DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2019.20190157

·论 著·

晚期非小细胞肺癌患者肿瘤突变负荷与靶向治疗疗效相关性

童 琳△，丁 宁△，李佳旻，徐晓波，张 勇，叶茂松，李 春，张 新，洪群英，周 建，白春学，胡 洁*

复旦大学附属中山医院呼吸科，上海市呼吸病研究所，上海 200032

［摘要］ **目的**：探讨晚期非小细胞肺癌肿瘤突变负荷（TMB）与肿瘤靶向治疗疗效的相关性。**方法**：纳入2016年1月至2018年1月在复旦大学附属中山医院行靶向治疗的51例晚期非小细胞肺癌患者，采用靶向二代测序技术检测其肿瘤组织标本的TMB水平，并分析TMB与靶向治疗疗效的相关性。**结果**：51例非小细胞肺癌患者的中位TMB水平为6.2个突变/Mb，其中吸烟患者的TMB水平较不吸烟患者升高（$P=0.046$）。将所有入组患者分为高TMB组和中低TMB组，生存分析显示：与高TMB组相比，中低TMB组患者的无进展生存期（PFS）更长（410 d *vs* 217 d，HR=0.331，95% CI 0.165～0.665，$P=0.001\ 2$）。亚组分析显示：在男女性、有无吸烟史、合并TP53基因突变与否患者中，中低TMB组者的中位PFS均长于高TMB组患者（$P<0.05$）；在腺癌、表皮生长因子受体（EGFR）突变、EGFR 19外显子缺失、EGFR L858R患者中，中低TMB组患者的中位PFS也长于高TMB组患者（$P<0.05$）。**结论**：对于具有驱动突变的晚期非小细胞肺癌患者，肿瘤组织TMB水平对靶向治疗疗效具有预测作用，高TMB水平提示靶向治疗患者的PFS更短。

［关键词］ 肿瘤突变负荷；晚期非小细胞肺癌；靶向治疗；无进展生存期

［中图分类号］ R 734.2 ［文献标志码］ A

Relationship between tumor mutational burden and efficacy of targeted therapies in patients with advanced non-small cell lung cancer

TONG Lin△, DING Ning△, LI Jia-min, XU Xiao-bo, ZHANG Yong, YE Mao-song, LI Chun, ZHANG Xin, HONG Qun-ying, ZHOU Jian, BAI Chun-xue, HU Jie*

Department of Pulmonary Medicine, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai Respiratory Research Institute, Shanghai 200032, China

［**Abstract**］ **Objective**: To explore the relationship between tumor mutational burden (TMB) and efficacy of targeted therapies in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods**: Between Jan. 2016 and Jan. 2018, fifty-one NSCLC patients receiving targeted therapy were enrolled in Zhongshan Hospital, Fudan University. TMB levels in tumor tissue samples from these patients were examined using targeted next-generation sequencing. **Results**: The median TMB level of NSCLC patients with driver mutations and receiving targeted therapy was 6.2 mutations/Mb, with TMB levels in smokers significantly higher than non-smokers ($P=0.046$). All enrolled patients were divided into high TMB and moderate/low TMB groups. Survival analysis showed that patients with moderate/low TMB had longer progression-free survival (PFS) compared with patients with high TMB (410 d *vs* 217 d, HR= 0.331, 95% CI 0.165-0.665, $P=0.001\ 2$). Subgroup analysis showed that the median PFS was longer in the moderate/low TMB group than that in the high TMB group among the subgroups of gender, whether smoking, and TP53 gene mutation status. In the subgroups of adenocarcinoma who harbor epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations, EGFR exon 19 deletion, and EGFR L858R, the median PFS was also longer in the moderate/low TMB group than that in the high TMB group ($P<0.05$). **Conclusions**: For advanced NSCLC patients with driver mutations, the TMB level of tumor tissue is a predictor of the efficacy of targeted therapy. High TMB level suggests that PFS is shorter in patients receiving targeted therapy.

［收稿日期］ 2019-02-02 ［接受日期］ 2019-03-06

［基金项目］ 上海市重中之重临床医学中心和重点学科（2017ZZ02013），北京医卫健康公益基金会医学科学研究基金（F2037E-中山医院）。Supported by Shanghai Top-Priority Clinical Key Disciplines Construction Project (2017ZZ02013), and Beijing Medical and Health Public Welfare Foundation Medical Science Research Fund (F2037E-Zhongshan Hospital).

［作者简介］ 童 琳，博士，主治医师。E-mail：tong.lin@zs-hospital.sh.cn

丁 宁，硕士，主治医师。E-mail：ding.ning@zs-hospital.sh.cn

△共同第一作者（Co-first authors）

*通信作者（Corresponding author）。Tel：021-64041990，E-mail：hu.jie@zs-hospital.sh.cn

[Key Words] tumor mutational burden; advanced non-small cell lung cancer; targeted therapy; progression-free survival

肿瘤突变负荷(tumor mutational burden, TMB)是免疫检查点(如PD-1/PD-L1)抑制剂治疗晚期肺癌疗效的预测生物标志物之一[1-4]。多项临床研究[5-8]采用二代测序技术(next-generation sequencing, NGS)检测肿瘤组织的TMB,发现实体瘤患者免疫治疗的生存获益与高TMB相关。有研究[9]发现,在表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)突变患者中,EGFR-酪氨酸激酶抑制剂(TKIs)治疗的疗效和预后与TMB密切相关,但与免疫治疗的情况相反,即高TMB患者经EGFR-TKI治疗后的总生存期和至治疗停止时间(TTD)均较中低TMB患者缩短。

约20%的非小细胞肺癌(NSCLC)患者具有EGFR敏感突变,包括常见的19外显子缺失、L858R,以及罕见的L861Q、G719S等。EGFR-TKIs靶向治疗能改善晚期肺癌患者的预后,提高中位无进展生存期(PFS)至12个月,客观缓解率达70%[10]。在具有间变性淋巴瘤激酶(ALK)融合基因(约5%NSCLC患者)、活性氧簇-1(ROS-1)融合基因(约1%NSCLC患者)、Met 14外显子跳跃式突变(约4%NSCLC患者)等驱动突变的晚期肺癌患者中,克唑替尼治疗的客观缓解率可达60%,中位无进展生存期(PFS)为7～19个月[11-15]。然而,不同患者间TKIs治疗的缓解持续时间存在较大差异,目前尚缺乏提示其疗效的预测标志物。因此,本研究采用靶向富集目标基因NGS技术,对晚期肺癌患者的肿瘤组织标本进行包含416个肿瘤相关基因的检测,分析肿瘤组织TMB水平与TKIs靶向治疗疗效的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 纳入2016年1月～2018年1月在复旦大学附属中山医院接受一线TKIs靶向治疗,存在敏感驱动突变的51例亚裔晚期NSCLC患者。主要入选标准:(1)年龄>18岁;(2)经支气管镜或经皮肺穿刺原发灶活检,确诊为原发性非小细胞肺癌;(3)经全身影像学检查,根据国际肺癌研究协会(IASLC)第8版肺癌TNM分期评估为ⅢB～Ⅳ期肺癌;(4)予一线TKIs靶向治疗,包括一代或二代EGFR-TKIs和克唑替尼;(5)能够提供足够的肿瘤组织标本进行NGS。主要排除标准:(1)患有除原发性肺癌外的其他恶性肿瘤;(2)怀孕。本研究经复旦大学附属中山医院伦理委员会审核批准(B2016-154R),所有患者均签署知情同意书。

最终本研究共纳入51例晚期肺癌患者,中位年龄为61岁(28～71岁),其中27例(53%)为女性,41例(80%)无吸烟史。病理诊断:腺癌44例(86%),腺鳞癌3例(6%),鳞癌3例(6%),病理类型不确定的非小细胞肺癌(NSCLC-NOS)1例(2%)。中位随访时间为18个月。患者一般情况见表1。

表1 患者一般情况

指 标	总体 (N=51)	高TMB组 (N=16)	中低TMB组 (N=35)
年龄/岁			
中位数	61	64	59
范围	28～71	50～75	28～85
性别 n(%)			
女性	27(53)	8(50)	19(54)
男性	24(47)	8(50)	16(46)
病理诊断 n(%)			
腺癌	44(86)	13(81)	31(89)
鳞癌	3(6)	2(13)	1(3)
腺鳞癌	3(6)	1(6)	2(6)
(3NSCLC-NOS	1(2)	0(0)	1
治疗药物 n(%)			
EGFR-TKIs	43(84)	15(94)	28(80)
克唑替尼	8(16)	1(6)	7(20)
临床分期 n(%)			
ⅢB	3(6)	1(6)	2(6)
Ⅳ	48(94)	15(94)	33(94)
吸烟史 n(%)			
不吸烟	41(80)	10(63)	31(89)
正在吸烟	6(12)	4(25)	2(6)
曾吸烟	4(8)	2(13)	2(6)
ECOG-PS评分 n(%)			
0分	33(65)	11(69)	22(63)
1分	14(27)	5(31)	9(26)
2分	2(4)	0	2(6)
3分	2(4)	0	2(6)

NSCLC-NOS:病理类型不确定的非小细胞肺癌;EGFR-TKIs:表皮生长因子受体-酪氨酸激酶抑制剂;ECOG-PS:美国东岸癌症临床研究合作组织-体力状况评分

1.2 基因检测 收集51例患者的支气管镜或经皮肺穿刺活检肿瘤组织标本,送南京世和基因生物技术有限公司进行NGS检测。同时采集静脉血用于阴性对照,以判断种系突变。

1.2.1 样本处理 肿瘤标本：取经甲醛固定和石蜡包埋(FFPE)的肿瘤组织6～10 μm(n≥5)，用苏木精-伊红(H-E)染色后，由病理专家判断其中肿瘤细胞含量；采用肿瘤细胞含量大于10%的组织。血浆样本：用EDTA抗凝管收集8～10 mL外周血，于2 h内分离血浆(1 800 ×g，离心10 min)，白细胞沉淀用于阴性对照。

1.2.2 DNA提取和文库准备 采用Qiagen公司试剂盒提取组织和白细胞DNA。测序文库使用KAPA Hyper Prep试剂盒(KAPA Biosystems)进行制备。PCR扩增和文库纯化后进行目标基因富集。

1.2.3 目标基因富集和测序 DNA文库加标签后，将多个样本混合，得到总量为2 μg的DNA混合文库。用定制的生物素型DNA探针(GeneseeqOne™)，对文库中416个癌症相关基因的编码区域和16个基因的内含子进行杂交、捕获。用Illumina p5、p7引物和KAPA HiFi HotStart ReadyMix (KAPA Biosystems)对文库DNA进行扩增，富集得到的文库在HiSeq4000(Illumina)平台上用2×150 bp测序试剂盒(Illumina)进行测序。

1.3 测序数据处理 用Trimmomatic 25软件对测序数据进行过滤，去除低质量碱基或N碱基，并通过BWA(Burrows-Wheeler Aligner)将过滤后的数据与参考序列hg19基因组(Human Genome version 19)对比。采用GATK(Genome Analysis Toolkit)分析单核苷酸变异(SNV)和插入缺失突变(indel)；经单核苷酸多态性数据库(dbSNP)和国际千人基因组计划分析后去除常见变异。

1.4 TMB计算及分组 TMB定义为编码区1 Mb碱基中所含有的肿瘤特有突变的个数。将肿瘤样本与白细胞数据进行比对，分析体细胞突变，去除种系突变。TMB包括编码区域SNV(含错义突变和同义突变)和插入缺失突变，而去除原发性肺癌中驱动基因突变和常见抑癌基因的截短突变和移码突变。根据Offin等[9]研究，采用三分法将51例患者分为高TMB组(TMB≥8)和中低TMB组(TMB<8)。

1.5 统计学处理 采用SPSS 16.0软件，计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，两组间比较采用t检验。生存分析以Kaplan-Meier方法，组间差异比较采用Mantel-Cox Log-rank检验；风险比采用Mantel-Haenszel方法计算。检验水准(α)为0.05。

2 结 果

2.1 两组患者的基本资料及基因突变情况比较 51例患者的中位TMB水平为6.2个突变/Mb。高TMB组患者的中位TMB为10.6个突变/Mb，中低TMB组患者的中位TMB为3.7个突变/Mb。两组患者的一般情况差异无统计学意义(表1)。两组患者的基因突变情况见表2。

表2 患者的基因突变信息

突 变	全部患者(N=51)	高TMB组(N=16)	中低TMB组(N=35)
驱动突变 n(%)			
EGFR突变	42(82)	15(94)	27(77)
ALK融合	6(12)	1(6)	5(14)
HER2突变	1(2)	0	1(3)
ROS-1融合	1(2)	0	1(3)
Met 14外显子跳跃式突变	1(2)	0	1(3)
TP53 n(%)			
突变型	22(43)	8(50)	14(40)
野生型	29(57)	8(50)	21(60)
TMB			
中位	6.2	3.7	10.6
范围	0～27.4	0～7.5	8.7～27.4

EGFR：表皮生长因子受体；ALK：间变性淋巴瘤激酶；HER2：人表皮生长因子受体-2；TMB：肿瘤突变负荷

2.2 TP53基因突变对TMB的影响 高TMB组患者合并TP53突变的频率(50%)较中低TMB组(40%)高(表2)。TP53突变患者的TMB与野生型差异无统计学意义(图1)。

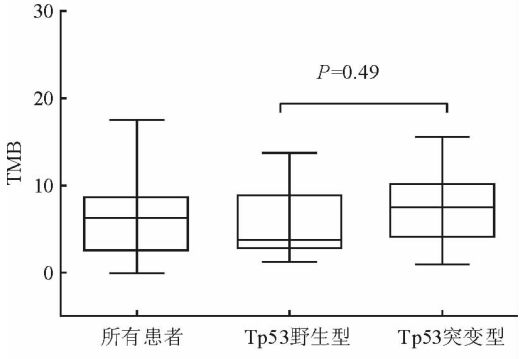

图1 TP53突变对肿瘤组织TMB的影响

TMB：肿瘤突变负荷

2.3 吸烟对TMB的影响 高TMB组患者中有吸烟史的患者占比高于(37%)中低TMB组(11%，表1)。有吸烟史患者的TMB高于无吸烟史患者(P=0.046，图2)。

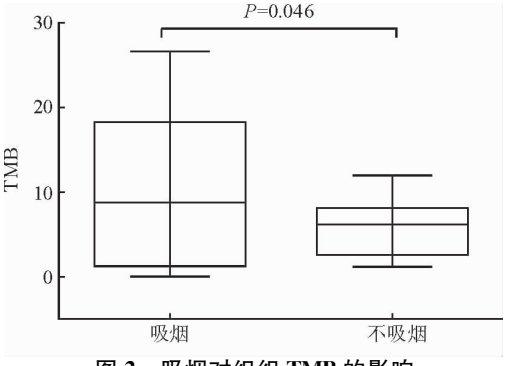

图 2　吸烟对组织 TMB 的影响

TMB:肿瘤突变负荷

2.4　TMB 与 TKIs 靶向治疗疗效的关系　Log-rank 分析(图 3A)显示:中低 TMB 组患者的中位 PFS 显著长于高 TMB 组患者(410 d *vs* 217 d,HR=0.331,95% CI 0.165～0.665,P=0.001 2)。亚组分析(图 3B)显示:在男女性、有无吸烟史、合并 TP53 基因突变与否患者中,中低 TMB 组患者的中位 PFS 均长于高 TMB 组患者(P<0.05);在腺癌、EGFR 突变、EGFR 19 外显子缺失、EGFR L858R 患者中,中低 TMB 组患者的中位 PFS 均长于高 TMB 组患者(P<0.05);在非腺癌患者中,中低 TMB 组患者的中位 PFS 有长于高 TMB 组患者的趋势(HR=0.286,95%CI 0.05～1.77,P=0.15)。Log-rank 分析(图 3C)显示:在 EGFR 突变患者中,经 EGFR-TKIs 治疗后,中低 TMB 组患者的中位 PFS 长于高 TMB 组患者(410 d *vs* 189 d,HR=0.256,95% CI 0.108～0.608,P=0.002)。

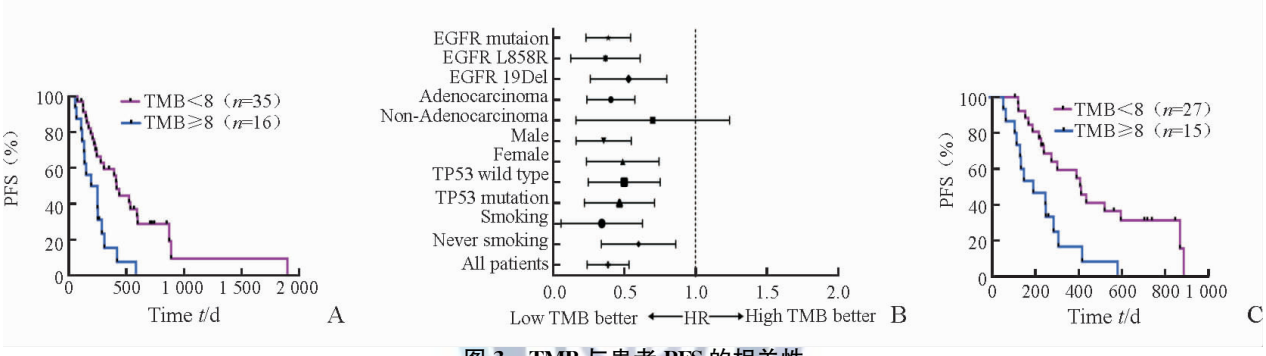

图 3　TMB 与患者 PFS 的相关性

A:总体患者;B:亚组分析结果;C:EGFR 突变患者. TMB:肿瘤突变负荷;PFS:无进展生存期;EGFR:表皮生长因子受体

3　讨　论

目前认为在免疫治疗中,高 TMB 与治疗反应的关系是基于增加的肿瘤特异性新生抗原负荷。而在靶向治疗中,高 TMB 水平可能与耐药通路增加或肿瘤亚克隆导致临床耐药相关。Offin 等研究[9]发现,EGFR 突变患者中,EGFR-TKIs 的疗效、患者预后与 TMB 密切相关,与免疫治疗情况相反。然而,这项研究中仅纳入了 EGFR 19 外显子缺失和 L858R 突变的Ⅳ期肺癌患者,且其中 92%的患者接受了厄洛替尼治疗,因此该结论可外推的范围有限。此外,该研究的疗效衡量指标采用 TTD,而由于多数采用靶向治疗的患者在疾病缓慢进展时仍继续使用 TKIs,因此 TTD 与 PFS 在靶向治疗的疗效评估中存在一定差异。本研究采用 PFS 作为靶向治疗疗效的评估指标,且包括ⅢB～Ⅳ期患者,同时纳入了 EGFR 突变(包括非常见 EGFR 突变)及 ALK 融合、ROS-1 融合等相对少见突变类型的患者,治疗药物包括一代及二代 EGFR-TKIs(吉非替尼、厄洛替尼、埃克替尼、阿法替尼)和克唑替尼。因此本研究更贴近真实世界情况,结论的可外推范围更广。

Offin 等[9]发现,TP53 突变与疾病至进展时间短有关,高 TMB 组患者中 TP53 突变者的比例高于中低 TMB 组,但多因素分析中校正 TP53 突变状态后仍显示高 TMB 水平与患者预后差相关。本研究结果与该研究相一致,提示合并 TP53 突变对 TMB 预测 TKIs 在晚期肺癌患者中的疗效无明显影响。

本研究结果提示,在具有敏感驱动突变的晚期肺癌患者中,中低 TMB 组患者靶向治疗 PFS 较高 TMB 组患者明显延长,且在亚组分析中得出了相似结论,提示 TKIs 靶向治疗对中低 TMB 组患者的疗效优于高 TMB 组患者。然而,本研究尚存在一定缺陷,包括:缺乏总生存期数据,无法分析 TMB 与预后的关系;非前瞻性研究;样本量较少等。今后需进一步设计前瞻性临床研究,并扩大研究队列的样本量,以进一步验证本研究结论。

参考文献

[1] ROSENBERG J E, HOFFMAN-CENSITS J, POWLES T,

et al. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial[J]. Lancet, 2016,387(10031):1909-1920.

[2] RIZVI N A, HELLMANN M D, SNYDER A, et al. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer[J]. Science, 2015,348(6230):124-128.

[3] SNYDER A, MAKAROV V, MERGHOUB T, et al. Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma[J]. N Engl J Med, 2014,371(23):2189-2199.

[4] HELLMANN M D, CALLAHAN M K, AWAD M M, et al. Tumor mutational burden and efficacy of nivolumab monotherapy and in combination with ipilimumab in small-cell lung cancer[J]. Cancer Cell, 2018,33(5):853-861. e4.

[5] HELLMANN M D, CIULEANU T E, PLUZANSKI A, et al. Nivolumab plus ipilimumab in lung cancer with a high tumor mutational burden[J]. N Engl J Med, 2018,378(22):2093-2104.

[6] GANDARA D R, PAUL S M, KOWANETZ M, et al. Blood-based tumor mutational burden as a predictor of clinical benefit in non-small-cell lung cancer patients treated with atezolizumab[J]. Nat Med, 2018,24(9):1441-1448.

[7] FORDE P M, CHAFT J E, PARDOLL D M, et al. Neoadjuvant PD-1 blockade in resectable lung cancer[J]. N Engl J Med, 2018, 379(9):e14.

[8] CARBONE D P, RECK M, PAZ-ARES L, et al. First-line nivolumab in stage Ⅳ or recurrent non-small-cell lung cancer[J]. N Engl J Med, 2017,376(25):2415-2426.

[9] OFFIN M, RIZVI H, TENET M, et al. Tumor mutation burden and efficacy of egfr-tyrosine kinase inhibitors in patients with EGFR-mutant lung cancers[J]. Clin Cancer Res, 2019, 25(3):1063-1069.

[10] GRIGORIU B, BERGHMANS T, MEERT A P. Management of EGFR mutated nonsmall cell lung carcinoma patients[J]. Eur Respir J, 2015,45(4):1132-1141.

[11] SOLOMON B J, MOK T, KIM D W, et al. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer[J]. N Engl J Med, 2014,371(23):2167-2177.

[12] SHAW A T, KIM D W, NAKAGAWA K, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer[J]. N Engl J Med, 2013,368(25):2385-2394.

[13] SHAW A T, OU S H, BANG Y J, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer[J]. N Engl J Med, 2014,371(21):1963-1971.

[14] REUNGWETWATTANA T, OU S H. MET exon 14 deletion (METex14): finally, a frequent-enough actionable oncogenic driver mutation in non-small cell lung cancer to lead MET inhibitors out of "40 years of wilderness" and into a clear path of regulatory approval[J]. Transl Lung Cancer Res, 2015,4(6):820-824.

[15] 喻敏成,胡 博,傅佩尧,等. 抗 PD-1/PD-L1 抗体临床治疗不良反应研究进展[J]. 中国临床医学,2018,25(4):625-631.

[本文编辑] 姬静芳