

# 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新时代。目前美国食品药品监督管理局(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。

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。

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

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应用。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 检测目前研究报道比较少,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

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)