用。也有研究发现活化的 A-Raf 激酶能调节 PLCG1 经 PDGFR 依赖途径的信号转导，也能调节 PI3K 经 PDGFR 非依赖的信号转导。

**【检测样本类型】**经 10% 中性福尔马林固定石蜡包埋的肿瘤组织。推荐检测的样本类型治疗前的原发性肿瘤组织或转移的肿瘤组织。

**【检测方法】**PDGFRA 基因突变的检测方法可以采用 Sanger 测序法、ARMS-PCR 等方法检测特定的突变位点。

**【临床意义】**(1) 辅助诊断和预测疗效：伊马替尼是一种酪氨酸蛋白酶抑制剂，能阻断酪氨酸蛋白激酶 KIT 受体功能，从而抑制肿瘤的形成。已有研究证实，PDGFRA 基因突变的位置能影响肿瘤患者对伊马替尼、舒尼替尼等酪氨酸激酶

抑制剂的反应。研究表明，*PDGFRA* 基因外显子 12 和外显子 18 大部分基因位点突变后使用伊马替尼、舒尼替尼等酪氨酸激酶抑制剂治疗时 GIST 患者可从中获益。但如外显子 18 基因位点发生 D842V、RD841-842KI 或 D1842-843IM 突变使用伊马替尼、舒尼替尼等酪氨酸激酶抑制剂治疗时 GIST 患者不能从中获益。

(2) 预后评价：当 *PDGFRA* 基因发生突变后，肿瘤侵袭性较发生于 *KIT* 基因突变的患者侵袭性低。

**【用药建议】**伊马替尼、舒尼替尼等酪氨酸激酶抑制剂与 *PDGFRA* 基因突变密切相关，对发生于外显子 12 中的 Tyr555Cys 和 Asp561Val 突变及外显子 18 中的 Asp846Tyr 等突变患者，使用伊马替尼、舒尼替尼等酪氨酸激酶抑制剂时，患者可从中获益。当位于第 18 外显子中的 D842V、RD841-842KI 和 D1842-843IM 突变时，使用伊马替尼、舒尼替尼等酪氨酸激酶抑制剂则出现耐药。

**【局限性】**由于存在肿瘤异质性，或肿瘤组织中混有大量正常组织，或坏死组织过多等，无法避免假阴性结果的产生。同时还有部分患者无法提供检测所需的组织样本，或组织样本无法满足进行检测的基本要求，或患者病情发展及治疗过程中会发生 *PDGFRA* 基因状态的变化，均可导致治疗的失败。此外，*PDGFRA* 基因突变与伊马替尼、舒尼替尼等酪氨酸激酶抑制剂敏感性之间的关系因人而异。同时伊马替尼、舒尼替尼等酪氨酸激酶抑制剂在体内的代谢受 CYP450 3A4 状态的影响，即使检测到了 *PDGFRA* 基因的突变，使用伊马替尼、舒尼替尼等酪氨酸激酶抑制剂不一定能达到预期临床疗效，需要考虑其他因素的干扰。

## A.2 基因表达检测项目

### A.2.1 *HER2* 基因表达

**【基因简介】**原癌基因 *HER2* 位于染色体 17q21，习惯上称为 *HER2 / neu* 基因或 *c-erbB-2* 基因。编码分子量 185kD 的跨膜蛋白，因此又被称为 p185 *HER2*，是具有跨膜酪氨酸激酶活性的生长因子受体。*HER2* 受体介导的信号通路是一个复杂的网络系统，包括输入细胞层(配体或生长因子)、信息加工层(受体，SH2 蛋白，转录因子)和输出层(细胞生长，分化和转移)。配体介导受体的二聚体是关键，使该信号系统能够传递多种生物信息，而缺乏特异性配体的 *HER2* 在整个信号网络中起调节作用。信号转导涉及的主要通路包括：Ras、Raf-Mek-MAPK、PBK、

Akt 激酶、cAMP(蛋白激酶 A)、磷脂酶 C-r 和 src 等。HER2 通过这些信号转导通路使细胞增殖周期变短，恶性表现增强和抗凋亡。

**【HER2 基因过表达与乳腺癌等】**HER2 基因在乳腺癌、膀胱癌、结直肠癌、胃癌和非小细胞肺癌等中均存在表达上调。许多研究资料表明，在 20~30%的乳腺癌中存在 HER2 基因明显扩增或过表达，临床上 HER2 基因过表达的乳腺癌患者往往表现出生存率低、肿瘤恶性程度增强、进展迅速、易于发生淋巴结转移、化疗缓解期缩短，并对他莫昔芬(Tamoxifen)和很多细胞毒性化疗药耐药等，但对大剂量蒽环类、紫杉类药物疗效好。由于 HER2 基因位于细胞表面，易被抗体接近，故 HER2 基因可作为抗肿瘤治疗的一个靶点。

**【检测样本类型】**经 10%中性福尔马林固定石蜡包埋的乳腺癌肿瘤组织。治疗前的原发肿瘤组织或转移的肿瘤组织。

**【检测方法】**对 HER2 基因表达的检测方法可以采用 FISH、IHC、扩增显色原位杂交 (CISH) 等，目前也有实验室使用荧光定量 PCR 等方法进行检测，但该方法用于检测 HER2 基因的表达尚未得到认可。一般来说，实验室首先采用 IHC 方法进行 HER2 蛋白检测，如果检测结果为 2+，则进行原位杂交(FISH)方法进行 HER2 基因检测确认。

#### **【结果判读】**

免疫组织化学 (IHC) 检测：

- 1) 3+，HER2 表达阳性；
- 2) 1+或阴性，表达阴性；
- 3) 2+时则需要进行 FISH 检测。

FISH 检测：

- 1) HER2 与 CEPI7 信号数比值： $\geq 2.0$  为阳性，有 HER-2/neu 基因扩增；
- 2) HER2 与 CEPI7 信号数比值： $< 2.0$  时，
  - 若 HER2 拷贝数 $\geq 6.0$  为阳性，有 HER-2/neu 基因扩增；
  - 若 HER2 拷贝数 $< 4.0$  为阴性，无 HER-2/neu 基因扩增；
  - 若 HER2 拷贝数 $\geq 4.0$ ，但 $< 6.0$  时为不确定，不能确定 HER-2/neu 基因状态。
- 3) 若众多信号 HER2 信号连接成簇时可不计算，即视为基因扩增。

**【临床意义】**准确分析 *HER2* 基因扩增状态是乳腺癌患者预后判断及制订有效治疗方案的先决条件，对乳腺癌的诊疗具有重要的指导作用。

(1) 预后评价：研究显示，*HER2* 基因的过表达除了与肿瘤的发生发展相关外，还是一个重要的临床预后指标，主要表现为 *HER2* 基因扩增的乳腺癌浸润性强、无进展生存期(*progress free survival*、*PFS*)短、预后差。而且这部分患者就诊时的肿瘤负荷更大，淋巴结转移的几率更高，激素受体阴性的比例更高、组织学分级更差、肿瘤的增殖指数更高、复发风险更高。但没有证据显示 *HER2* 基因扩增与导管原位癌(*ductal carcinoma in situ*，*DCIS*)的预后相关。

(2) 内分泌药物疗效预测：研究显示，相对于无 *HER2* 基因扩增的乳腺癌患者而言，*HER2* 基因扩增的患者应用他莫昔芬治疗后的死亡风险明显增高，因此这类乳腺癌患者可能不适合选择他莫昔芬作为内分泌治疗，而且 *HER2* 基因扩增的乳腺癌患者对 *CMF* 化疗方案的反应性降低，宜采用高剂量的蒽环类药物方案。

(3) 靶向药物疗效预测：大量临床研究数据提示，使用曲妥珠单克隆抗体等治疗乳腺癌时，无论是与常规化疗联合用于乳腺癌患者的辅助治疗，还是用于辅助治疗后的维持治疗，及用于晚期乳癌患者的单药或联合治疗，都能肯定改善 *HER2* 基因扩增或蛋白过表达患者的生存，使乳腺癌患者获益。

即使在使用曲妥珠单抗治疗过程中出现疾病进展而需要进一步治疗的乳腺癌患者，继续使用曲妥珠单抗治疗仍然有效。而对于 *HER2* 基因低度扩增或不扩增的乳腺癌患者，使用曲妥珠单抗疗效不佳。

**【用药建议】**曲妥珠单抗及拉帕替尼等酪氨酸激酶抑制剂等乳腺癌靶向药物治疗乳腺癌的疗效与 *HER2* 基因表达状态密切相关，当 *HER2* 基因扩增时，使用曲妥珠单抗和拉帕替尼等酪氨酸激酶抑制剂时，患者可从抗 *HER2* 靶向药物治疗中获益。但如果发生 *PI3KCA* 基因突变、*PTEN* 基因失活及 *HER2* 基因某些位点发生突变时，则会对曲妥珠单抗和拉帕替尼等酪氨酸激酶抑制剂耐药。

**【局限性】**由于方法学本身的局限性，*IHC* 和 *FISH* 得出的均有不确定结果，无法对 *HER2* 基因状态做出明确判断。即使经 *IHC* 或 *FISH* 判断为 *HER2* 基因过表达的患者也未必一定能从靶向治疗中获益，导致这种现象的原因可能是检测体系本身所造成的假阳性，也可能是 *HER2* 基因的信号通路中还存在其他异常的位

点。其次肿瘤异质性的存在导致 IHC 和 FISH 均无法避免假阴性结果的产生。还有部分患者无法提供检测所需的组织样本, 或组织样本无法满足进行检测的基本要求, 或患者病情发展及治疗过程中会发生 *HER2* 基因状态的变化, 而 IHC 和 FISH 均无法对患者的 *HER2* 基因状态进行动态、实时的监测。

### A.3 融合基因检测项目

#### A.3.1 *EML4-ALK* 融合基因检测项目

【基因简介】*ALK*, 即人类间变性淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase, *ALK*), 于 1994 年首先发现于间变性大细胞淋巴瘤 AMS3 细胞株中, 是由 1620 个氨基酸组成的跨膜蛋白, 属于胰岛素受体家族。*EML4* 是人类棘皮动物微管相关蛋白样 4(echinoderm microtubule-associated protein-like 4, *EML4*), 属于棘皮动物微管相关蛋白样蛋白家族, 由 N 末端碱基区、疏水的棘皮动物微管相关蛋白区(hydrophobic echinoderm microtubule-associated protein-like protein, *HELP*)及 WD 重复区三部分构成。该融合基因定位于 2 号染色体的短臂上(2p21 和 2p23), 其 5' 端为 *EML4* 的片段, 3' 端为 *ALK* 的片段, 由倒置后的 *EML4* 基因片段与残余的 *ALK* 片段连接。该融合基因拥有 *EML4* 基因中的 *BASIC* 区域, 疏水的棘皮动物微管相关蛋白区及部分 WD 重复区(后两部分在部分亚型中缺失)和 *ALK* 基因中的 *Kinase* 功能区。*EML4-ALK* 的信号转导通路为 PI3-K/Akt、STAT3/5、Ras-MEK 和 PLC- $\gamma$ /PIP2 等, 这些通路于细胞存活、增殖和迁移密切相关。

【*EML4-ALK* 融合与克唑替尼】克唑替尼是一种酪氨酸激酶受体抑制剂, 靶向分子包括 *ALK*、肝细胞生长因子受体(HGFR, *c-Met*)和 ROS1, 于 2011 年获得美国食品和药品管理局(FDA)批准用于治疗间变型淋巴瘤激酶(*ALK*)基因重排的非小细胞肺癌(NSCLC)。*EML4-ALK* 基因融合可促使 *ALK* 基因引起致癌融合蛋白的表达。*ALK* 融合蛋白形成可引起基因表达和信号的激活和失调, 进而促使表达这些蛋白的肿瘤细胞增殖和存活。克唑替尼在肿瘤细胞株中对 *ALK* 和 *c-Met* 在细胞水平检测的磷酸化具有浓度依赖性抑制作用, 对表达 *EML4-ALK* 或 *NPM-ALK* 融合蛋白或 *c-Met* 的异种移植荷瘤小鼠具有抗肿瘤活性在 NSCLC 患者中, *ALK* 重排的阳性率大约为 3~5%, 在腺癌、从未吸烟或少量吸烟的患者中 *EML4-ALK* 融合的几率高。

**【检测样本类型】**经 10% 中性福尔马林固定、石蜡包埋的非小细胞肺癌肿瘤组织。推荐检测的样本为治疗前的原发癌肿瘤组织或转移的肿瘤组织

**【检测方法】***EMIA-ALK* 融合基因的检测方法有 FISH、IHC、荧光定量 PCR 等，推荐的检测方法为 FISH。

**【临床意义】**（1）预测药物疗效：*EMLA-ALK* 融合基因阳性的 NSCLC 患者接受以铂类为基础的化疗，其有效率、疾病进展时间和总生存期与 EGFR 突变阳性 NSCLC 患者相似。相反，*EML4-ALK* 融合基因阳性患者不能从 EGFR-TKI 的基础治疗中受益，表现为原发耐药，治疗结果与无 EGFR 基因突变的患者相似。而针对 *EML4-ALK* 融合基因阳性的患者，使用克唑替尼等针对 ALK 基因的小分子抑制剂可以获得良好的临床治疗效果。因此在使用针对 ALK 基因的小分子抑制剂前，需进行 *EML4-ALK* 融合基因突变的检测。

**【用药建议】**针对 ALK 基因的小分子抑制剂疗效与 *EML4-ALK* 融合基因密切相关，当存在 *EML4-ALK* 融合基因时，可以考虑使用针对 ALK 基因的小分子抑制剂治疗如克唑替尼，患者可以从中获益，而不应给予吉非替尼、厄洛替尼等 EGFR-TKI 类药物，患者不会从中获益。

**【局限性】**由于 *EML4-ALK* 融合基因检测方法 FISH、IHC 和 RT-PCR 检测的灵敏度不足及检测样本受正常组织干扰等因素的影响，容易造成检测结果的假阴性。同时 *EML4-ALK* 融合基因各种亚型患者在接受克唑替尼治疗时是否存在疗效差异尚不明确，也有待进一步研究。因此，使用克唑替尼治疗 *EML4-ALK* 融合基因阳性的 NSCLC 患者时，需要定期监测疗效。

## A.4 基因甲基化检测项目

### A.4.1 MGMT 基因甲基化检测

**【基因简介】**人 *MGMT* 基因稳定地存在于所有正常组织细胞内，其编码的 MGMT 蛋白以分布在人体肝脏的活性最高，其次为淋巴结和肠道，骨髓细胞中的活性最低。MGMT 蛋白在不需要任何辅助因子或其他蛋白质的条件下，可以催化 DNA 分子中鸟嘌呤 O<sup>6</sup> 位上的烷基转移至 *MGMT* 本身第 145 位的半胱氨酸残基上，鸟嘌呤损伤修复，DNA 的结构和功能得以恢复。同时，这种催化作用是一种不可逆的反应，*MGMT* 作用后由于获得烷基而失活，因此这种酶又是一种自杀蛋白。正常情况下，细胞内 *MGMT* 具有解除烷化剂对细胞的致癌作用和消除烷化类药

物对于细胞毒性杀伤作用的双重生物学功能，而细胞对 DNA 鸟嘌呤 O<sup>6</sup> 位上烷基化修复能力的大小通常取决于 MGMT 在细胞内的含量和合成的速率。

**【MGMT 基因启动子甲基化】**影响机体 MGMT 含量和活性的因素有很多，环境因素、机体器官状态和基因状态等。其中基因调节是影响 MGMT 蛋白含量和活性的主要因素，MGMT 基因启动子甲基化是 MGMT 最常见的异常，多发生于 MGMT 启动子 CpG 岛，导致该基因转录停止，表达减少。许多肿瘤如脑胶质瘤、结直肠癌、肺癌、乳腺癌中存在 MGMT 基因甲基化并均可观察到 MGMT 启动子异常甲基化，启动子甲基化与 19 号染色体长臂丢失或 19 号染色体长臂与 1 号染色体短臂杂合丢失有关。如 p53 基因突变后能导致肿瘤细胞 MGMT 表达减少，活性降低。许多机体环境因素也影响 MGMT 蛋白的含量和活性，如乙基亚硝基脲、吸烟等可以使肝细胞中的 MGMT 蛋白表达量和活性明显增加。MGMT 启动子发生甲基化的患者才可以从替莫唑胺治疗中受益。

**【结果解释】**正常人群基因组中 MGMT 基因启动子 CpG 位点为非甲基化状态，如果检测到基因组中存在 MGMT 基因启动子 CpG 位点的甲基化，提示 MGMT 基因编码 MGMT 蛋白的功能下降或 MGMT 活性降低。

**【检测样本类型】**经 10% 中性福尔马林固定石蜡包埋的脑胶质瘤肿瘤组织或者病理确证的活检组织。推荐检测的样本类型为治疗前的原发癌肿瘤组织。

**【检测方法】**MGMT 基因启动子甲基化的检测方法建议采用 MSP (methyl-specific polymerase chain reaction, 甲基化特异的 PCR)、甲基化特异性焦磷酸测序、HRM 等方法。

**【临床意义】**(1) 疗效预测：MGMT 启动子发生甲基化的患者明显比未发生甲基化的患者使用烷化剂的疗效好，其总体生存率和无进展生存率更高。MGMT 启动子区甲基化对胶质瘤一线化疗药物 TMZ 治疗胶质瘤的化疗疗效具有预测价值，且是独立的预后较好的指示指标。MGMT 启动子未甲基化者从 TMZ 常规治疗方案中获益较小，应对这类患者采用更有效的有助于克服耐药的其他化疗方案。(2) 预后评价：40% 脑胶质瘤患者有 MGMT 启动子甲基化，甲基化程度越高，预后越差，其对肿瘤的预后和生存期的预示作用较肿瘤的分级、临床、年龄等其他特征更有效。

**【用药建议】**TMZ 等烷化剂疗效与 *MGMT* 启动子区域甲基化状态密切相关，对发生了 *MGMT* 启动子区域甲基化的患者，且发生甲基化比例越高的患者，使用 TMZ 烷化剂治疗时，患者可从中获益。如未发生 *MGMT* 启动子区域甲基化的患者，使用 TMZ 烷化剂治疗则出现耐药。

**【局限性】**由于脑部肿瘤的特殊性，限制了肿瘤组织的来源，同时肿瘤组织的异质性、大量坏死组织或大量正常组织的存在，干扰了检测结果，导致检测结果的假阴性。同时，*MGMT* 启动子区域甲基化程度与 TMZ 烷化剂的疗效之间的关系尚未阐明，*MGMT* 基因表达水平也影响了 TMZ 烷化剂的疗效，且 TMZ 疗效也受其他因素的影响，因此尚不能根据 *MGMT* 启动子甲基化状态判断 TMZ 的疗效，仅仅是根据是否存在甲基化对 TMZ 的疗效进行预测。



**参考文献:**

- [1] Molecular Methods for Clinical Genetics and Oncology Testing; Approved Guideline—Third Edition MM01-A3
- [2] Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline MM13-A
- [3] Quality Management for Molecular Genetic Testing; Approved Guideline MM20-A
- [4] Comparison of immunohistochemistry with fluorescence in situ hybridization in determining the human epidermal growth factor receptor 2 status of breast cancer specimens: a multicenter study of 3 149 Chinese patients. Chin Med J 2014;127 (2): 246-253
- [5] 李艳, 李金明. 《个体化医疗中的临床分子诊断》 人民卫生出版社 2013 年 8 月
- [6] NCCN 临床实践指南: 非小细胞肺癌 (2015.V1)
- [7] NCCN 临床实践指南: 结直肠癌 (2015.V1)
- [8] NCCN 临床实践指南: 乳腺癌 (2015.V1)