



癌症分子检测

Molecular Testing in Cancer

George M. Yousef
Serge Jothy

〔加〕 乔治·M. 尤素福 主 编
塞尔日·乔西

侯英勇 纪 元 周宇红 主 译
侯 君 徐 晨 许建芳 陆维祺 副主译
樊 嘉 主 审



Molecular Testing in Cancer

癌症分子检测

[加] 乔治·M.尤素福 主 编
塞尔日·乔西

侯英勇 纪 元 周宇红 主 译

侯 君 徐 晨 许建芳 陆维祺 副主译

樊 嘉 主 审

天津出版传媒集团

◆ 天津科技翻译出版有限公司

著作权合同登记号:图字:02-2015-213

图书在版编目(CIP)数据

癌症分子检测/(加)乔治·M. 尤素福
(George M. Yousef), (加)塞尔日·乔西
(Serge Jothy) 主编;侯英勇等译. —天津:天津科
技翻译出版有限公司, 2017. 9

书名原文: Molecular Testing in Cancer
ISBN 978-7-5433-3606-3

I. ①癌… II. ①乔… ②塞… ③侯… III. ①癌-医
学检验 IV. ①R73

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 108303 号

Translation from the English language edition:
Molecular Testing in Cancer
edited by George M. Yousef and Serge Jothy
Copyright©Springer Science + Business Media New York
2014
Springer is part of Springer Science + Business Media
All Rights Reserved

中文简体字版权属天津科技翻译出版有限公司。

授权单位:Springer-Verlag GmbH

出版:天津科技翻译出版有限公司

出版人:刘庆

地址:天津市南开区白堤路 244 号

邮政编码:300192

电话:(022)87894896

传真:(022)87895650

网址:www.tsttpc.com

印刷:山东鸿君杰文化发展有限公司

发行:全国新华书店

版本记录:889×1194 16 开本 22.5 印张 700 千字

2017 年 9 月第 1 版 2017 年 9 月第 1 次印刷

印数:1200 册

定价:198.00 元

(如发现印装问题,可与出版社调换)

主译简介



侯英勇,博士,教授,博士生导师,现任复旦大学附属中山医院病理科主任,病理基地主任,病理专科基地主任。全国卫生产业企业管理协会实验医学专家委员会病理专业委员会主任委员。中华医学会儿科学分会消化系统疾病学组(筹)委员,中国抗癌协会肿瘤病理专业委员会胃癌中青年协作(学组)组委员。《临床与实验病理学杂志》第六届编委、*BMC Cancer* 编委、《中华病理学杂志》专家。

长期从事临床病理诊断、分子病理诊断和相关研究工作,建立 12 项指标的胃肠道间质瘤良恶性、分期分级方法并推广;首次提出胃癌 HER2 免疫组化双蜡块以及全蜡块检测的临床意义并推广;建立符合规范的分子病理实验室,成为卫计委病理质控中心首批分子病理示范实验室等。发表文章 100 余篇,其中第一作者和通讯作者 SCI 收录 40 余篇,主编《胃肠道间质瘤》专著一部。获国家自然科学基金 1 项、上海市浦江人才计划以及上海市科委基金 7 项。获得 2010 年明治乳业生命科学奖,2010 年上海市医学科技奖三等奖,2011 年上海市发明奖铜奖,2011 年华夏奖三等奖,2013 年上海市科技进步奖三等奖,2015 年上海市抗癌协会科技奖三等奖,2015 年中国抗癌协会科技奖二等奖,被评为 2014 年复旦大学三八红旗手,2015 年复旦大学巾帼奖。



纪元,病理学博士,主任医师,硕士研究生导师。复旦大学附属中山医院病理科副主任、肝胆胰专科主任、上海市肝病中心病理平台主任。现任中国医师协会胰腺病专业委员会第一届委员,抗癌协会肝癌专业委员会病理学组副组长。《肝脏》杂志编委、《中华胰腺病杂志》编委,国家自然科学基金通讯评审专家。主编《肝胆胰肿瘤——病理、影像与临床》,该书获得国家及上海市科技出版基金资助,并获得华东地区优秀科技出版一等奖。



周宇红,博士,主任医师,复旦大学附属中山医院肿瘤内科副主任,肿瘤内科骨与软组织肿瘤亚专科主任。1992 年毕业于上海医科大学临床医学系,曾在 MD Anderson 癌症中心访问学习。担任中国抗癌协会肉瘤专业委员会委员、上海医学会肿瘤学分会委员等。

长期从事实体肿瘤的临床一线工作,尤其是对实体肿瘤的分子诊断、精准治疗具有较为前沿的理念和临床实践经验。主译出版了《软组织肉瘤诊疗学》《骨组织肉瘤诊疗学》,参与及主持多项国家自然科学基金及省部级课题。以第一或通讯作者发表论文 30 余篇。

译者名单

主 译 侯英勇 纪 元 周宇红

副主译 侯 君 徐 晨 许建芳 陆维祺

主 审 樊 嘉

翻译组秘书 刘文帅

译 者 (按姓氏汉语拼音排序)

陈 岗	陈伶俐	葛晓雯	韩 晶	侯 君	侯英勇
胡 沁	黄 洁	纪 元	蒋冬先	李晓静	刘亚岚
卢韶华	陆维祺	栾丽娟	罗荣奎	石 园	宋 琦
田 丰	汪星星	王海星	吴 洁	徐 晨	徐一凡
许建芳	姚家美	于 娟	张 欣	周宇红	朱 娜

编者名单

Nathanael G. Bailey, M.D. Department of Pathology, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, MI, USA

Jyotsna Batra, Ph.D. Translational Research Institute, Queensland University of Technology, Woolloongabba, QLD, Australia

Amir Behdad, M.D. Department of Pathology, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, MI, USA

Diana Bell, M.D. Department of Pathology, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA

Bryan L. Betz, Ph.D. Department of Pathology, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, MI, USA

Paul C. Boutros, Ph.D. Ontario Institute for Cancer Research, Toronto, ON, Canada

Department of Medical Biophysics, University of Toronto, Toronto, ON, Canada

Department Pharmacology and Toxicology, University of Toronto, Toronto, ON, Canada

Judith Clements, Ph.D. Translational Research Institute, Queensland University of Technology, Woolloongabba, QLD, Australia

Kevin P. Conlon, B.Sc. Department of Pathology, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, MI, USA

Elisabeth Dequeker, Ph.D. Department of Public Health, Research Unit, University of Leuven, Leuven, Belgium

Brendan C. Dickson, M.D. Department of Pathology and Laboratory Medicine, Mount Sinai Hospital, University of Toronto, Toronto, ON, Canada

Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, University of Toronto, Toronto, ON, Canada

Michelle Dolan, M.D. Department of Laboratory Medicine and Pathology, University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA

Louis Dubeau, M.D., Ph.D. USC/Norris Comprehensive Cancer Center, Keck School of Medicine of University of Southern California, Los Angeles, CA, USA

Kojo S. J. Elenitoba-Johnson, M.D. Department of Pathology, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, MI, USA

Debora Fumagalli, M.D. Institut Jules Bordet, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium

Manal Y. Gabril, M.D. Department of Pathology and Laboratory Medicine, University Hospital, London, ON, Canada

Andrea Grin, M.D. Department of Laboratory Medicine, St. Michael's Hospital, University of Toronto, Toronto, ON, Canada

Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, University of Toronto, Toronto, ON, Canada

Syed Haider, M.D. Ontario Institute for Cancer Research, Toronto, ON, Canada

Ehab Y. Hanna, M.D. Department of Head and Neck Surgery, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA

Carlo Hojilla, M.D., Ph.D. Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, University of Toronto, Toronto, ON, Canada

Roland Hubaux, Ph.D. Department of Integrative Oncology, BC Cancer Agency, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada

Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada

David M. Hwang, M.D., Ph.D. Department of Pathology, University Health Network, Toronto General Hospital, University of Toronto, Toronto, ON, Canada

Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, University of Toronto, Toronto, ON, Canada

Serge Jothy, M.D., Ph.D. Department of Laboratory Medicine, St. Michael's Hospital, University of Toronto, Toronto, ON, Canada

Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, University of Toronto, Toronto, ON, Canada

Rita A. Kandel, M.D. Department of Pathology and Laboratory Medicine, Mount Sinai Hospital, University of Toronto, Toronto, ON, Canada

Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, University of Toronto, Toronto, ON, Canada

Jason Karamchandani, M.D. Department of Laboratory Medicine, St. Michael's Hospital, University of Toronto, Toronto, ON, Canada

Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, University of Toronto, Toronto, ON, Canada

Shirin Karimi, M.D. Department of Pathology, University Health Network, Toronto General Hospital, University of Toronto, Toronto, ON, Canada

Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, University of Toronto, Toronto, ON, Canada

Leon van Kempen, Ph.D. Department of Pathology, McGill University, Montreal, QC, Canada

Lady Davis Institute, Jewish General Hospital, Montreal, QC, Canada

Wan L. Lam, Ph.D. Department of Integrative Oncology, BC Cancer Agency, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada

Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada

Philippe Lambin, M.D., Ph.D. Department of Radiation Oncology, Maastricht University Medical Center, Maastricht, The Netherlands

Evi S. Lianidou, Ph.D. Laboratory of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, University of Athens, Athens, Greece

Megan S. Lim, M.D., Ph.D. Department of Pathology, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, MI, USA

Victor D. Martinez, Ph.D. Department of Integrative Oncology, BC Cancer Agency, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada
Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada

John D. McPherson, Ph.D. Ontario Institute for Cancer Research, Toronto, ON, Canada

Matthew T. Olson, M.D. Department of Pathology, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA

Maria Pasic, Ph.D. Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, University of Toronto, Toronto, ON, Canada

Jason D. Prescott, M.D., Ph.D. Department of Surgery, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA

Margaret Redpath, M.D. Department of Pathology, McGill University, Montreal, QC, Canada

Caroline Robert, M.D. Dermatology Unit, Gustave Roussy Institute, Villejuif, France

Delphine Rolland, Ph.D. Department of Pathology, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, MI, USA

Etienne Rouleau, Ph.D. Department of Genetics, Institut Curie, Paris, France

David Rowbotham, B.Sc. Department of Integrative Oncology, BC Cancer Agency, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada
Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada

Soya S. Sam, Ph.D. Dartmouth Hitchcock Medical Center, Lebanon, NH, USA

Iris Schrijver, M.D. Department of Pathology, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, USA

Simon Patton, Ph.D. European Molecular Genetics Quality Network (EMQN) Genetic Medicine, St. Mary's Hospital, Manchester, UK

Gino R. Somers, M.D., Ph.D. Department of Paediatric Laboratory Medicine, Hospital for Sick Children, University of Toronto, Toronto, ON, Canada

Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, University of Toronto, Toronto, ON, Canada

Christos Sotiriou, M.D., Ph.D. Institut Jules Bordet, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium

Alan Spatz, M.D. Departments of Pathology and Oncology, McGill University, Montreal, QC, Canada

Lady Davis Institute, Jewish General Hospital, Montreal, QC, Canada

Srilakshmi Srinivasan, Ph.D. Translational Research Institute,
Queensland University of Technology, Woolloongabba, QLD, Australia

Maud H. W. Starmans, Ph.D. Informatics and Biocomputing Program,
Ontario Institute for Cancer Research, Toronto, ON, Canada

Department of Radiation Oncology, Maastricht University Medical Center,
Maastricht, The Netherlands

Sylviane Olschwang, Ph.D. UMR_S910, INSERM, Marseille, France
Department of Gastroenterology, Ambroise Paré Hospital, Marseille, France

Jeffrey J. Tanguay, M.D. Department of Pathology, University Health
Network, Toronto General Hospital, University of Toronto, Toronto, ON,
Canada

Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, University of Toronto,
Toronto, ON, Canada

Paul S. Thorner, M.D., Ph.D. Department of Paediatric Laboratory
Medicine, Hospital for Sick Children, University of Toronto, Toronto, ON,
Canada

Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, University of Toronto,
Toronto, ON, Canada

Ming-Sound Tsao, M.D. Department of Pathology, University Health
Network, Toronto General Hospital, University of Toronto, Toronto, ON,
Canada

Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, University of Toronto,
Toronto, ON, Canada

Gregory J. Tsongalis, Ph.D. Department of Pathology, Geisel School of
Medicine at Dartmouth, Lebanon, NH, USA

Dartmouth Hitchcock Medical Center, One Medical Center Drive, Lebanon,
NH, USA

Pamela M. Ward, Ph.D. USC/Norris Comprehensive Cancer Center,
Keck School of Medicine of University of Southern California, Los Angeles,
CA, USA

Kitchener D. Wilson, M.D., Ph.D. Department of Pathology, Stanford
University School of Medicine, Stanford, CA, USA

Cindy Yao, M.Sc. Informatics and Biocomputing Program, Ontario
Institute for Cancer Research, University of Toronto, Toronto, ON, Canada

Department of Medical Biophysics, University of Toronto, Toronto, ON,
Canada

George M. Yousef, M.D., Ph.D. Department of Laboratory Medicine,
St. Michael's Hospital, University of Toronto, Toronto, ON, Canada

Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, University of Toronto,
Toronto, ON, Canada

Dimitrios Zardavas, M.D. Institut Jules Bordet, Université Libre de
Bruxelles, Brussels, Belgium

Martha A. Zeiger, M.D. Department of Surgery, Johns Hopkins University
School of Medicine, Baltimore, MD, USA

中文版序一

病理学是在人类探索和认识自身疾病的过程中应运而生的。病理学的发展离不开病理技术的进步,病理学的发展史就是一部新技术的革命史,从器官病理学、细胞病理学、超微病理学、免疫病理学、分子病理学、远程病理学到当今的计算机网络信息病理学,每一个发展阶段都是病理学与新技术的融合。正如病理学前辈们所说:技术是病理学之母。

19世纪中叶,德国病理学家 Virchow 在显微镜的帮助下,首创了细胞病理学,不仅对病理学,而且对整个医学的发展做出了具有历史意义的、划时代的贡献。由此形成的传统病理学技术,如甲醛固定、石蜡切片、HE 染色,成为病理学的基本技术,已被广泛应用于基础和临床病理学实践。近半个世纪以来,尤其是近 20 多年来,一系列新方法新技术的相继建立和细胞生物学、分子生物学、现代免疫学、现代遗传学等新兴学科及其分支的迅速兴起和发展,也对病理学的发展产生了深刻的影响,带来了新的动力。病理学对疾病的认识更加深入,从大体、细胞、超微结构向分子基因水平推进,逐步阐明了许多长期以来未被认识的疾病的病因、发病机制及其本质,这些进展和发现,为许多疾病的防治开辟了新的前景。

21 世纪是分子病理学的时代,随着肿瘤发病率的增加以及分子靶向治疗在很多肿瘤治疗中取得的成功,分子检测手段日新月异,肿瘤分子诊断成为当今极为活跃的领域。方法学的发展、技术的进步,促使广大工作人员必须不断地学习,只有学习和接纳新技术,病理学科的发展才能呈现良性态势,跟上世界病理学发展的步伐。

目前,我国还没有系统介绍癌症分子检测的专著,复旦大学附属中山医院病理科侯英勇团队组织翻译了由 8 个国家的分子病理学专家联合编写的《癌症分子检测》一书,为大家提供了系统学习分子检测方法和分子病理知识的蓝本,有助于从事相关领域的读者参考,对我国病理学,特别是分子病理学做出了贡献。

刘彤华

中文版序二

复旦大学附属中山医院病理科成立于1992年,经过多年的发展,目前年外检量已超过100 000例。应临床诊断和治疗的需要,也率先开展了分子病理检测工作,建有合乎资质的规范化PCR实验室,分子检测项目以及组合项目逾60项,2015年获得国家卫生和计划生育委员会病理质量评价中心“PQCC示范实验室”称号。

分子病理领域发展迅速,目前国内还非常缺乏相关专著,为了从理论水平上获得更高的提升,了解和学习国外同行的实践经验是不可或缺的,而我们有幸获得了《癌症分子检测》一书的翻译权。该书由多个国家的分子病理团队撰写,提供了在这一领域积累的长期经验,先系统介绍了方法学,包括传统细胞遗传学、比较基因组杂交、聚合酶链式反应、单核苷酸多态性、二代测序技术、微阵列研究、蛋白组学和循环肿瘤细胞等,然后进一步深入地分14类疾病进行介绍和讨论,包括蛋白表达、基因突变、miRNA变化和 Related 分子靶点以及靶向治疗,不仅列举已成功应用于临床的非常有实用价值的生物标记物,而且也介绍了更多有前景的生物标记物组合,尤其还涉及了分子检测的质量、资质和监管问题,这也是分子检测快速发展阶段最不可忽视的内容。本书之所以由多国专家团队撰写,是因为癌症分子检测领域任何一个团队的经验摸索和积累都需要长期的付出和努力,包括平台的搭建完善、人员的培训成长以及学科的健康发展、成功经验和失败教训的总结。因此,获得该书的翻译权,我们如获至宝,希望通过本书的翻译,能让我国更多从事分子检测的医务人员从中获益。

这次,我们组织了复旦大学附属中山医院病理科团队参与本书的翻译,希望通过我们的努力,给大家带来一份学术上的盛宴。但由于时间紧迫,翻译中难免存在疏漏和不足,还望同仁们予以指正!

樊嘉

中文版前言

第一眼读到《癌症分子检测》原著一书,就萌生了翻译的冲动,我们立刻组织了翻译团队,经过大家辛苦的努力,译著终于正式出版!

众所周知,随着分子靶向药物在临床获得巨大的成功,新一代测序技术的迅猛推进,精准医疗概念的深入人心,伴随临床治疗和诊断的分子病理技术得到了前所未有的广泛应用。分子病理学成为病理学的发展方向和最具活力的领域,是临床病理崭新的重要组成部分。

老一辈病理工作者就非常重视病理诊断和技术的更新,积极努力地建设分子病理这一充满前景的领域。近年,各种分子病理培训班方兴未艾,对分子病理工作起到极大的推动作用。全国各地也涌现了许多分子病理骨干,在分子病理领域渐入佳境,甚至已将某些分子病理技术发挥得淋漓尽致,尤其将其与传统形态学、免疫组织化学和原位杂交手段相互整合,使病理诊断的内容更为丰富多彩和意义明确。

然而,大数据时代已经来临,正如书中所述,技术的巨大进步带来的问题是,各个专业紧跟时代步伐的速度和资源参差不齐,潜在的问题有待解决。《癌症分子检测》一书由来自美国、加拿大、澳大利亚、法国、英国、荷兰、比利时、希腊等国的分子病理团队担纲撰写,介绍多种多样的方法学,并以不同疾病为抓手,非常系统地阐述了这一快速发展的领域,不仅涵盖大量专业知识,也涉及了行业资质、规范、质量控制和监管的问题,具有普遍意义,这些正是我们所学、所思、所想。有机会翻译这本书,是我们团队一次系统学习和提高的过程,不仅提高了我们的常规和分子诊断水平,也激发了投入分子领域的热情和信心。希望我们的这本译著能够成为广大分子病理工作者和临床医师以及相关领域人员共同学习的专著。

由于时间和水平所限,难免有不当和错误之处,期待读者对我们提出宝贵意见,在此感谢大家对本书的支持和鼓励。

侯英男

目 录

第 1 部分 分子学方法和技术	1
第 1 章 诊断分子病理学转向基因组时代:癌症体细胞突变检测组合	3
第 2 章 癌症的传统与分子细胞遗传学	11
第 3 章 比较基因组杂交和基于比较基因组杂交的芯片在癌症中的应用	21
第 4 章 聚合酶链式反应	31
第 5 章 单核苷酸多态性(SNP)	43
第 6 章 DNA 测序的临床应用:Sanger 测序和二代测序平台	63
第 7 章 癌症中基于微阵列的研究	67
第 8 章 癌症诊断中的蛋白组学	83
第 9 章 循环肿瘤细胞:癌症的一种无创液体活检	93
第 2 部分 多种恶性肿瘤的分子应用	103
第 10 章 血液系统恶性肿瘤的分子检测	105
第 11 章 乳腺癌分子检测	131
第 12 章 胃肠肿瘤分子病理学	147
第 13 章 肺肿瘤分子检测	161
第 14 章 妇科恶性肿瘤分子检测	175
第 15 章 中枢神经系统肿瘤分子检测	185
第 16 章 成人肾肿瘤分子检测	195
第 17 章 前列腺癌分子检测	211
第 18 章 尿路上皮肿瘤分子检测	229
第 19 章 甲状腺癌分子检测	241
第 20 章 头颈部肿瘤分子检测	251
第 21 章 骨与软组织肿瘤分子检测	263
第 22 章 皮肤恶性黑色素瘤分子检测	277
第 23 章 儿童肿瘤分子检测	287
第 24 章 分子肿瘤学中的药物基因组学	311
第 25 章 癌症分子检测的质量保证	325
索引	333

第 1 部分

分子学方法和技术

诊断分子病理学转向基因组时代： 癌症体细胞突变检测组合

Kitchener D. Wilson, Iris Schrijver

引言

随着分子遗传学信息越来越多地用于指导疾病治疗决策,癌症的治疗方案正在快速演变。传统的癌症诊断依据组织学、解剖起源、细胞遗传以及基于蛋白的检测技术,如免疫组化、更近期出现的高维细胞表面标记流式细胞术。临床肿瘤学家仍部分依赖于这些指标以及肿瘤播散的程度来选择最合适的治疗方案。然而,分子检测与这些传统方法的整合已经将临床肿瘤学引入了“精准”医学时代^[1]。这一新的方向得益于过去几十年积累的海量数据,其揭示了许多既往未知的遗传学异常,其中很多有可能是癌症的关键驱动基因。尽管我们对这些分子改变中的大多数仍然知之甚少,但其中一小部分可见于多种肿瘤类型中,其可能是肿瘤发生和进展的关键基因。这些基因正在转化为临床癌症诊治的分子靶点。

这些常见分子缺陷的数量不断增加,其直接结果是能够针对特异性致癌信号通路靶点开发治疗药物^[2]。治疗决策越来越多地依赖遗传学生物标记物,最终导致分子靶向治疗权重增加,或最终甚至完全取代以往已建立起来的化学治疗。这些成功使得很多人从基因组视角看待癌症,在癌症发生和进展中存在的大量遗传学事件,可以用于对患者分层进行靶向治疗。对于临床分子实验室,二代测序技术(next-generation sequencing, NGS)显然是肿瘤基因谱分析最有前景的关

键技术。相信在接下来的数十年,NGS设备将会在临床实验室中普及。这项强大的技术能够进行全基因组、外显子组、转录子组测序,其速度远快于传统的以Sanger为基础的方法,其价格也更为便宜,这一技术已经革新了基础研究领域。为利用NGS了解多种多样的肿瘤在基因组和表观组水平的变化,多个国家已经联合启动了一些大型的研究项目,包括癌症基因组图谱(the Cancer Genome Atlas, TCGA)和国际癌症基因联合(the International Cancer Genome Consortium, ICGC)项目^[3]。希望这些分子数据能够引发学术界和企业界开展重要的研究,最终获得新的药物靶点和有临床价值的分子标记物^[4]。对于临床肿瘤学,使用NGS检测每种癌症的基因谱,寻找临床可行的分子靶点,体现了最终达到癌症精准医疗的目标^[5]。

尽管NGS在临床肿瘤领域显现出很好的前景,但其花费较高以及需要专业人士和计算设备处理复杂的数据,导致目前在多数临床实验室不能实现NGS检测。幸运的是,从长远看来,全基因组测序的费用还会下降,直至降到临床能够很经济地开展,尽管这个时间还难以预测。即便全基因组测序的检测费用降至“千美元”级,真正阻碍NGS用于肿瘤分型的也并非费用本身,而是后期复杂的数据分析。不过也有一些好消息:目前已经开发了一些技术以减少NGS数据的复杂性,即在测序之前,仅富集DNA外显子区域(“外显子测序”),从而避开巨大的知之甚少的基因内部和内含子区域。此外,DNA条码和样本池的进展也可以在增加通量的同时降低费用^[6]。而且,显然学术界和企业界也正在致力于生物信息数据分析的流水线操作,这样不具备数据分析能力的实验室人员可以通过将测序读数与人类基因组对比,进而获得基因突变信息。

尽管有这些技术上的进步,但在NGS技术足够成熟

K.D. Wilson, M.D., Ph.D. • I. Schrijver, M.D. (✉)
Department of Pathology, Stanford University School
of Medicine, 300 Pasteur Drive, Stanford,
CA 94305, USA
e-mail: ischrijver@stanfordmed.org

并获得验证、计算设备的费用能够负担,并在临床癌症诊断中广泛应用之前,还需要几年的时间。此外,尽管NGS技术可以揭示患者与疾病进展或药物反应相关的生物标记物,但这些信息并不足以保证它们是肿瘤表型的根本机制或通路,并能作为治疗靶点^[6]。因此,需要更为先进的技术和分析方法以明确、富集与癌症进展和治疗反应直接相关的突变。在不久的将来,仍存在着难以克服的阻碍NGS常规应用于临床癌症检测的挑战。

尽管有这些局限性,但常规癌症基因分型分析方法的成功[如细胞基因组学、FISH(荧光原位杂交技术)、PCR(聚合酶链式反应)、Sanger测序、片段分析],已经迫使肿瘤学家和病理学家重新审视其依赖解剖起源和临床进展诊断肿瘤亚型而不考虑肿瘤内在基因改变的做法^[5]。虽然这些方法已经建立得很完善,但它们通常是费力的,而且在临床样本上提供的癌症基因组信息也很有限。为了弥合传统方法和正在到来的NGS时代之间的障碍,应用现有的分子技术开发了相对简单的多重诊断方法,从而高效率、高性价比地提供了大量的分子信息。这些较新方法在检测突变上具有高敏感性和特异性,可以检测大量的(数以百计)癌基因和抑癌基因,对新鲜组织与石蜡包埋组织均具有很强的DNA突变检测能力。重要的是,这些检测技术使得分子病理实验室能为临床医师提供高通量的肿瘤分子检测,而且不像二代测序那样需要大量的资源投入。

SNaPshot就是其中的一个范例,这是一种首先由美国麻省总医院开发的强大的、高敏感性的肿瘤基因分型技术^[2]。这项高通量基因谱平台需求的主要设备是一台毛细管电泳-自动DNA测序仪,可以多通路检测数百个独立、已知、临床中发挥作用的核苷酸常见改变位置。更重要的是,SNaPshot法快速、敏感、特异、性价比高,具有足以在组合中继续增加分子靶点的灵活性。当与其他方法,如Sanger测序和片段长度分析相结合,就可以保证临床分子实验室在现有资源耗费和技术基础上,获得全面的癌症检测方案。自2011年起,斯坦福大学实验室开发并提供了一项使用该方法的检测,其用于高通量癌症基因谱检测。在诊断分子病理学转向基因组的时代,本章将以我们现有的高通量临床基因检测方法作为示例进行介绍。

SNaPshot 法检测多重基因突变

SNaPshot法(图1.1)由多重PCR和一个单碱基延伸测序反应组成,后者中等位基因特异性探针由双脱氧核苷酸(ddNTP)荧光标记,用以检测基因组中感兴趣

的位点(图1.2)。每个探针上不同延伸长度的引物通过电泳和自动DNA测序进行分辨。一旦片段大小确定下来,就可以通过探针的分子量和ddNTP荧光标记的颜色判别每个位置特定的核苷酸。总体而言,对于现今的分子病理学实验室,这一相对简单的方法有几个明显的优势:①大多数现代临床实验室已经拥有所需要的专业知识和基础设施,无需再投入成千上万美元购置高科技仪器;②该方法是高度敏感的;③可以很好地用FFPE组织中提取的核酸完成实验;④由于SNaPshot技术的多重性特征,组织要求以及成本都很低;⑤这个系统是模块化的,可以纳入更多的反应分子预测物。

在当前的配置中,斯坦福大学分子病理学实验室的基因分型平台“癌症体细胞突变组合”(cancer somatic mutation panel, CSMP)由SNaPshot、片段大小检测和Sanger测序组成,检测16个关键癌症基因中超过140个常见突变位点(表1.1)。CSMP包括9个SNaPshot组合,每个都具有6~8个多重检测以测定单核苷酸改变。由于SNaPshot技术的一个缺点是只能检测单核苷酸变化而不能检测更大的基因组插入/缺失,因此增加了一个单独的毛细管电泳片段分析以检测*EGFR*和*ERBB2/HER2*中多种常见长度的突变。SNaPshot技术的第二个缺陷是当靶基因中含有大量临床相关的核酸改变时,在常规癌症诊断中就不能采用SNaPshot单碱基延伸靶向测序。这样的例子是RNA剪接亚基*SF3B1*基因^[7],其在15号外显子具有多个热突变位点。因此,我们开发出了一种Sanger DNA测序靶向测定15号外显子,并且作为CSMP的一部分,应用于所有的样本。

最初,斯坦福实验室的CSMP涵盖了FDA批准的临床治疗靶点或临床实验正在进行治疗靶点。但是,我们利用该平台的灵活性,把医学文献报道的、经临床证实后的新基因突变在几个月内添加到组合中。*MYD88*基因就是这样一个例子^[8]。重要的是,虽然CSMP中包含的突变可用于指导临床决策,但这些突变的完整临床意义仍在不断扩展中。因此,与经治医师讨论癌症基因谱检测中的多种靶点及其临床中的意义,是一个实验室长期应有的责任。

虽然生物标记物的发现和临床分子检测的发展将继续推进癌症治疗的个体化,但各个医学亚专业接受分子信息的步伐并不一致。我们CSMP的检测经验很清楚地显示一些临床部门(例如,胸部肿瘤科、血液/肿瘤科)能够很快接受高通量检测,而其他临床部门接受这种检测要慢得多。通过与临床医师交流,我们发现犹豫不决的原因是需要针对结果做出更复杂的解释,以及大型突变检测组合的价值问题。即便如此,显