

- [14] Langerak AW, Groenen PJ, Brüggemann M, et al. EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations[J]. *Leukemia*, 2012, 26(10): 2159-2171. DOI: 10.1038/leu.2012.246.
- [15] Scheijen B, Meijers R, Rijntjes J, et al. Next-generation sequencing of immunoglobulin gene rearrangements for clonality assessment: a technical feasibility study by EuroClonality-NGS[J]. *Leukemia*, 2019, 33(9): 2227-2240. DOI: 10.1038/s41375-019-0508-7.
- [16] Evans PA, Ch P, Groenen PJ, et al. Significantly improved PCR-based clonality testing in B-cell malignancies by use of multiple immunoglobulin gene targets. Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936[J]. *Leukemia*, 2007, 21(2): 207-214. DOI: 10.1038/sj.leu.2404479.
- [17] Brüggemann M, White H, Gaulard P, et al. Powerful strategy for polymerase chain reaction-based clonality assessment in T-cell malignancies Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4 CT98-3936[J]. *Leukemia*, 2007, 21(2): 215-221. DOI: 10.1038/sj.leu.2404481.
- [18] 中华医学会病理学分会, 国家病理质控中心. BRCA1/2 数据解读中国专家共识(2021版)[J]. *中华病理学杂志*, 2021, 50(6): 565-571. DOI: 10.3760/cma.j.cn112151-20201027-00809.
- [19] 中华医学会病理学分会, 中华医学会泌尿外科学分会, 国家病理质控中心. 前列腺癌同源重组修复基因检测及变异解读专家共识[J]. *中华病理学杂志*, 2022, 51(10): 941-949. DOI: 10.3760/cma.j.cn112151-20220310-00162.
- [20] 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, 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.
- [21] 中国合格评定国家认可委员会. 分子诊断检验程序性能验证指南[S]. 2019.
- [22] 中华人民共和国卫生部. 肿瘤个性化治疗检测技术指南(试行)[S]. 2019-04-18.

## 非小细胞肺癌融合基因检测临床实践 中国专家共识(2023版)

中国抗癌协会肿瘤病理专业委员会 中华医学会肿瘤学分会肺癌专家委员会 国家病理质控中心

执笔人: 李卫华(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, 北京 100021); 李子明(上海市胸科医院 上海交通大学附属胸科医院肿瘤科, 上海 200030)

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, 北京 100021), Email: jmying@cicams.ac.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, 上海 200030), Email: shunlu@sjtu.edu.cn; 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, 北京 100730), Email: liangzhiyong1220@yahoo.com

**【摘要】** 基因融合是非小细胞肺癌中一类重要的分子变异。近十余年来, 针对融合基因的靶向治疗进展迅速, 为特定融合基因阳性患者带来显著临床获益。然而, 基因融合形成机制多样, 检测方法众多, 不同方法各有优缺点, 在临床分子检测中相对复杂。本文旨在从融合基因检测的临床意义、适用人群、常见融合基因的共性和特性、常用检测方法优缺点和检测策略优化等多个角度出发, 基于

DOI: 10.3760/cma.j.cn112151-20221111-00946

收稿日期 2022-11-11 本文编辑 常秀青

引用本文: 中国抗癌协会肿瘤病理专业委员会, 中华医学会肿瘤学分会肺癌专家委员会, 国家病理质控中心. 非小细胞肺癌融合基因检测临床实践中国专家共识(2023版)[J]. *中华病理学杂志*, 2023, 52(6): 565-573. DOI: 10.3760/cma.j.cn112151-20221111-00946.



国内外临床检测实践,达成非小细胞肺癌融合基因检测的中国专家共识,以规范融合基因的分子检测,精准筛选适合特定靶向治疗的患者人群。

实践指南注册:国际实践指南注册与透明化平台,PREPARE-2022CN815

### Expert consensus on clinical practice of fusion genes detection in non-small cell lung cancer in China (2023 version)

Molecular Pathology Collaboration Group of Tumor Pathology Committee of China Anti-Cancer Association, Chinese Medical Association Chinese Society of Oncology, 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; Lu Shun (Department of Oncology, Shanghai Chest Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China), Email: shunlu@sjtu.edu.cn; Liang Zhiyong (Department of Pathology, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100730, China), Email: liangzhiyong1220@yahoo.com

Practice guideline registration: Practice Guideline Registration for Transparency, PREPARE-2022CN815

融合基因是指两个不同基因的部分或全部序列相连形成的新的混合基因,其编码产生的融合蛋白能够介导肿瘤的发生发展。在非小细胞肺癌(NSCLC)中,基因融合作为一类重要的分子变异,是靶向治疗的理想靶点,因此,精准检测NSCLC中的基因融合以筛选可从相应靶向治疗中获益的患者至关重要。但由于基因融合的形成机制多样,检测平台众多,其临床检测相对复杂,不同基因在检测上存在共性和特性,现有相关指南和共识或仅针对单个基因的检测,或针对整个NSCLC驱动基因变异谱的检测,缺乏针对融合基因、涵盖其共性和特性的检测临床实践共识意见,故不足以为融合基因的临床分子检测提供全面的指导和建议。因此,由具有丰富理论和检测实践经验的临床与病理专家共同发起并制定本共识,旨在为NSCLC融合基因的精准检测提供指导和帮助。

本共识制定计划已在国际实践指南注册平台(<http://www.guidelines-registry.org/>)注册。基于国内外临床实践数据并结合我国国情与分子检测需求,由50位临床与病理专家通过共识会议和线上投票形成推荐意见和推荐等级。本共识共总结了12条检测相关意见要点,参考推荐等级的评估、制订和评价(GRADE)方法,分为“强烈推荐”“推荐”和“无共识”3个等级。其中专家组投“非常同意”的票数超过2/3的意见为“强烈推荐”,专家组投“非常同意”+“基本同意”的票数超过2/3的意见为“推荐”,否则不达成共识。

基于靶向药物的可及性,本共识将融合基因分

为必检基因与扩展基因两类。必检基因包括间变性淋巴瘤激酶(ALK)、c-ros原癌基因1(ROS1)、转染重排原癌基因(RET)和神经营养因子受体酪氨酸激酶(NTRK);扩展基因主要包括神经调节蛋白(NRG)、成纤维细胞生长因子受体(FGFR)、间质表皮转化因子(MET)、表皮生长因子受体(EGFR)、人类表皮生长因子受体2(HER2)和鼠类肉瘤滤过性毒菌致癌同源体B1(BRAF)等(表1)。各融合基因在NSCLC中的发生频率差异较大(0.05%~8.00%)。需要特别说明的是,作为NSCLC驱动基因变异谱的一部分,尽管融合基因检测方法有其特性,但在临床实践中,检测策略的优化需综合考虑其他驱动基因的检测。

一、融合基因检测的临床意义、适用人群及标本类型

推荐意见1:推荐病理学诊断为肺腺癌(包括含腺癌成分)的晚期初治NSCLC患者及靶向药物治疗后耐药的NSCLC患者进行融合基因检测(强烈推荐);建议经活检组织病理学诊断为非腺癌的晚期NSCLC患者及术后明确为浸润性腺癌的II~III期NSCLC患者进行融合基因检测(推荐)。

融合基因阳性NSCLC患者占有NSCLC患者的8%~12%<sup>[1-2]</sup>。目前已有多种针对不同基因融合的酪氨酸激酶抑制剂(TKI)获批用于临床治疗(表1),融合基因阳性的晚期NSCLC患者可从相应靶向治疗中显著获益<sup>[3]</sup>。另外,多项研究显示,受体酪氨酸激酶融合是NSCLC患者接受特定靶向药物治疗后获得性耐药的机制之一<sup>[4]</sup>。因此推荐初



表 1 非小细胞肺癌中主要的融合基因及获批药物

融合基因	变异频率	常见融合伴侣	国家药品监督管理局(NMPA)/美国食品药品监督管理局获批药物
必检基因			
ALK	5%~8%	EML4、TFG、KLC1、SOCS5、HIP1、TPR、BIRC6	阿来替尼、克唑替尼、恩沙替尼(仅NMPA)、塞瑞替尼、布格替尼、洛拉替尼
ROS1	2%~3%	CD74、EZR、TPM3、SDC4	恩曲替尼、克唑替尼
RET	1%~4%	KIF5B、CCDC6、NCOA4	普拉替尼、塞普替尼
NTRK	0.1%~0.2%	TPM3、MPRIIP、CD74、SQSTM1	恩曲替尼、拉罗替尼
扩展基因			
NRG	0.1%~0.2%	CD74、SLC3A2、SDC4	未获批
FGFR	0.2%~0.3%	TACC3、BAG4、SLC20A2、SHTN1	未获批
MET	0.04%~0.50%	KIF5B、STARD3、ATXN7L1、CD47	未获批
EGFR	0.05%~0.15%	RAD51、PURB、ANXA2、KIF5B、SEPT14、NAMPT	未获批
HER2	0.05%	PPP1R1B、IKZF3、CTTN、GRB7	未获批
BRAF	0.1%~0.2%	TRIM24、ARMC10、DOCK4、LIMD1	未获批

治和靶向药物经治疗后耐药的晚期 NSCLC 患者进行融合基因检测,从而为此类患者治疗策略的制定提供依据。此外,研究显示,在可手术切除的 NSCLC 患者中,与融合基因阴性患者相比,ALK 等融合基因阳性患者的术后无复发生存时间较短<sup>[5]</sup>,提示此类患者更应进行密切随访和术后积极辅助治疗。

推荐意见 2:推荐首选肿瘤组织学标本进行融合基因检测,无法获取足够肿瘤组织学标本时,可选择细胞学标本。在检测融合基因前,由专业的病理医师对组织或细胞学标本进行肿瘤细胞含量评估(强烈推荐);无法获取足够肿瘤组织学或细胞学标本时,建议选择液体活检作为补充检测手段(推荐)。

NSCLC 患者进行融合基因检测时应首选肿瘤组织学标本,无法获取足够组织学标本时可选用细胞学标本,组织学或细胞学标本应由专业的病理医师进行肿瘤细胞含量评估(包括肿瘤细胞比例及数量)。若组织学和细胞学标本均不可及或无法满足检测需求,可选用液体活检标本(血液、浆膜腔积液、脑脊液等的上清液)<sup>[6-8]</sup>。但液体活检用于融合基因检测具有较高的假阴性率,研究显示,在初治晚期 NSCLC 患者中,基于循环肿瘤 DNA(ctDNA)的杂交捕获二代测序检测 ALK 融合的灵敏度仅为 64.7%~79.2%<sup>[9-10]</sup>。

## 二、融合基因检测的常用方法

推荐意见 3:应根据送检标本类型、肿瘤细胞含量、标本质量、所检融合基因特点、平台可及性、检测周期及费用等因素,合理选择检测平台及方式,必要时可多平台互补和验证(强烈推荐)。

目前常用的融合基因检测方法包括荧光原位

杂交(FISH)、免疫组织化学(IHC)、即时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)和二代测序等。

1.FISH:是通过荧光标记的探针与细胞核内的 DNA 靶序列杂交,并在荧光显微镜下观察分析基因扩增或融合变异的一种分子检测技术,一般被认为是检测基因扩增和融合的“金标准”,但也存在一定的局限性。如并非所有检测到的融合均会产生可表达的融合 RNA,分离探针可能会遗漏较小的染色体内部重排导致假阴性结果,无法确定和区分不同的融合基因变异亚型等<sup>[11]</sup>。此外,FISH 检测依赖人工判读,对诊断医师要求较高,且检测费用高。

2.IHC:是利用抗原抗体反应和化学显色原理,检测组织或细胞学切片中特定蛋白表达的技术。IHC 检测灵敏度高、成本低、检测时间短、易于自动化,但其准确性取决于检测的融合蛋白是否有经过验证的抗体,如 Ventana-D5F3 IHC 检测肺腺癌患者 ALK 融合的准确性高,而 ROS1 和 NTRK 阳性 IHC 结果尚需其他检测方法验证<sup>[11]</sup>。此外,IHC 结果的准确性同样依赖病理医师的判读。

3.qRT-PCR:可在 RNA 水平检测 NSCLC 中的融合 RNA,灵敏度高、检测时间短,但仅限于检测引物设计范围内的已知融合,无法检出未知融合<sup>[11]</sup>。此外,该方法检测结果的准确性高度依赖标本 RNA 的质量。

4.靶向二代测序:可以通过大规模平行测序的方法,对引物或探针设计范围内的区域同时进行多个融合基因检测<sup>[12]</sup>。根据核酸投入物的不同,靶向二代测序可在 DNA 或 RNA 水平检测基因融合。(1)靶向 DNA 二代测序通过杂交捕获建库,仅使用 DNA 就可同时对多个肿瘤相关基因的突变、扩增、



融合及肿瘤突变负荷(TMB)、微卫星不稳定状态进行检测,极大地节约了标本量,并且能够在DNA水平确定基因融合的断点位置和融合伴侣,检出已知和未知的基因融合。若无法获得组织学/细胞学标本或者标本量不足以进行检测,可以从体液标本中提取ctDNA进行二代测序检测<sup>[13]</sup>。但是,DNA二代测序检测基因融合受肿瘤细胞含量、标本DNA质量、捕获探针覆盖度及DNA层面复杂基因变异等影响,可能会出现漏检<sup>[1,14]</sup>。另外,随着DNA二代测序在临床分子检测中的广泛应用,越来越多携带罕见伴侣的激酶融合被发现,但某些罕见融合并不能产生有功能的融合RNA/蛋白<sup>[15]</sup>。(2)RNA二代测序可以通过多重PCR扩增、锚定多重PCR或杂交捕获建库在RNA水平检测融合转录本。与DNA二代测序需要对外显子和内含子区均进行探针捕获相比,RNA测序仅需要针对外显子区设计引物或探针,相对简单、经济,不受DNA层面复杂融合的影响,且RNA二代测序能直接真实地反映转录水平融合的表达情况及融合伴侣基因类型。但是,RNA二代测序对RNA的质量要求较高,尤其是基于杂交捕获平台的RNA二代测序<sup>[12]</sup>。需要注意的是,二代测序检测流程相对复杂,试剂平台众多,须充分关注所用平台技术参数,尤其是Panel设计的覆盖范围和生物信息分析参数,并建立严格的质量控制体系。

5. 其他:全基因组测序可以在DNA层面检测所有已知和未知融合,但需要大量的起始DNA,且平均覆盖度较低。全转录组测序可以在RNA层面检出所有已知和未知融合转录本,但对RNA的质量和总量要求高。由于全基因组测序和全转录组测序检测对标本质控要求高,数据分析流程复杂,限制了其在临床检测中的广泛应用<sup>[14]</sup>。NanoString技术可基于条形码探针标记对特定RNA分子进行计数和定量,无需逆转录或扩增步骤,因此可用于质量不佳的甲醛固定石蜡包埋(FFPE)标本的基因融合检测。与二代测序相比,NanoString的操作流程耗时较短,数据分析简单<sup>[16]</sup>,但目前受限于设备及探针试剂的可及性,其在临床检测中应用的数据尚少。

### 三、融合基因的共性及检测策略

推荐意见4:DNA层面检出的罕见融合伴侣、外显子断点融合及基因间融合应在RNA或蛋白水平进一步验证(强烈推荐)。

基因融合主要通过染色体结构重排形成,常见

的染色体重排发生机制包括倒置、易位、插入、缺失、串联重复、染色体碎裂等,从而在DNA层面形成基因融合<sup>[12]</sup>。根据5'和3'端基因断点在基因组的位置不同,基因融合可分为基因内融合、基因间融合和混合性融合。

1. 基因内融合:又分为内含子断点融合和外显子断点融合,内含子断点融合是最常见的融合形式,5'和3'端基因的融合断点均在内含子区,因上下游基因的编码序列均保留完整,绝大多数内含子断点融合能够形成有功能的融合RNA<sup>[2]</sup>。但仍有少数病例可能会因5'和3'端基因转录方向不同(对向或反向)而无法形成融合RNA,这些病例的融合伴侣常为罕见基因。因此推荐对DNA二代测序检出的携带罕见伴侣的融合应在RNA或蛋白水平进一步明确<sup>[2,17]</sup>。外显子断点融合:即5'和3'端基因的融合断点有1个或2个位于外显子区,形成“外显子-内含子”“内含子-外显子”或“外显子-外显子”形式的融合。研究发现,在外显子断点融合中,约80%可以形成有功能的融合RNA,而约20%可能因开放读码框架的中断或5'和3'端基因的转录方向不同而无法形成有功能的融合RNA<sup>[2]</sup>。因此推荐DNA二代测序检出的外显子断点融合应在RNA或蛋白水平进一步明确,尤其是罕见融合伴侣或“外显子-内含子/外显子”形式的融合。

2. 基因间融合:即5'和3'端基因的融合断点有1个或2个位于基因间非编码区,形成“基因间-内含子”“内含子-基因间”或“基因间-基因间”形式的融合<sup>[2]</sup>。研究发现,在基因间融合中,约80%能够形成有功能的融合RNA,而约20%可能因缺少转录所需启动元件(如启动子、起始密码子等)等原因无法形成有功能的融合RNA<sup>[15]</sup>。因此,基因间融合应在RNA或蛋白水平进一步明确。

3. 混合性融合:混合性融合的融合断点位置多样,包括“基因间-外显子”“外显子-基因间”或多个融合(主要是相互融合,即同时存在3'融合和5'融合)且各个融合断点类型不同<sup>[2]</sup>。如检出“基因间-外显子”或“外显子-基因间”融合,推荐应在RNA或蛋白水平进一步明确。

推荐意见5:DNA水平检测驱动基因为阴性的NSCLC患者建议在RNA或蛋白水平进一步检测基因融合,尤其是年轻、女性、不吸烟、TMB低的黏液/实性肺腺癌患者(推荐)。

基因融合亦可通过RNA剪接形成,在基因转录过程中,来自相邻或不相邻的2个基因的外显子



之间可通过剪接形成融合 RNA, 此类融合变异无法通过基于 DNA 的检测方法检出<sup>[12]</sup>。因此在临床检测中, 对于 DNA 水平检测驱动基因为阴性的病例, 推荐必要时可在 RNA 或蛋白水平进一步明确。基于携带融合基因变异 NSCLC 患者的临床病理特点, 尤其需关注年轻、女性、不吸烟且 TMB 低的黏液/实性腺癌患者。

#### 四、NSCLC 常见融合基因的特性

##### (一) 必检基因的特点

推荐意见 6: 对于必检融合基因, 推荐使用二代测序或 qRT-PCR 进行检测(强烈推荐), 建议使用 FISH 进行检测(推荐)。

推荐意见 7: 推荐使用 IHC 检测 ALK 融合(强烈推荐), 建议 IHC 仅用于 ROS1 和 NTRK 融合初筛, 阳性结果需其他平台验证(推荐); 不建议 IHC 用于 RET 融合检测(推荐)。

1. ALK: ALK 融合的变异频率和常见融合伴侣详见表 1, 其融合断点多位于 ALK 基因第 19 号内含子或外显子, 因此保留了 ALK 的整个酪氨酸激酶结构域(始于第 20 号外显子)<sup>[18]</sup>。ALK 融合已发现多种融合伴侣, 最常见的 EML4-ALK 融合目前已报道有 20 多种变体亚型, 其中 60% 以上的 EML4-ALK 融合亚型为变体 1 (EML4 第 13 号外显子与 ALK 第 20 号外显子融合) 和变体 3 (EML4 第 6 号外显子与 ALK 第 20 号外显子融合)<sup>[6]</sup>, 不同 EML4-ALK 亚型的患者 TKI 治疗的疗效可能会存在差异<sup>[19]</sup>。ALK 融合检测推荐使用 Ventana-D5F3 IHC、FISH、qRT-PCR 和二代测序方法。其中, Ventana-D5F3 抗体 IHC 在肺腺癌患者中的灵敏度和特异度高<sup>[20]</sup>, 但该检测用于低分化癌、神经内分泌癌和鳞状细胞癌时可能出现非特异性着色, 疑似阳性结果需要通过其他方法验证。另外, ALK 选择性转录起始(alternative transcription initiation)亦可导致 ALK IHC 阳性表达, 且此类患者能够从 ALK TKI 中获益<sup>[21]</sup>, 但目前常用的 DNA 和 RNA 层面的检测技术多无法准确检出 ALK 选择性转录起始, 需要经过优化的二代测序或 NanoString 才能明确。

2. ROS1: ROS1 融合的变异频率和常见融合伴侣详见表 1, 最常见融合伴侣为 CD74 和 EZR<sup>[22]</sup>。ROS1 融合断点最常发生在 ROS1 基因第 30~34 号内含子<sup>[23]</sup>, 因此能够保留 ROS1 激酶域全长(第 36~41 号外显子)<sup>[22]</sup>。ROS1 融合推荐使用 FISH、qRT-PCR 和二代测序检测, IHC 检测仅用于初筛, 阳性结果需其他方法验证<sup>[24]</sup>。FISH 是 ROS1 融合

检测的“金标准”, 但是, 对于 GOPC-ROS1 融合, 由于 GOPC 与 ROS1 基因均位于第 6 号染色体, 两者位置接近, 当通过缺失产生 GOPC-ROS1 融合时, 红绿分离探针信号并不会发生改变, 因此 FISH 易漏检 GOPC-ROS1 融合<sup>[25]</sup>。另外, 基于 DNA 和 RNA 的二代测序均可用于 ROS1 融合基因检测, 但 DNA 二代测序检测 ROS1 融合易发生漏检, 其主要原因包括: (1) ROS1 融合常见断点位置的内含子区较大; (2) 常见断点位置鸟嘌呤和胞嘧啶(GC)含量低, 导致探针捕获效率低; (3) 常见断点位置存在高度腺嘌呤和胸腺嘧啶(AT)重复区等多样性较低的区域, 影响后续数据比对分析的准确性<sup>[26]</sup>。

3. RET: RET 融合的变异频率和常见融合伴侣详见表 1, 融合伴侣在 NSCLC 中以 KIF5B 最为常见<sup>[7]</sup>。RET 基因最常见的融合断点位于第 11 号内含子, 因此其 3' 端保留了酪氨酸激酶域(第 12~19 号外显子)<sup>[7, 27]</sup>。RET 融合推荐使用 FISH、qRT-PCR 和二代测序检测。IHC 检测 RET 融合的灵敏度和特异度不高, 目前不做推荐。值得注意的是, FISH 检测 NCOA4-RET 的灵敏度较低, 可能与 NCOA4 和 RET 两基因在 DNA 层面距离过近有关<sup>[28]</sup>。

4. NTRK: NTRK 融合常见于特定的恶性肿瘤(如婴幼儿纤维肉瘤和乳腺分泌性癌), 在 NSCLC 患者中相对少见(<1%)。NTRK 基因包括 NTRK1、NTRK2 和 NTRK3(分别编码 TrkA、TrkB 和 TrkC 蛋白)3 种亚型, 3 种 NTRK 基因高度同源, 激酶域均位于第 13~18 号外显子区域<sup>[29]</sup>。NTRK 融合断点多位于第 8~13 号内含子区域, 使其 3' 端保留了 NTRK 激酶域<sup>[30]</sup>。在 NSCLC 患者中, 以 NTRK1 融合最为常见, TPM3 是最常见的 NTRK1 融合伴侣, 其他已发现的 NTRK1 融合伴侣还包括 MPRIP、CD74、SQSTM1 等<sup>[31]</sup>。由于涉及 3 种 NTRK 基因和多种潜在融合伴侣, NTRK 融合基因的检测较为复杂<sup>[32]</sup>。推荐使用 FISH、qRT-PCR 和二代测序等方法检测 NTRK 融合。泛 TRK 抗体可通过与 3 种 Trk 蛋白 C 端结构域的共同抗原结合检测 NTRK1、NTRK2 和 NTRK3 融合, 适合用于 NTRK 融合基因的初筛, 尤其 Ventana pan-TRK 抗体筛选 NTRK 融合具有较高的灵敏度和特异度<sup>[32-33]</sup>。但是, 由于 Trk 蛋白在神经和平滑肌组织中有生理性表达, 在结果判读时需注意<sup>[29, 31]</sup>。基于 DNA 和 RNA 的靶向二代测序均可用于 NTRK 融合基因的检测, 但须注意 NTRK2 和 NTRK3 基因存在较大的内含子区, 杂交捕获 DNA



二代测序在探针设计上很难做到完全覆盖,目前对其检测策略多为针对其融合伴侣设计探针进行检测,因此只能检测常见的 NTRK2/3 融合,罕见融合可能会漏检<sup>[32]</sup>。

(二)扩展基因的特点

推荐意见 8: 建议使用二代测序检测扩展融合基因(推荐)。

1.NRG:NRG1 融合在 NSCLC 患者中罕见,其常见融合伴侣详见表 1,最常见的融合伴侣为 CD74<sup>[34]</sup>。NRG1 基因有 3 种亚型(I~III 型),不同亚型在 NRG1 的 5' 端存在一个特异的外显子。NRG1 融合断点常位于:(1) I 型外显子和第 2 号外显子间 47 kb(千碱基对)的内含子区;(2) II 型外显子和第 2 号外显子间 955 kb 的内含子区;(3)第 5 号和第 6 号外显子间包含了 III 型外显子的区域(111 kb)<sup>[34]</sup>。NRG1 主要通过和细胞表面的 HER3 结合发挥促癌作用,所以针对 NRG1 融合靶向治疗的主要原理为阻止 NRG1 与 HER3 结合和破坏 HER3/HER2 的异二聚化,目前相应的靶向药物尚在临床试验中。NRG2 融合更为罕见,其特点有待进一步研究<sup>[35]</sup>。FISH、qRT-PCR 和 IHC 检测 NRG1/2 融合的灵敏度和特异度尚不明确,鉴于 NRG1/2 融合多样性,以及在 NSCLC 患者中罕见,推荐使用二代测序检测 NRG1/2 融合。基于 DNA 和 RNA 的靶向二代测序均可用于 NRG1/2 融合基因的检测,但与 NTRK2/3 类似,NRG1/2 的内含子区域较大,DNA 二代测序探针难以完全覆盖,易造成漏检<sup>[35]</sup>。

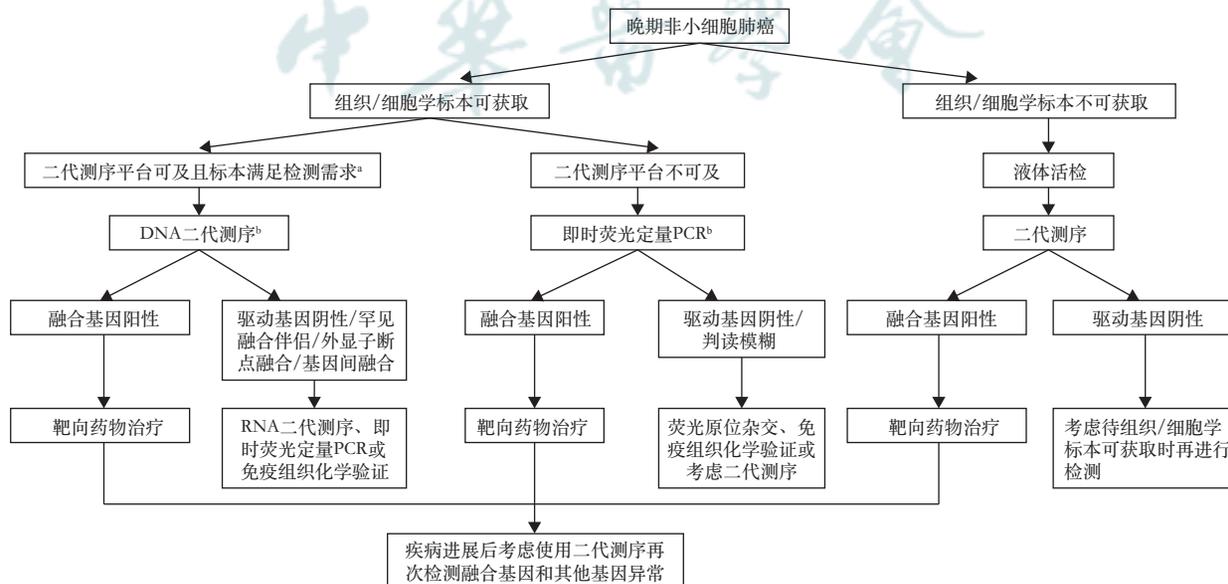
2.FGFR:FGFR 融合主要包括 FGFR1、FGFR2、FGFR3 和 FGFR4 融合,融合方式可分为 I 型和 II 型, I 型融合为 3'FGFR 融合,融合蛋白中不包含 FGFR 的细胞外和跨膜结构域,仅包含与 5'融合伴侣相连的激酶结构域; II 型融合为 5'FGFR 融合,其细胞外、跨膜和激酶结构域保持完整,这两种类型的融合蛋白均有致癌潜力<sup>[36]</sup>。FGFR 融合的变异频率和常见融合伴侣详见表 1。NSCLC 中以 II 型融合为主(占 90% 以上),融合断点主要位于第 17~19 号内含子或外显子区<sup>[37]</sup>。鉴于 FGFR 融合多样性和在 NSCLC 患者中较罕见,推荐使用基于 DNA 或 RNA 的二代测序进行检测,其他方法检测尚需更多研究探索。

3.其他:其他激酶融合的发生率均很低(表 1)。其中,MET、HER2、BRAF 融合多见于 TKI 治疗后继发耐药的患者。个例研究报道显示:(1)MET 融合患者能够从靶向 MET 的 TKI 治疗中获益<sup>[38-40]</sup>; (2)EGFR 融合患者能够从靶向 EGFR 的 TKI 治疗中获益<sup>[41]</sup>; (3)BRAF 融合患者能够从 MEK 抑制剂治疗中获益<sup>[42]</sup>。鉴于这些融合相对罕见,推荐使用基于 DNA 或 RNA 的二代测序进行检测。

五、融合基因检测的推荐方法及流程

推荐意见 9: 基于靶点基因变异全面检测的必要性及平台的适用性,晚期初治 NSCLC 患者应通过二代测序或 qRT-PCR 进行包括融合基因在内的多基因检测(强烈推荐)。

晚期初治 NSCLC 患者分子病理检测的推荐流程如图 1 所示。对于可获取组织学或细胞学标本



<sup>a</sup>包括标本肿瘤细胞比例和数量合适,<sup>b</sup>如果条件可及且标本足够,可参考“推荐意见 7”同时进行免疫组织化学检测

图 1 晚期初治非小细胞肺癌融合基因检测临床推荐路径

且标本可满足检测需求(包括肿瘤细胞比例和数量合适)的晚期初治 NSCLC 患者,根据实验室条件,推荐首选 DNA 二代测序同时检测包括 ALK、ROS1、RET、NTRK 等在内的多种融合基因,对于检出的外显子断点融合、基因间融合、罕见融合伴侣或驱动基因检测为阴性的,建议通过 RNA 二代测序验证。如果考虑检测周期的时限性,且检测标本充足时,qRT-PCR 多基因联检可作为首选检测方法。鉴于 IHC 检测 ALK 融合的优点,可同时进行 ALK Ventana-D5F3 IHC 检测。如果二代测序不可及、肿瘤细胞数量较少或标本质控无法满足二代测序要求时,可依据实验室平台的适用性、成本和/或组织标本量,选择 qRT-PCR 检测;如果检测结果为阴性或判读模糊,应使用 FISH、IHC 或考虑使用二代测序方法进行验证。对于无法获取组织学或细胞学标本或标本中肿瘤细胞比例低的患者,可尝试通过液体活检(血液、浆膜腔积液、脑脊液等)进行二代测序检测,但如果未检测到基因融合及其他驱动基因变异,仍需要进行肿瘤组织检测,以排除假阴性结果的可能。

推荐意见 10: 靶向治疗耐药后再次活检的患者建议使用二代测序同时检测多种基因变异(推荐)。

鉴于不同的受体酪氨酸激酶融合(包括 RET、ROS1、ALK、FGFR、NTRK 融合)可能是接受特定靶向药物(如 EGFR TKI)的 NSCLC 患者在治疗后发生获得性耐药的重要机制之一,并且融合变异类型多样,因此对于发生靶向治疗耐药后需要检测潜在耐药机制的患者,建议使用高通量方法(如二代测序)检测包括融合基因在内的基因变异。

推荐意见 11: 术后诊断为浸润性腺癌的 II~III 期 NSCLC 患者建议通过 IHC 检测 ALK 融合,或通过 qRT-PCR 或二代测序进行多基因检测(推荐)。

对于可手术切除的 NSCLC 患者,切除标本融合基因检测结果可为术后随访和治疗提供一定参考。出于对成本效益的考虑,术后诊断为浸润性腺癌的 II~III 期 NSCLC 患者可通过 IHC 筛选融合基因(如采用 Ventana-D5F3 IHC 检测 ALK 融合),或通过 qRT-PCR 或二代测序进行多基因检测。

## 六、临床实践中其他检测注意事项

推荐意见 12: 如果不同检测平台的检测结果不一致,推荐用第 3 种平台进行验证(强烈推荐)。

临床医师、组织病理医师和分子病理检测人员

应及时就分子检测进行必要的沟通,包括检测前、检测后和靶向治疗耐药后再次检测时。建议可组建分子肿瘤专家委员会,及时对疑难病例进行沟通交流。不同检测平台的检测结果不一致时,必要时可用第 3 种平台进行验证,确保检测结果无异议,才可进行相应的靶向治疗。

在真实世界中,融合基因的检测易受实验室条件和患者个体标本差异等多种因素的影响,可参考本共识中的建议,因地制宜地选择合适的检测方式,以期最大限度为患者的精准治疗提供帮助。

**免责声明** 本文中公布的临床实践共识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融合基因的分子病理检测,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专业知识独立判断。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责任。

**共识编写专家组成员**(按单位名称汉语拼音字母顺序排列):北京大学肿瘤医院胸部肿瘤内科(赵军);复旦大学附属肿瘤医院病理科(周晓燕);哈尔滨医科大学附属肿瘤医院精准医学中心(孟宏学),呼吸内科(于雁);河南省肿瘤医院分子病理科(马杰),肿瘤内科(王慧娟);华中科技大学同济医学院附属协和医院肿瘤中心胸部肿瘤科(董晓荣);南方医科大学南方医院呼吸内科(刘来昱);山西省肿瘤医院病理科(郝彦凤);上海市胸科医院上海交通大学医学院附属胸科医院肿瘤科(陆舜、李子明);四川大学华西医院病理科(唐源);四川省肿瘤医院肿瘤内科(李娟);西安交通大学第一附属医院肿瘤内科(姚煜);浙江省肿瘤医院病理科(苏丹),胸部肿瘤内科(范云);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);中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院病理科(李卫华、应建明);中山大学孙逸仙纪念医院细胞分子诊断中心(欧阳能太)

**共识讨论及投票参与专家**(按单位名称汉语拼音字母顺序排列):北京医院病理科(王征);福建省肿瘤医院病理科(陈刚),胸部肿瘤内科(林根);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胸部肿瘤内科(王佳蕾);广东省人民医院病理科(崔倩);广州医科大学附属肿瘤医院胸外科(周明);河南省人民医院病理科(徐紫光),肿瘤中心(仓顺东);河南省肿瘤医院分子病理科(魏冰);湖北省肿瘤医院病理科(岳君秋);吉林大学第一医院病理科(段秀梅);江苏省人民医院病理科(张智弘);江苏省肿瘤

医院肿瘤内科(史美祺);陆军军医大学大坪医院病理科(王秋实);南京大学医学院附属鼓楼医院肿瘤科(王立峰);山东大学齐鲁医院肿瘤内科(郝静);上海交通大学医学院附属瑞金医院病理科(董磊);上海市胸科医院上海交通大学医学院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病理科(车南颖);天津医科大学肿瘤医院肺部肿瘤内科(黄鼎智);新疆医科大学第一附属医院病理科(崔文丽);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);郑州大学第一附属医院病理科(姜国忠);中国科学技术大学附属第一医院肿瘤科(潘跃银);中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院内科(王志杰);中国医学科学院肿瘤医院深圳医院病理科(黄文亭);中南大学湘雅医院病理科(肖德胜);中山大学附属肿瘤医院分子诊断科(王芳)

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

### 参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] Li W, Wan R, Guo L, et al. Reliability analysis of exonic-breakpoint fusions identified by DNA sequencing for predicting the efficacy of targeted therapy in non-small cell lung cancer[J]. *BMC Med*, 2022, 20(1):160. DOI: 10.1186/s12916-022-02362-9.
- [3] Melosky B, Wheatley-Price P, Juergens RA, et al. The rapidly evolving landscape of novel targeted therapies in advanced non-small cell lung cancer[J]. *Lung Cancer*, 2021, 160:136-151. DOI: 10.1016/j.lungcan.2021.06.002.
- [4] 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.
- [5] Gallina FT, Bertolaccini L, Forcella D, et al. Analysis of molecular biomarkers in resected early-stage non-small cells lung cancer: a narrative review[J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(8):1949. DOI: 10.3390/cancers14081949.
- [6] Li W, Zhang J, Wang Z, et al. Guidelines for clinical practice of ALK fusion detection in non-small-cell lung cancer: a proposal from the Chinese RATICAL study group[J]. *J Natl Cancer Cent*, 2021, 1(4): 123-131. DOI: 10.1016/j.jncc.2021.07.005.
- [7] 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.
- [8] 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, 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.
- [9] Mooradian MJ, Gainor JF. ALK fusion detection in circulating free DNA: finding an important needle in the haystack[J]. *Oncologist*, 2017, 22(7): 759-761. DOI: 10.1634/theoncologist.2017-0178.
- [10] Leighl NB, Page RD, Raymond VM, et al. Clinical utility of comprehensive cell-free DNA analysis to identify genomic biomarkers in patients with newly diagnosed metastatic non-small cell lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(15): 4691-4700. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-0624.
- [11] Pinsolle J, McLeer-Florin A, Giaj Levra M, et al. Translating systems medicine into clinical practice: examples from pulmonary medicine with genetic disorders, infections, inflammations, cancer genesis, and treatment implication of molecular alterations in non-small-cell lung cancers and personalized medicine[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2019, 6:233. DOI: 10.3389/fmed.2019.00233.
- [12] Taniue K, Akimitsu N. Fusion genes and RNAs in cancer development[J]. *Noncoding RNA*, 2021, 7(1): 10. DOI: 10.3390/ncrna7010010.
- [13] Li W, Li Y, Guo L, et al. Metastatic NSCLCs with limited tissues: how to effectively identify driver alterations to guide targeted therapy in Chinese patients[J]. *JTO Clin Res Rep*, 2021, 2(5): 100167. DOI: 10.1016/j.jtocr.2021.100167.
- [14] Bruno R, Fontanini G. Next generation sequencing for gene fusion analysis in lung cancer: a literature review[J]. *Diagnostics (Basel)*, 2020, 10(8): 521. DOI: 10.3390/diagnostics10080521.
- [15] Li W, Liu Y, Li W, et al. Intergenic breakpoints identified by DNA sequencing confound targetable kinase fusion detection in NSCLC[J]. *J Thorac Oncol*, 2020, 15(7): 1223-1231. DOI: 10.1016/j.jtho.2020.02.023.
- [16] Matter MS, Chijioko O, Savic S, et al. Narrative review of molecular pathways of kinase fusions and diagnostic approaches for their detection in non-small cell lung carcinomas[J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2020, 9(6): 2645-2655. DOI: 10.21037/tlcr-20-676.
- [17] 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.
- [18] Yao Y, Yu Z, Ma Y, et al. Characterizing kinase intergenic-breakpoint rearrangements in a large-scale lung cancer population and real-world clinical outcomes [J]. *ESMO Open*, 2022, 7(2): 100405. DOI: 10.1016/j.esmoop.2022.100405.
- [19] Camidge DR, Dziadziuszko R, Peters S, et al. Updated efficacy and safety data and impact of the EML4-ALK fusion variant on the efficacy of alectinib in untreated alk-positive advanced non-small cell lung cancer in the global phase III ALEX study [J]. *J Thorac Oncol*, 2019, 14(7):1233-1243. DOI: 10.1016/j.jtho.2019.03.007.
- [20] 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.
- [21] Wiesner T, Lee W, Obenauf AC, et al. Alternative transcription initiation leads to expression of a novel ALK



- isoform in cancer[J]. *Nature*, 2015, 526(7573): 453-457. DOI: 10.1038/nature15258.
- [22] Drilon A, Jenkins C, Iyer S, et al. ROS1-dependent cancers-biology, diagnostics and therapeutics[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18(1): 35-55. DOI: 10.1038/s41571-020-0408-9.
- [23] Cui M, Han Y, Li P, et al. Molecular and clinicopathological characteristics of ROS1-rearranged non-small-cell lung cancers identified by next-generation sequencing[J]. *Mol Oncol*, 2020, 14(11): 2787-2795. DOI: 10.1002/1878-0261.12789.
- [24] National Comprehensive Cancer Network. NCCN clinical practice guidelines in oncology. Non-small cell lung cancer, 3Version. 2022[EB/OL]. (2022-03-16) [2022-08-08]. [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/nscl.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/nscl.pdf).
- [25] Davies KD, Le AT, Sheren J, et al. Comparison of molecular testing modalities for detection of ROS1 rearrangements in a cohort of positive patient samples[J]. *J Thorac Oncol*, 2018, 13(10): 1474-1482. DOI: 10.1016/j.jtho.2018.05.041.
- [26] Song Z, Lu C, Xu CW, et al. Noncanonical gene fusions detected at the DNA level necessitate orthogonal diagnosis methods before targeted therapy[J]. *J Thorac Oncol*, 2021, 16(3): 344-348. DOI: 10.1016/j.jtho.2020.12.006.
- [27] Paratala BS, Chung JH, Williams CB, et al. RET rearrangements are actionable alterations in breast cancer[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 4821. DOI: 10.1038/s41467-018-07341-4.
- [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] Xu C, Si L, Wang W, et al. Expert consensus on the diagnosis and treatment of NTRK gene fusion solid tumors in China[J]. *Thorac Cancer*, 2022, 13(21): 3084-3097. DOI: 10.1111/1759-7714.14644.
- [30] Farago AF, Taylor MS, Doebele RC, et al. Clinicopathologic features of non-small-cell lung cancer harboring an NTRK gene fusion[J]. *JCO Precis Oncol*, 2018, 2018:PO.18.00037. DOI: 10.1200/PO.18.00037.
- [31] Liu F, Wei Y, Zhang H, et al. NTRK fusion in non-small cell lung cancer: Diagnosis, therapy, and TRK inhibitor resistance[J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 864666. DOI: 10.3389/fonc.2022.864666.
- [32] Solomon JP, Linkov I, Rosado A, et al. NTRK fusion detection across multiple assays and 33, 997 cases: diagnostic implications and pitfalls[J]. *Mod Pathol*, 2020, 33(1):38-46. DOI: 10.1038/s41379-019-0324-7.
- [33] Zhao R, Yao F, Xiang C, et al. Identification of NTRK gene fusions in lung adenocarcinomas in the Chinese population[J]. *J Pathol Clin Res*, 2021, 7(4):375-384. DOI: 10.1002/cjp2.208.
- [34] Nagasaka M, Ou SI. Neuregulin 1 fusion-positive NSCLC[J]. *J Thorac Oncol*, 2019, 14(8): 1354-1359. DOI: 10.1016/j.jtho.2019.05.015.
- [35] Nagasaka M, Ou SI. NRG1 and NRG2 fusion positive solid tumor malignancies: a paradigm of ligand-fusion oncogenesis[J]. *Trends Cancer*, 2022, 8(3):242-258. DOI: 10.1016/j.trecan.2021.11.003.
- [36] De Luca A, Esposito Abate R, Rachiglio AM, et al. FGFR fusions in cancer: from diagnostic approaches to therapeutic intervention[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(18): 6856. DOI: 10.3390/ijms21186856.
- [37] Qin A, Johnson A, Ross JS, et al. Detection of known and novel FGFR fusions in non-small cell lung cancer by comprehensive genomic profiling[J]. *J Thorac Oncol*, 2019, 14(1):54-62. DOI: 10.1016/j.jtho.2018.09.014.
- [38] Plenker D, Bertrand M, de Langen AJ, et al. Structural alterations of MET trigger response to MET kinase inhibition in lung adenocarcinoma patients[J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(6): 1337-1343. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-3001.
- [39] Zhu YC, Wang WX, Xu CW, et al. Identification of a novel crizotinib-sensitive MET-ATXN7L1 gene fusion variant in lung adenocarcinoma by next generation sequencing[J]. *Ann Oncol*, 2018, 29(12): 2392-2393. DOI: 10.1093/annonc/mdy455.
- [40] Liu J, Shen L, Qian Y, et al. Durable response to crizotinib in an advanced lung adenocarcinoma patient harboring rare CD47-MET fusion: a case report[J]. *Transl Cancer Res*, 2022, 11(8):2931-2935. DOI: 10.21037/tcr-22-141.
- [41] Di Federico A, Filetti M, Palladini A, et al. EGFR-RAD51 gene fusion NSCLC responsiveness to different generation EGFR-TKIs: two cases and review of the literature[J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2022, 11(3): 497-503. DOI: 10.21037/tlcr-21-888.
- [42] Wang CY, Hsia JY, Li CH, et al. Lung adenocarcinoma with primary LIMD1-BRAF fusion treated with MEK inhibitor: a case report[J]. *Clin Lung Cancer*, 2021, 22(6):e878-e880. DOI: 10.1016/j.clcc.2021.05.003.