

神经营养因子受体酪氨酸激酶基因融合在野生型胃肠间质瘤精准诊治中的研究

张海东¹ 尹晓南¹ 蔡兆伦¹ 张波^{1,2}

¹四川大学华西医院胃肠外科,成都 610041; ²三亚市人民医院 四川大学华西三亚医院, 572000

通信作者:张波, Email: zhangbo7310@126.com

【摘要】 神经营养因子受体酪氨酸激酶(*NTRK*)基因负责编码 *NTRK*, *NTRK* 在神经系统的发育和功能中扮演着重要的角色。*NTRK* 基因融合突变导致嵌合体 *NTRK* 蛋白的产生,该蛋白通过组成性激活或者过度表达,从而获得致癌潜力。*NTRK* 基因融合突变会导致一类特殊类型野生型 GIST 的发生,其临床表现及治疗与其他类型 GIST 完全不同。这种融合突变,可以在临床中通过多种方法检测到,包括肿瘤 DNA、RNA 测序以及免疫组织化学染色等。对于 *NTRK* 基因融合阳性的肿瘤患者,酪氨酸激酶抑制剂如拉罗替尼(larotrectinib)或恩曲替尼(entrectinib)均表现出良好的抗肿瘤效果,临床应答率高达 75%。因此,需提高对此类患者的认识和检出,使用酪氨酸激酶抑制剂进行个体化精准治疗,从而改善其预后。

【关键词】 胃肠间质瘤,野生型; 神经营养因子受体酪氨酸激酶基因; 酪氨酸激酶抑制剂; 精准治疗

基金项目: 四川省科技厅重点研发项目(2020YFS0234); 四川大学华西医院学科卓越发展 1.3.5 工程项目(ZYJC18034)

Study of neurotrophic factor receptor tyrosine kinase gene fusion in the precise treatment of wild-type gastrointestinal stromal tumor

Zhang Haidong¹, Yin Xiaonan¹, Cai Zhaolun¹, Zhang Bo^{1,2}

¹Department of Gastrointestinal Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; ²Department of Gastrointestinal Surgery, Sanya People's Hospital, West China Sanya Hospital, Sichuan University, Hainan Sanya 572000, China

Corresponding author: Zhang Bo, Email: zhangbo7310@126.com

【Abstract】 The neurotrophin receptor kinase (*NTRK*) gene encodes neurotrophic factor receptor tyrosine kinase (*NTRK*), which plays an important role in the development and function of the nervous system. *NTRK* gene fusion mutation results in the production of chimeric *NTRK* proteins, which have carcinogenic potential through constitutive activation or overexpression. *NTRK* gene fusion mutation can lead to a special type of wild type gastrointestinal stromal tumor (GIST), whose clinical manifestations and treatment are completely different from other types of GIST. This fusion mutation can be detected clinically by a variety of methods, including tumor DNA and RNA sequencing and immunohistochemical staining. In patients with *NTRK* fusion positive tumors, *NTRK* inhibitors such as larotrectinib and entrectinib have

DOI: 10.3760/cma.j.cn.441530-20210831-00349

收稿日期 2021-08-31 本文编辑 卜建红

引用本文:张海东,尹晓南,蔡兆伦,等. 神经营养因子受体酪氨酸激酶基因融合在野生型胃肠间质瘤精准诊治中的研究[J]. 中华胃肠外科杂志, 2021, 24(9): 769-774. DOI: 10.3760/cma.j.cn.441530-20210831-00349.



shown good antitumor efficacy, with clinical response rates as high as 75%. Therefore, there is a need to improve the recognition and detection of such patients and to improve their prognosis by individualized and precise treatment with TRK inhibitors.

【Key words】 Gastrointestinal stromal tumor, wild-type; *Neurotrophic factor receptor tyrosine kinase (NTRK)* gene; Tyrosine kinase inhibitors; Precise therapy

Fund program: Project Sichuan Science and Technology Support Program (2020YFS0234); 1.3.5 project for disciplines of excellence; West China Hospital, Sichuan University (ZYJC18034)

胃肠间质瘤(gastrointestinal stromal tumors, GIST)是胃肠道最常见的间叶源性肿瘤,尽管其发病率较低(10~15/百万人),但每年的新发病例数呈逐年上升趋势^[1]。大多数 GIST 患者涉及 *c-Kit* 基因突变(80%~85%)和 *PDGFRA* 基因突变(5%~7%),通过受体酪氨酸激酶的小分子靶向抑制剂(伊马替尼等),*KIT/PDGFRA* 突变型的 GIST 在治疗上获得了革命性的突破^[2-3]。但在 *KIT/PDGFRA* 突变阴性的野生型 GIST 患者中,由于驱动癌基因的分子谱被深入研究,使得野生型 GIST 分类的类型得到细化。有研究者指出,野生型 GIST 是一种不同疾病的异质性组合,而不是单一的实体^[4]。其中,除了神经纤维瘤病 1 型(NF-1)相关的 GIST 以及 *BRAF/KRAS* 突变的 GIST 和 SDH 缺失 GIST^[5-7]外;最近,GIST 样肿瘤被发现,神经营养因子受体酪氨酸激酶(neurotrophin receptor kinase, *NTRK*)基因融合也是致癌驱动因子^[8]。鉴于当前 *NTRK* 基因融合突变靶向治疗的疗效,该突变类型在野生型 GIST 中的检出将会显著改善其预后。本文对 *NTRK* 基因融合突变在野生型 GIST 精准治疗中的潜在应用价值进行探讨。

一、*NTRK* 和酪氨酸激酶的生物学特征和致病作用

NTRK 由高度同源的激酶 TrkA、TrkB、TrkC 组成,属于 *NTRK* 基因家族的 3 位成员——*NTRK1*、*NTRK2*、*NTRK3* 编码。编码基因分别位于染色体 1q22、9q21、15q25 不同区段^[9-10]。1999 年, Mardy 等^[11]克隆出了 *NTRK1* 基因的全序列,该基因编码由 790 或者 796 个氨基酸残基构成蛋白质(TrkA 受体)。*NTRK2* 基因位于 9q22.1,其包含 24 个外显子,编码由 822 氨基酸残基组成蛋白质(TrkB 受体)^[12]。*NTRK3* 基因位于 15q25,编码产物为大小 145 kD 的糖蛋白(TrkC 受体)^[13]。该受体常表达于海马回、大脑皮层以及小脑颗粒细胞层。酪氨酸受体激酶(tyrosine receptor kinase, TRK)具有相对保守的结构,包含一个细胞外配体结合区域、一个跨膜区域和一个细胞

内的酪氨酸激酶区域^[14]。该受体基因家族拥有着 75% 的序列同源性。这些受体酪氨酸激酶在人类神经组织中表达,并通过激活神经营养因子在神经系统的生理发育和功能中发挥重要作用,不同的 TRK 蛋白受体对各种神经营养因子的亲和力有着显著的差异^[15]。神经营养因子与 TRK 结合后可诱发受体的二聚化和胞内激酶区的酪氨酸残基自身磷酸化,从而进一步激活 RAS/MAPK、RAS/ERK、PLC γ 、PI3K 和 PI3/AKT 等下游信号转导通路,并达到促进细胞增殖、分化、生长和存活以及防止细胞凋亡等功能。*NTRK* 基因融合突变在 1982 年首次发现于结直肠癌中(*TPM3-NTRK1*)^[16]。融合突变是 *NTRK* 基因获得致癌潜力的主要突变形式^[17]。在所有已报道的 *NTRK* 融合突变中,*NTRK* 基因的 3' 端与融合伙伴基因的 5' 端相接,尽管融合位点根据具体伙伴基因的不同而各异,但都保留了 *NTRK* 基因中的酪氨酸激酶域的编码序列。*NTRK* 基因的融合突变导致具有组成性激活或过表达激酶功能的嵌合体 TRK 蛋白的转录,从而获得致癌潜力。除了融合突变外,*NTRK* 基因点突变也在肿瘤中被发现^[18]。然而,这些突变是否与 TRK 抑制治疗相关,目前尚不明确。

二、GIST 中的 *NTRK* 基因融合突变

NTRK 融合突变常出现于婴儿纤维肉瘤(infantile fibrosarcoma, IFS)、分泌性乳腺癌(secretory breast cancer)以及乳腺类似分泌性肿瘤(mammary analogue secretory carcinoma of salivary gland, MASC)中,首次于婴儿纤维肉瘤中发现的 *ETV6-NTRK3* 基因融合是目前研究最为广泛的 *NTRK* 基因融合^[19]。*NTRK* 基因融合在成人较为常见的乳腺癌、肺癌及黑色素瘤等肿瘤中出现的频率较低^[16]。缺乏经典 *KIT*、*PDGFRA* 或 *RAS* 突变的 GIST 拥有 5%~25% 的 *NTRK* 基因融合突变频率^[20]。Shi 等^[8]在野生型 GIST 中报道,了一例 55 岁男性 *ETV6-NTRK3* 融合突变的小肠 GIST 患者,经历了 5 种酪氨酸激酶抑制剂治疗后,疾病仍然进展,其后被

纳入 LOXO-101 的第一阶段临床试验,经过治疗,疼痛症状迅速改善;在治疗的第 8 周末,PET-CT 显示,肿瘤体积减小及 18F-氟代脱氧葡萄糖(β -2-[18F]-Fluoro-2-deoxy-D-glucose,PDG)摄取降低,4 个月时,患者呈现持续的部分缓解(44%)。Brenca 等^[21]对 5 例四重野生型 GIST 进行 RNA 测序,发现其中 1 例含有 *ETV6-NTRK3*(*ETV6* 外显子 4 与 *NTRK3* 外显子 14) 融合突变的直肠 GIST 患者,术后病理示:肿瘤 5 cm 大小,边界清楚,假包膜完整,核分裂象数高(34/5 mm²),可见肿瘤坏死,DOG1 和 CD117 呈强弥漫性表达,分子分析未检测到 *KIT*、*PDGFRA* 及 *BRAF* 突变,也未见琥珀酸脱氢酶异常。因突变阴性的野生型患者对伊马替尼反应性差,所以该患者术后未给予辅助靶向治疗;随访 44 个月,患者病情处于无进展状态,现定期复查肠镜及腹、盆部 MRI。但在对另外 26 例野生型直肠 GIST 进行原位免疫荧光杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)分析,并未发现 *ETV6-NTRK3* 融合突变。这表明 *ETV6-NTRK3* 易位很可能是一个不常见的事件,它可能鉴别出一组罕见的具有特殊临床病理特征的 GIST。转录组测序确认 *ETV6-NTRK3* 是一个参与 GIST 致病过程的基因融合,*ETV6-NTRK3* 基因融合可能通过促进 IGF1R 下游级联反应和替代 IRS1 核通路的激活,在部分 GIST 的发生中发挥作用。Atiq 等^[22]对 8 例含 *NTRK* 基因融合的胃肠间叶源性肿瘤进行临床病理学、形态学、免疫组化等分析后,指出这些肿瘤在临床、形态学及免疫组化特征方面拥有着较大的异质性,与 GIST 在临床及形态学上有着本质性差异。除了婴儿纤维肉瘤,*NTRK* 融合可能会驱动胃肠道的低级别和高级别梭形细胞间叶源性肿瘤,并具有非特异性免疫表型,且没有明确的分化。在评估这种分化不明确的肿瘤时,特别是儿科患者,应考虑是否具有 *NTRK* 融合突变。

三、*NTRK* 基因融合突变的检测

NTRK 基因检测方法目前主要有免疫组化(immunohistochemistry, IHC)、FISH、反转录-聚合酶链式反应(reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)及基于 DNA/RNA 的二代测序。

1.IHC:IHC 通过对已表达的蛋白质进行检测分析。它具有低廉、快速、易获得性及组织有效性的优点,但是只能提供转录及翻译水平的信息,而非 DNA 水平的重排。Pan-Trk 在 *NTRK* 融合基因检测时拥有 95% 敏感性和 100% 特异性,一般用于初步的 *NTRK* 基因融合筛查,IHC 染色强度易变、且染色

模式随着融合伙伴不同而异,与融合伙伴的亚细胞位置有关^[23]。最近两项以 *NTRK* 基因融合为特征的大规模研究表明,Pan-Trk 抗体对 *NTRK1* 及 *NTRK2* 有较高的敏感性,而对 *NTRK3* 敏感性有所降低^[24-25]。不同的 *NTRK* 基因融合染色模式也各异,*NTRK1* 或者 *NTRK2* 融合肿瘤呈现出胞质染色,而 *NTRK3* 呈现胞核+/-胞质染色^[26-27]。Solomon 等^[25]的研究指出,*NTRK* 基因融合检出的敏感性随着肿瘤的类型不同而异,肉瘤检出的敏感性达 80%,而在炎性肌纤维母细胞瘤、阑尾腺癌、胆管癌、胶质瘤以及黑色素瘤中可以达到 100%。事实上,在人体的一些正常组织(如神经和平滑肌组织)中,有 *NTRK* 蛋白的生理性表达,在这些组织中,野生型 *NTRK* 蛋白的生理性表达限制了 IHC 检测的有效性^[23,28]。

2.FISH:FISH 是通过荧光标记的 DNA 探针在甲醛固定的石蜡包埋肿瘤样本上与互补序列结合,从而实现在 DNA 水平对基因融合的检测。双色(红色和绿色)FISH 探针常被使用,其主要的优点是能够在不明确融合伙伴的情况下,通过分离探针实现对目标基因是否存在融合突变的检测。由于探针的序列特异性,针对 *NTRK* 基因家族的成员需分别检测,因此较为费时费力^[29]。在一项研究中,有一个涉及到 *ALK* 基因的短的倒位及染色体内的转位,这样一个短的分裂长度使得肉眼上很难辨认出染色体异常的细胞与正常细胞的区别,从而容易造成假阴性的结果^[30]。这些发现特别可能与 *NTRK1* 相关,因为 *NTRK1* 大多是涉及 1 号染色体的内部改变,例如 *LMNA-NTRK1*^[31]。此外,虽然分离探针的阳性结果显示存在被探测基因的结构变异,但这种异常是否会导致功能性转录融合尚不能确定^[28]。

3.RT-PCR:RT-PCR 用于检测已转录的 RNA,在融合伙伴已知的情况下,它可以实现对癌源性融合定性或者定量的分析。但是鉴于 *NTRK* 融合伙伴及融合断点的数量,RT-PCR 的使用受到了限制。过去,RT-PCR 主要用于典型的 *ETV6-NTRK3* 融合的检测。RT-PCR 提供了一种高特异性、快速、经济和敏感的检测方法,即使在低转录水平,具有快速周转时间和多通路功能^[32]。RT-PCR 为 FISH 提供了一种替代或互补的方法,利用 5' 融合伙伴和 *NTRK* 激酶结构域编码序列的引物检测 *NTRK* 基因融合。另一种方法,是通过多重 RT-PCR 反应评估每个 *NTRK* 基因的 5' 和 3' 扩增子的比例,比例的不平衡间接提示目标基因可能发生融合突变^[33]。

4. 基于 DNA/RNA 的二代测序: 基于 DNA 的二代测序除了可以检测基因融合突变外, 还可以同时对点突变、基因扩增、微卫星不稳定和肿瘤突变负荷进行评估^[34-35]。该方法对 *NTRK* 基因融合患者发生耐药突变的监测也是有效的。其包括两种方法: (1) 基于扩增的方法: 使用聚合酶链式反应引物扩增目标基因的特定区域, 这种方法适用于在小的基因面板中检测点突变、插入及缺失突变; 针对经常存在内含子融合断点的基因融合, 这一方法受到限制。(2) 基于靶向杂交捕获的二代测序检测: 使用捕获探针与基因组中特定序列进行杂交, 不仅可以对肿瘤相关基因的外显子进行深度测序, 也可以检测已知融合基因的内含子。但需要注意的是, 一些内含子, 比如 *NTRK3* 中的内含子非常长 (193 kb), 不可能覆盖。如果被覆盖, 这些内含子将占面板的很大比例, 从而导致其他外显子区域的覆盖减少和总体检测灵敏度降低。相比较基于 DNA 的二代测序而言, 基于 RNA 的测序拥有优势: 首先内含子在 RNA 中已经被剪切掉, 这就消除了内含子覆盖的技术限制; 另外, 在 RNA 水平上的检测提供了基因融合突变被功能转录的直接证据, 并通过对拼接序列的分析可以确定该蛋白是否会被翻译。但 RNA 存在不稳定性, 容易碎裂和降解, 特别是在不新鲜的组织中^[28]。

欧洲肿瘤学会 (European Society for Medical Oncology, ESMO) 推荐, 针对 *NTRK* 基因融合出现频率较高、且具有疾病诊断价值的肿瘤, 可以采取 FISH 或者 RT-PCR, 相反地, *NTRK* 基因融合出现频率较低的肿瘤, 可以采用二代测序或者两步法 (首先进行 IHC 筛查, 再对阳性病例进行二代测序测序) 进行检测。

四、TRK 抑制剂的临床试验

1. 拉罗替尼 (larotrectinib): 2010 年, Array 公司推出了第一批 TRK 选择性抑制剂, 包括后来更名为 LOXO-101 和 larotrectinib 的 example 93^[36]。该药物于 2018 年被美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准用于 *NTRK* 基因融合肿瘤的治疗, 是第一个不限癌种、不分年龄而只基于肿瘤分子特征的广谱抗癌靶向药物。为了评估拉罗替尼的有效性及安全性, 前期分别进行了 3 项前瞻性临床试验: 成人一期临床研究 (NCT02122913)、儿童一/二期临床研究 (SCOUT, NCT02637687) 以及成人和青少年二期临床研究

(NAVIGATE, NCT02576431)^[37]。这 3 项研究共纳入 55 例 *NTRK* 融合基因阳性的患者 (*NTRK1* 有 25 例, *NTRK2* 有 1 例, *NTRK3* 有 29 例), 其中涉及的肿瘤类型有肺癌、黑色素瘤、婴儿纤维肉瘤和涎腺肿瘤等, 特别是含有 4 例结肠癌, 3 例 GIST; 研究结果显示, 在接受拉罗替尼治疗后, 不论肿瘤类型、患者年龄及 *NTRK* 基因融合特征如何, 均观察到反应, 总缓解率为 75%, 基于研究者评估的总缓解率为 80%; 治疗 1 年后, 71% 的患者病情呈持续缓解, 55% 的患者病情未出现进展, 期间无患者因为药物相关的不良反应而停止使用拉罗替尼。这表明, 无论患者的年龄或肿瘤类型如何, 拉罗替尼对 *TRK* 融合基因阳性癌症患者具有显著和持久的抗肿瘤活性。将耐药定义为在治疗期间有客观反应、或至少 6 个月的疾病稳定后疾病进展^[37]。在该定义下发现了 10 例耐药患者, 其中 9 例在肿瘤或血浆样本中, 检测到了编码激酶域的 *NTRK* 基因融合序列的耐药突变。发现的突变有 *NTRK1 G595R*、*NTRK3 G623R*、*NTRK1 F589L*、*NTRK1 G667S* 或 *NTRK3 G696A*^[37]。另一项研究分析了 5 例局部晚期的 *NTRK* 基因融合肉瘤, 均为儿童病例, 且其中 4 例对标准治疗不敏感; 在接受了中位 6 (4~9) 周期的拉罗替尼新辅助治疗后, 所有 5 例患者均获得了部分缓解, 并进行了手术切除, 其中 3 例为 R₀ 切除, 1 例 R₁ 切除 (肿瘤切缘有微残留灶), 1 例 R₂ 切除 (肿瘤切缘有宏残留灶); 3 例患者达到完全 (2 例) 或接近完全 (> 治疗效果 98%, 1 例) 病理反应; 这些患者继续接受随访, 切缘阳性的 2 例患者继续接受拉罗替尼治疗, 结果显示, 局部晚期 *NTRK* 融合基因肉瘤的儿童在接受选择性拉罗替尼治疗后, 可能获得手术切除, 从而避免了目前治疗方法中潜在的显著复发率; 这些结果支持了拉罗替尼作为 *NTRK* 融合基因肉瘤儿童术前治疗的评价^[38-39]。一项荟萃分析对 159 例 *NTRK* 融合基因阳性肿瘤 (其中包括 8 例结直肠癌、4 例 GIST) 的拉罗替尼治疗有效性及扩大为 260 例的安全性研究结果指出: *NTRK* 融合基因阳性定义了一种独特的晚期实体肿瘤分子亚群, 拉罗替尼对其具有高度活性, 安全性数据表明, 长期使用拉罗替尼是可行的^[40]。

2. 恩曲替尼 (entrectinib): 恩曲替尼是一种针对 pan-TRK、ALK 及 ROS1 的强效抑制剂。Sartore-Bianchi 等^[41]在一例标准治疗无效的结肠癌肿瘤灶及肝转移灶中发现了 TrkA 的异常表达, 分子分析揭

示了其存在 *LMNA-NTRK1* 基因融合突变,患者接受恩曲替尼治疗 30 d 后,肝转移病灶从最长直径 6.8 cm 和 8.2 cm 分别减少到 4.7 cm 和 4.3 cm,实现了部分缓解。一项针对恩曲替尼的大型多中心安全性试验共纳入了 119 例患者(其中胃肠道肿瘤共 18 例,占 15%),结果显示,不论肿瘤类型如何,恩曲替尼在初次接受酪氨酸激酶抑制剂治疗且拥有 *NTRK*、*ROS1* 或 *ALK* 基因重排的患者中展现了强大的快速而持久的抗肿瘤活性^[42]。Russo 等^[43]发现,*NTRK1* *p.G595R* 或 *p.G667C* 突变是耐恩曲替尼的机制。这两处突变都位于 TrkA 的 ATP 结合域。其中 *p.G667C* 突变是由低浓度恩曲替尼诱导产生,并降低恩曲替尼与 TrkA 的亲和力,而 *p.G595R* 突变使恩曲替尼完全失去与 TrkA 结合的能力。结构分析指出,*p.G667C* 突变对恩曲替尼产生的抗性比 *p.G595R* 弱。当前的 TRK 抑制剂还无法克服 *p.G595R* 突变所产生的耐药问题。

综上,随着对 *NTRK* 基因融合突变的深入研究,已在越来越多的肿瘤类型中发现了该种基因异常,目前,我们对 *NTRK* 基因融合阳性肿瘤的认识还十分有限,需要进一步研究来揭示其生物学、临床病理学及分子生物学特征。同时,进一步优化 *NTRK* 基因融合突变的检测方法和流程。已有结果显示,*NTRK* 基因融合突变会导致一类特殊类型野生型 GIST 的发生,其临床表现及治疗与其他类型 GIST 完全不同,需提高对此类患者的认识和检出,使用 TRK 抑制剂进行个体化精准治疗,改善其预后。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Nilsson B, Bümbling P, Meis - Kindblom JM, et al. Gastrointestinal stromal tumors: the incidence, prevalence, clinical course, and prognostication in the preimatinib mesylate era -- a population-based study in western Sweden [J]. Cancer, 2005, 103(4):821-829. DOI:10.1002/cncr.20862.
- [2] Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, et al. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor[J]. J Clin Oncol, 2003, 21(23):4342-4349. DOI: 10.1200/jco.2003.04.190.
- [3] Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, et al. Gain - of - function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors [J]. Science, 1998, 279(5350):577-580. DOI:10.1126/science.279.5350.577.
- [4] Nannini M, Biasco G, Astolfi A, et al. An overview on molecular biology of KIT/PDGFRα wild type (WT) gastrointestinal stromal tumours (GIST) [J]. J Med Genet, 2013, 50(10):653-661. DOI: 10.1136/jmedgenet-2013-101695.
- [5] Yantiss RK, Rosenberg AE, Sarraf L, et al. Multiple gastrointestinal stromal tumors in type I neurofibromatosis: a pathologic and molecular study [J]. Mod Pathol, 2005, 18(4): 475-484. DOI:10.1038/modpathol.3800334.
- [6] Miranda C, Nucifora M, Molinari F, et al. KRAS and BRAF mutations predict primary resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumors [J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(6): 1769-1776. DOI:10.1158/1078-0432.Ccr-11-2230.
- [7] Janeway KA, Kim SY, Lodish M, et al. Defects in succinate dehydrogenase in gastrointestinal stromal tumors lacking KIT and PDGFRA mutations [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(1):314-318. DOI:10.1073/pnas.1009199108.
- [8] Shi E, Chmielecki J, Tang CM, et al. FGFR1 and NTRK3 actionable alterations in "Wild-Type" gastrointestinal stromal tumors [J]. J Transl Med, 2016, 14(1): 339. DOI: 10.1186/s12967-016-1075-6.
- [9] Rubin JB, Segal RA. Growth, survival and migration: the Trk to cancer [J]. Cancer Treat Res, 2003. DOI:10.1007/0-306-48158-8_1.
- [10] Nakagawara A. Trk receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development [J]. Cancer Lett, 2001, 169(2): 107-114. DOI:10.1016/s0304-3835(01)00530-4.
- [11] Mardy S, Miura Y, Endo F, et al. Congenital insensitivity to pain with anhidrosis: novel mutations in the TRKA (NTRK1) gene encoding a high-affinity receptor for nerve growth factor [J]. Am J Hum Genet, 1999, 64(6): 1570-1579. DOI:10.1086/302422.
- [12] Nakagawara A, Liu XG, Ikegaki N, et al. Cloning and chromosomal localization of the human TRK-B tyrosine kinase receptor gene (NTRK2) [J]. Genomics, 1995, 25(2): 538-546. DOI:10.1016/0888-7543(95)80055-q.
- [13] Valent A, Danglot G, Bernheim A. Mapping of the tyrosine kinase receptors TrkA (NTRK1), TrkB (NTRK2) and trkC (NTRK3) to human chromosomes 1q22, 9q22 and 15q25 by fluorescence in situ hybridization [J]. Eur J Hum Genet, 1997, 5(2):102-104. DOI:10.1159/000484742.
- [14] Klein R, Jing SQ, Nanduri V, et al. The Trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor [J]. Cell, 1991, 65(1): 189-197. DOI:10.1016/0092-8674(91)90419-y.
- [15] Huang EJ, Reichardt LF. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction [J]. Annu Rev Biochem, 2003, 72: 609-642. DOI: 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161629.
- [16] Cocco E, Scaltriti M, Drilon A. NTRK fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2018, 15(12): 731-747. DOI:10.1038/s41571-018-0113-0.
- [17] Vaishnavi A, Le AT, Doebele RC. TRKking down an old oncogene in a new era of targeted therapy [J]. Cancer Discov, 2015, 5(1):25-34. DOI:10.1158/2159-8290.CD-14-0765.
- [18] Marchetti A, Felicioni L, Pelosi G, et al. Frequent mutations in the neurotrophic tyrosine receptor kinase gene family in large cell neuroendocrine carcinoma of the lung [J]. Hum Mutat, 2008, 29(5):609-616. DOI:10.1002/humu.20707.

- [19] Knezevich SR, McFadden DE, Tao W, et al. A novel ETV6-NTRK3 gene fusion in congenital fibrosarcoma [J]. *Nat Genet*, 1998, 18(2): 184-187. DOI: 10.1038/ng0298-184.
- [20] Amatu A, Sartore-Bianchi A, Siena S. NTRK gene fusions as novel targets of cancer therapy across multiple tumour types [J]. *ESMO Open*, 2016, 1(2): e000023. DOI: 10.1136/esmoopen-2015-000023.
- [21] Brenca M, Rossi S, Polano M, et al. Transcriptome sequencing identifies ETV6-NTRK3 as a gene fusion involved in GIST [J]. *J Pathol*, 2016, 238(4): 543-549. DOI: 10.1002/path.4677.
- [22] Atiq MA, Davis JL, Hornick JL, et al. Mesenchymal tumors of the gastrointestinal tract with NTRK rearrangements: a clinicopathological, immunophenotypic, and molecular study of eight cases, emphasizing their distinction from gastrointestinal stromal tumor (GIST) [J]. *Mod Pathol*, 2021, 34(1): 95-103. DOI: 10.1038/s41379-020-0623-z.
- [23] Hechtman JF, Benayed R, Hyman DM, et al. Pan - Trk immunohistochemistry is an efficient and reliable screen for the detection of NTRK fusions [J]. *Am J Surg Pathol*, 2017, 41(11): 1547-1551. DOI: 10.1097/PAS.0000000000000911.
- [24] Gatalica Z, Xiu J, Swensen J, et al. Molecular characterization of cancers with NTRK gene fusions [J]. *Mod Pathol*, 2019, 32(1): 147-153. DOI: 10.1038/s41379-018-0118-3.
- [25] 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.
- [26] Rudzinski ER, Lockwood CM, Stohr BA, et al. Pan - Trk immunohistochemistry identifies NTRK rearrangements in pediatric mesenchymal tumors [J]. *Am J Surg Pathol*, 2018, 42(7): 927-935. DOI: 10.1097/PAS.0000000000001062.
- [27] Xu B, Haroon Al Rasheed MR, Antonescu CR, et al. Pan-Trk immunohistochemistry is a sensitive and specific ancillary tool for diagnosing secretory carcinoma of the salivary gland and detecting ETV6-NTRK3 fusion [J]. *Histopathology*, 2020, 76(3): 375-382. DOI: 10.1111/his.13981.
- [28] Solomon JP, Benayed R, Hechtman JF, et al. Identifying patients with NTRK fusion cancer [J]. *Ann Oncol*, 2019, 30 Suppl 8: viii16-viii22. DOI: 10.1093/annonc/mdz384.
- [29] Wong D, Yip S, Sorensen PH. Methods for identifying patients with tropomyosin receptor kinase (TRK) fusion cancer [J]. *Pathol Oncol Res*, 2020, 26(3): 1385-1399. DOI: 10.1007/s12253-019-00685-2.
- [30] Martin V, Bernasconi B, Merlo E, et al. ALK testing in lung adenocarcinoma: technical aspects to improve FISH evaluation in daily practice [J]. *J Thorac Oncol*, 2015, 10(4): 595-602. DOI: 10.1097/JTO.0000000000000444.
- [31] Hsiao SJ, Zehir A, Sirci AN, et al. Detection of tumor NTRK gene fusions to identify patients who may benefit from tyrosine kinase (TRK) inhibitor therapy [J]. *J Mol Diagn*, 2019, 21(4): 553-571. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2019.03.008.
- [32] Wu YC, Chang IC, Wang CL, et al. Comparison of IHC, FISH and RT-PCR methods for detection of ALK rearrangements in 312 non-small cell lung cancer patients in Taiwan [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e70839. DOI: 10.1371/journal.pone.0070839.
- [33] Penault-Llorca F, Rudzinski ER, Sepulveda AR. Testing algorithm for identification of patients with TRK fusion cancer [J]. *J Clin Pathol*, 2019, 72(7): 460-467. DOI: 10.1136/jclinpath-2018-205679.
- [34] Zehir A, Benayed R, Shah RH, et al. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients [J]. *Nat Med*, 2017, 23(6): 703-713. DOI: 10.1038/nm.4333.
- [35] Middha S, Zhang L, Nafa K, et al. Reliable pan - cancer microsatellite instability assessment by using targeted next-generation sequencing data [J]. *JCO Precis Oncol*, 2017, 2017. DOI: 10.1200/po.17.00084.
- [36] Laetsch TW, Hawkins DS. Larotrectinib for the treatment of TRK fusion solid tumors [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2019, 19(1): 1-10. DOI: 10.1080/14737140.2019.1538796.
- [37] Drilon A, Laetsch TW, Kummar S, et al. Efficacy of larotrectinib in TRK fusion-positive cancers in adults and children [J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(8): 731-739. DOI: 10.1056/NEJMoa1714448.
- [38] DuBois SG, Laetsch TW, Federman N, et al. The use of neoadjuvant larotrectinib in the management of children with locally advanced TRK fusion sarcomas [J]. *Cancer*, 2018, 124(21): 4241-4247. DOI: 10.1002/cncr.31701.
- [39] Laetsch TW, DuBois SG, Mascarenhas L, et al. Larotrectinib for paediatric solid tumours harbouring NTRK gene fusions: phase 1 results from a multicentre, open-label, phase 1/2 study [J]. *Lancet Oncol*, 2018, 19(5): 705-714. DOI: 10.1016/S1470-2045(18)30119-0.
- [40] Hong DS, DuBois SG, Kummar S, et al. Larotrectinib in patients with TRK fusion-positive solid tumours: a pooled analysis of three phase 1/2 clinical trials [J]. *Lancet Oncol*, 2020, 21(4): 531-540. DOI: 10.1016/S1470-2045(19)30856-3.
- [41] Sartore-Bianchi A, Ardini E, Bosotti R, et al. Sensitivity to entrectinib associated with a novel LMNA-NTRK1 gene fusion in metastatic colorectal cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2016, 108(1). DOI: 10.1093/jnci/djv306.
- [42] Drilon A, Siena S, Ou SI, et al. Safety and antitumor activity of the multitargeted pan - TRK, ROS1, and ALK inhibitor entrectinib: combined results from two phase I trials (ALKA-372-001 and STARTRK-1) [J]. *Cancer Discov*, 2017, 7(4): 400-409. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-16-1237.
- [43] Russo M, Misale S, Wei G, et al. Acquired resistance to the TRK inhibitor entrectinib in colorectal cancer [J]. *Cancer Discov*, 2016, 6(1): 36-44. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-15-0940.