

• 论 著 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2023.03.011

MALDI-TOF-MS 高灵敏度分析 EGFR 基因多位点突变方法的建立与应用*

黄海燕¹, 孙 杰¹, 徐炜新¹, 王姜琳¹, 孙亚蒙², 汪国庆¹, 叶绍云³, 蒋峻峰³, 聂芳芳⁴, 徐 军², 王 纯^{4△}

1. 上海健康医学院附属嘉定区中心医院检验科, 上海 201800; 2. 上海柏辰生物科技有限公司, 上海 200233; 3. 新起点生物科技(苏州)有限公司, 江苏苏州 215123; 4. 上海健康医学院附属嘉定区中心医院肿瘤内科, 上海 201800

摘要:目的 以基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)为分析平台, 建立表皮生长因子受体(EGFR)基因多位点突变的高灵敏度同步检测方法, 用于辅助临床伴随诊断。方法 使用 MALDI-TOF-MS 推荐的网站设计引物和单碱基延伸引物(UEP), 设计添加针对野生型基因组的 blocker, 以减少野生型模板对突变位点检测的干扰。用数字 PCR 定量标准品, 使用定量后的标准品验证检测体系的灵敏度。收集 228 例非小细胞肺癌(NSCLC)患者的血液标本, 比较 MALDI-TOF-MS 平台与微滴式数字 PCR(ddPCR)平台检测结果的特异度、灵敏度。结果 MALDI-TOF-MS 检测 E746_A750del 位点、T790M 位点突变灵敏度达 0.1%, 最小突变检出拷贝数达 2.8; L858R 位点突变灵敏度达 0.5%, 最小突变检出拷贝数达 12。与 ddPCR 检测相比, MALDI-TOF-MS 检测 E746_A750del、L858R 和 T790M 位点的灵敏度、特异度、Kappa 值分别为 94.4%(34/36)、99.5%(191/192)、0.95; 94.6%(35/37)、100.0%(191/191)、0.97; 83.3%(15/18)、99.5%(209/210)、0.87。结论 MALDI-TOF-MS 建立的检测方法具有很高的灵敏度, 与 ddPCR 检测具有非常高的一致性, 有广阔的临床应用前景。

关键词: MALDI-TOF-MS; ddPCR; EGFR 基因; 液态活检

中图分类号: R446.1

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2023)03-0334-05

Establishment and application of MALDI-TOF-MS high sensitivity analysis method for multipoint mutation of EGFR gene*

HUANG Haiyan¹, SUN Jie¹, XU Weixin¹, WANG Jianglin¹, SUN Yameng², WANG Guoqing¹, YE Shaoyun³, JIANG Junfeng³, NIE Fangfang⁴, XU Jun², WANG Chun^{4△}

1. Department of Medical Laboratory, Jiading District Central Hospital Affiliated Shanghai University of Medicine & Health Sciences, Shanghai 201800, China; 2. Shanghai Bio-Chain Biotechnology Co., Ltd., Shanghai 200233, China; 3. New-Departure (Suzhou) Biotechnology Co., Ltd., Suzhou, Jiangsu 215123, China; 4. Department of Oncology, Jiading District Central Hospital Affiliated Shanghai University of Medicine & Health Sciences, Shanghai 201800, China

Abstract: **Objective** Taking MALDI-TOF-MS as an analysis platform, to establish a high-sensitivity synchronous detection method of EGFR, in order to assist clinical companion diagnostics. **Methods** Primers and single nucleotide primer extension were designed using the website officially recommended by MALDI-TOF-MS, and blockers for wild-type genome were designed and added to reduce the interference of wild-type template on mutation site detection. The quantitative standard of droplet digital PCR (ddPCR) was used to verify the sensitivity of the detection system. The blood samples of 228 patients with NSCLC were collected and the specificity and sensitivity of MALDI-TOF-MS platform and ddPCR platform were compared. **Results** The MALDI-TOF-MS platform detection system developed in this study had a mutation sensitivity of 0.1% at E746_A750del and T790M sites, and the minimum number of copies of mutations was 2.8. The mutation sensitivity of L858R locus was 0.5%, and the minimum mutation detection copy number was 12. Compared with ddPCR, the sensitivity, specificity and Kappa values of E746_A750del, L858R and T790M were 94.4% (34/36), 99.5% (191/192), 0.95; 94.6% (35/37), 100.0% (191/191), 0.97; 83.3% (15/18), 99.5% (209/210), 0.87 respectively. **Conclusion** The high-sensitivity detection method established on MALDI-TOF-MS platform

* 基金项目: 上海市嘉定区农业和社会事业科研项目基金(JDKW-2019-W24)。

作者简介: 黄海燕, 女, 技师, 主要从事多位点基因相关研究。△ 通信作者, E-mail: wesely1982@126.com。

has high consistency with ddPCR, and has broad clinical application prospects.

Key words: MALDI-TOF-MS; ddPCR; EGFR gene; liquid biopsy

2018 年全球新增肺癌病例达 210 万,占癌症总发病率的 11.6%;新增肺癌死亡病例 180 万,占癌症病死率的 18.4%,其中 80%~85% 为非小细胞肺癌(NSCLC)^[1]。表皮生长因子受体(EGFR)基因突变是 NSCLC 中最常见的突变基因,亚洲人群 NSCLC 中的突变频率高达 40%~50%^[2]。早期发现 NSCLC 患者(I A 期)的 5 年生存率为 73.0%,转移晚期的生存率仅为 3.7%^[3],由于发病的隐蔽性,75% 的 NSCLC 患者就诊时已处于晚期或已发生转移,丧失了早期手术治疗时机,整体 NSCLC 患者的 5 年生存率为 15%~20%^[3]。随着分子生物学理论、检测技术的发展和临床数据的不断积累,多个基因突变位点成为 NSCLC 患者个体化靶向治疗和预后评价的标志物,对促使 NSCLC 患者及时、个体化治疗,提高患者生存质量和生存率具有重要意义^[4]。

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)是 20 世纪发展起来的重要分析技术,其原理是激光照射分析物与基质形成的结晶后,生物大分子离子化,带电生物大分子在电场作用下,在真空飞行管的飞行时间与分子量呈正比,以此来区分单个碱基的不同。鉴于其在已知突变基因分型方面的高特异性、高通量等特点,美国食品药品监督管理局批准 MALDI-TOF-MS 用于临床核酸检测^[5]。近期有研究显示,5 个肺癌相关基因的 76 种突变型检测中,可检测到的最高突变灵敏度达 1%(5~10 ng),使用国际通用标准品,能检测到 0.5% 以上的突变标本(5 ng)^[5]。低频突变的多重检测成为临床诊断的必要工具,能够有效支持针对血液循环肿瘤 DNA(cfDNA)的伴随诊断和对肿瘤的早期干预。本研究利用 MALDI-TOF-MS 建立 EGFR 基因 E746_A750del、L858R、T790M 位点突变的超高灵敏度检测方法,并使用微滴式数字 PCR(ddPCR)做验证,比较 2 种检测方法的一致性,探索 MALDI-TOF-MS 在临床应用中的价值。

1 材料与方法

1.1 材料 收集 2019 年 1 月至 2021 年 12 月来源于上海健康医学院附属嘉定区中心医院检验科的 228 例 NSCLC 患者血液标本。病理诊断均为 NSCLC,且研究过程中不对临床实践进行干预。标本收集已获得患者知情同意。

1.2 试剂 IPLEX Pro 基因分型试剂购自美国 Agena Bioscience 公司(货号 10160);ddPCR Supermix for Probes (No dUTP) 购自美国 Bio-rad 公司(货号 1863025);Droplet Generation Oil for Probes 购自美国 Bio-rad 公司(货号 1863005);DG8™ Cartridges and Gaskets 购自美国 Bio-rad 公司(货号

1864007);ddPCR 平台 EGFR 基因 T790M、L858R、E746_A750del 突变位点分析试剂购自美国 Bio-rad 公司(货号 10031246、10031249);人血液标本 EGFR 基因检测试剂盒(上海源奇生物医药科技有限公司);HiPure Circulating DNA Midi Kit 柱法游离 DNA 提取试剂盒购自上海迈跟生物科技有限公司(IVD3182-50C);参考品 EGFR Multiplex cfDNA Reference Standard Set 购自英国 Horizon 公司(HD825);引物和单碱基延伸引物及 blocker 探针由上海朗晶生物科技有限公司合成。

1.3 方法

1.3.1 标本收集及核酸提取 诊断为 NSCLC 的患者,在应用靶向治疗药物治疗前抽取 10 mL 静脉血标本,采集后 2 h 内进行离心分离血浆,1 600×g,4℃ 离心 10 min,分离上层血浆后,16 000×g,4℃ 离心 10 min,分离上层血浆 5 mL 并置于新的 15 mL 离心管中。血浆游离 DNA(cfDNA)的提取使用 HiPure Circulating DNA Midi Kit 柱法游离 DNA 提取试剂盒抽提。

1.3.2 ddPCR 检测 ddPCR 的试剂配置:ddPCR Supermix for Probes (No dUTP) 10 μL,EGFR 基因 T790M(L858R/E746_A750del 位点)位点的野生型和突变型检测试剂各 1 μL,标准品定量实验使用的模板总量 7 ng,用无核酸酶水补充总反应体系为 20 μL。将上述反应液加入 DG8 cartridge 微滴制备卡的第 2 排孔,最下排孔加入 70 μL Droplet Generation Oil for Probes 并盖上胶垫,放入微滴制备仪中生成微滴,转移至 96 孔板中进行 PCR 反应。PCR 反应条件:95℃,10 min;94℃,30 s,60℃,1 min,40 个循环;98℃,10 min;4℃,保存。反应结束后,将 96 孔板放入 QX200 Droplet reader™(BIO-RAD)中读取微滴中的荧光信号,软件 Quantasoft Version 1.7.4. 自动分析拷贝数结果。在临床标本的检测中,提取的患者 cfDNA 的上样总量为 8 μL,实验过程与标准品定量的过程一致,将>2 个阳性微滴数量设定为阳性标本判读阈值^[11]。

1.3.3 MALDI-TOF-MS 检测 根据癌症体细胞突变目录号查询 3 个突变位点的序列信息,分别为 E746_A750del(COSM6223)、T790M(COSM6240)、L858R(COSM6224)。根据网站 <https://support.agenabio.com/> 设计检测体系的引物,同时加入单碱基延伸引物和针对野生型模板的 blocker(专利申请号:202111020697.5)。用上述突变型特异性扩增混合物扩增标本,PCR 反应的组分见表 1。PCR 扩增条件:95℃预变性 2 min,(95℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 30 s)45 个循环,继续 72℃延伸 5 min,最后 4℃,

保存。上述 PCR 产物 20 μL , 加虾碱性磷酸酶(SAP, 1.7 U/ μL)1.2 μL 、SAP 缓冲液 0.68 μL 、无核酸酶水 6.12 μL 。合计 28 μL 混合液放入 PCR 仪中, 反应条件: 37 $^{\circ}\text{C}$, 40 min; 85 $^{\circ}\text{C}$, 5 min, 去除体系中的 dNTP。下机后进行单碱基延伸反应, 即在体系 28 μL 中, 加入延伸酶 Thermosequenase(33 U/ μL)0.17 μL 、延伸缓冲液 0.8 μL 、延伸 Termination mix 混合液 0.8 μL 、延伸引物混合液 3.76 μL , 加水补充到 8 μL 。单碱基延伸的反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; [94 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, (52 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 80 $^{\circ}\text{C}$ 5 s) 5 个循环] 40 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$, 3 min; 4 $^{\circ}\text{C}$, 保存。下机产物加水 14 μL , 将 15 mg 的洁净树脂平铺在 96 孔 dimple 板上, 风干 10 min, 标本与树脂混合后, 封口, 在旋转仪上颠倒混匀 20 min, 3 200 $\times$ g 离心 5 min。将上述产物上清用 MassARRAYTM RS 1000 点样仪点样到配套芯片, MassARRAY 分析仪进行芯片扫描, 并用 Typer 4.1 进行分析。根据产物分子质量峰的位置判断标本突变情况。

表 1 MALDI-TOF-MS PCR 反应的组分及浓度

组分	终浓度	上样量
10 $\times$ PCR Buffer 20 mmol/L	1 $\times$	2.0 μL
25 mmol/L MgCl ₂	2.5 mmol/L	2.0 μL
25 mmol/L dNTP Mix	2 mmol/L	1.6 μL
突变型特异性扩增混合物	500 nmol/L	0.6 μL
5 U/ μL PCR 酶	1 U/rxn	4.0 μL
模板		7 ng
无核酸酶水		20.0 μL

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数

据分析。用 ddPCR 检测结果评估 MALDI-TOF-MS 检测的灵敏度和特异度。采用 Kappa 一致性检验分析 2 种方法检测结果的一致性。Kappa 值: <0.40 表示一致性较差, 0.40~<0.75 表示中度一致, ≥ 0.75 表示一致性较高。计数资料以例数或百分比表示, 比较采用 χ^2 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

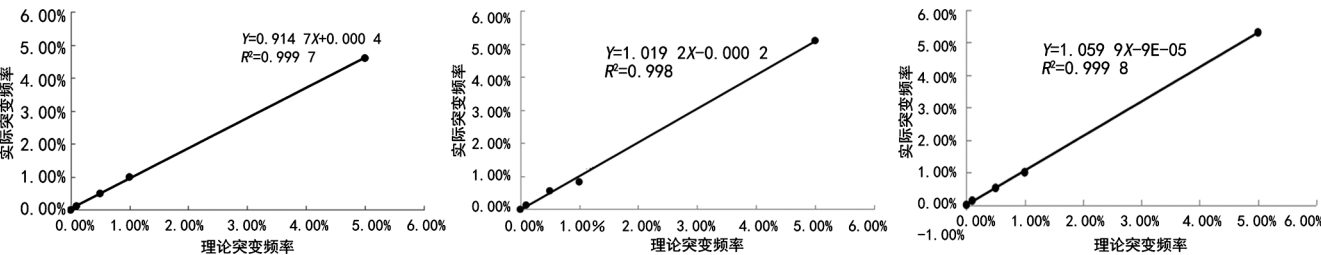
2.1 本组研究对象的年龄和性别特征 本研究共纳入研究对象 228 例, 其中男 138 例(60.5%), 女 90 例(39.5%); 平均年龄(63.2 $\pm$ 10.4)岁, 中位年龄 65 岁, <65 岁 102 例, ≥ 65 岁 126 例。观察 NSCLC 患者性别在不同年龄段的影响, <65 岁患者中男 48 例, 女性 54 例, 女性患者数量高于男性($P<0.05$); ≥ 65 岁患者中男 90 例, 女 36, 男性患者数量高于女性($P<0.05$)。

2.2 ddPCR 定量标准品线性 使用标准品 HD825 系列标准品做定量参考品, 分别制作 EGFR 基因 E746_A750del、L858R 和 T790M 位点 5%、1%、0.5%、0.1% 和 0% (野生型参考品) 突变频率的系列参考品, 每个反应模板总量 7 ng, 用 ddPCR (Bio-rad, QX200) 检测各梯度参考品的突变型和野生型拷贝数, 各梯度参考品检测野生型及突变型统计结果见表 2, 结果与预期一致。

2.3 各位点理论频率与实际检测频率的线性回归曲线图 以理论突变频率为横坐标, 以实际检测突变频率为纵坐标作图, 发现理论值与实际检测值一致率很高($R^2\geq 0.99$)。见图 1。

表 2 各位点不同突变比例的检测结果统计

理论频率	E746_A750del(拷贝/反应)		L858R(拷贝/反应)		T790M(拷贝/反应)	
	突变型	野生型	突变型	野生型	突变型	野生型
5%	116	2 360	110	2 060	150	2 680
1%	20	2 040	20	2 400	22	2 220
0.5%	10.6	2 100	12	2 220	12.6	2 380
0.1%	2.8	2 280	2.8	2 120	2.8	2 165
0	0	2 220	0	2 020	0	2 060



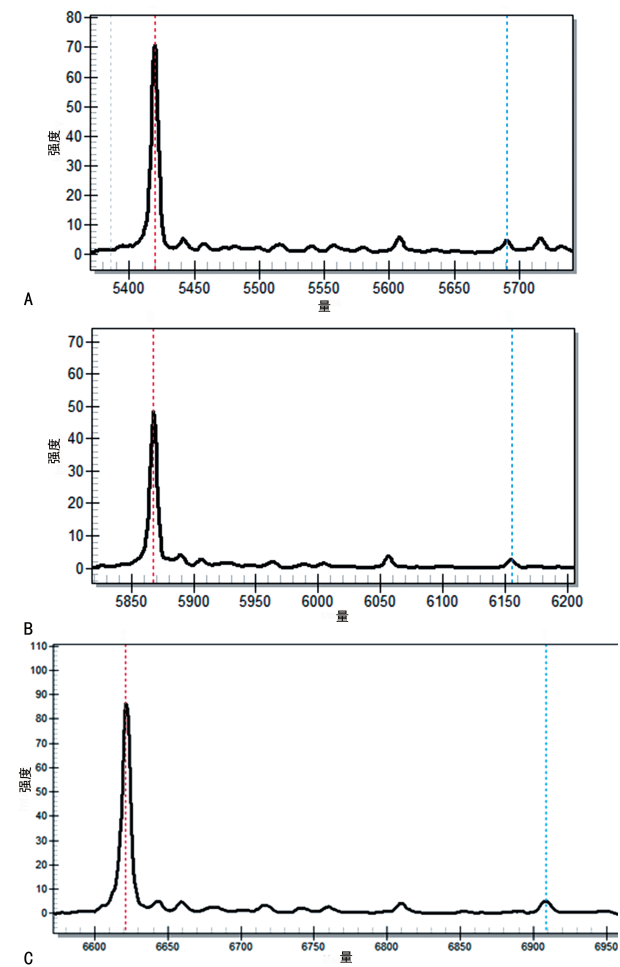
注: A 为 E746_A750del 位点的线性回归曲线; B 为 L858R 位点的线性回归曲线; C 为 T790M 位点的线性回归曲线。

图 1 各位点理论频率与实际检测频率的线性回归曲线图

2.4 MALDI-TOF-MS 检测各位点参考品灵敏度结果 使用 MALDI-TOF-MS 检测不同位点参考品灵敏度, E746_A750del 和 T790M 位点可检测突变灵敏度达 0.1%, 可检出最低突变拷贝数低至 2.8 拷贝/反应, L858R 位点可检测突变灵敏度达 0.5%, 可检出最低突变拷贝/反应数为 12 拷贝/反应。见图 2。

表 3 2 种方法检测 NSCLC 患者血浆标本 EGFR 突变基因位点结果[n(%)]

检测方式	E746_A750del	L858R	T790M	E746_A750del & L858R	E746_A750del & T790M	L858R & T790M
ddPCR	36(39.6)	37(40.7)	18(19.8)	1(1.1)	6(6.6)	6(6.6)
MALDI-TOF-MS	35(40.7)	35(40.7)	16(18.6)	0(0.0)	5(5.8)	4(4.7)



注: A 为 E746_A750del 位点突变 2.8 峰图; B 为 L858R 位点突变 12 峰图; C 为 T790M 位点突变 2.8 峰图。

图 2 MALDI-TOF-MS 检测各位点参考品灵敏度峰图

2.6 2 种方法检测突变情况比较 以 ddPCR 方法为金标准, MALDI-TOF-MS 方法检测突变与金标准的检测突变情况结果见表 4。

2.7 2 种检测 3 个突变位点的一致性比较 以 ddPCR 方法为金标准, MALDI-TOF-MS 方法检测突变的最低灵敏度为 83.3%(T790M 位点), 最低特异性为 99.5%(E747_A750 位点和 T790M 位点), 最低一致性 Kappa 值为 0.87, 与金标准的一致性较高

2.5 2 种方法检测 NSCLC 患者血浆标本 EGFR 突变基因位点结果 分别用 ddPCR 平台和 MALDI-TOF-MS 平台检测 228 例临床标本的不同位点突变情况, 与 ddPCR 检测各位点突变相比, MALDI-TOF-MS 检测 E746_A750del、L858R 和 T790M 突变的一致率分别为 98.7%、99.1%和 98.2%。见表 3。

(Kappa $\geq$ 0.75), 见表 5。

表 4 2 种方法检测突变情况比较(n)

基因	ddPCR 检测	MALDI-TOF-MS 检测		合计
		阳性	阴性	
E746_A750del	阳性	34	2	36
	阴性	1	191	192
	合计	35	193	228
L858R	阳性	35	2	37
	阴性	0	191	191
	合计	35	193	228
T790M	阳性	15	3	18
	阴性	1	209	210
	合计	16	212	228

表 5 2 种检测 3 个突变位点的一致性比较

突变位点	灵敏度 [% (95%CI)]	特异性 [% (95%CI)]	Kappa 值	P
E746_A750del	94.4(8.0~99.0)	99.5(96.7~99.9)	0.95	<0.001
L858R	94.6(80.5~99.1)	1.0(97.5~100.0)	0.97	<0.001
T790M	83.3(57.7~95.6)	99.5(96.9~99.9)	0.87	<0.001

3 讨 论

肺癌早期患者能通过手术获得组织标本进行病理和分子诊断, 晚期患者难以通过穿刺、活检等反复取样来满足辅助诊断和治疗的需要, 根据专家共识推荐, 可使用外周血替代肿瘤组织作为检测标本^[6]。作为我国上市的第一款肿瘤靶向治疗药物, 多项临床试验证实, EGFR-酪氨酸激酶抑制剂(TKIs)能使患者显著获益^[7]。在 NSCLC 中, 最常见的 EGFR 基因突变是第 19 外显子的缺失突变和第 21 外显子的 L858R 突变, 约占 EGFR 基因突变的 80%。有研究表明, 与 L858R 突变患者相比, 19 外显子缺失突变患者对 EGFR-TKI 更为敏感^[7]。在 EGFR-TKI 治疗后疾病进展期患者中, 半数以上的患者出现对第一代、第二代 EGFR-TKI 耐药的 T790M 位点突变, 需进行第三代 EGFR-TKI 药物治疗^[8]。鉴于对 NSCLC 患者治疗和改善预后的重要性, 2022 年新版美国综合癌症网络

指南再次明确了基因检测在伴随诊断和辅助治疗中的意义^[9]。

目前, Super-ARMS QPCR、Roche Cobas EGFR V2 检测系统、高通量测序、高分辨率溶解曲线 PCR、ddPCR 等诸多平台用于分析 EGFR 基因的突变检测, ARMS 方法可以检测 10 ng 野生型背景下 1% 的突变频率, 是目前应用较为广泛的方法, 但由于 ctDNA 在血浆中含量低^[10], 故本研究使用 ddPCR 作为标准品定量和临床标本检测的标准方法。在曹喆等^[6]的研究中发现, ddPCR 检测血浆 EGFR 基因突变, 无论在灵敏度还是在与组织标本一致性上, 都优于 Super-ARMS QPCR 的方法, 最高检测灵敏度可达 0.01%。MALDI-TOF-MS 通过分析经激光解吸的不同短核酸链质量区分不同的基因型, 具有分型结果准确、设计灵活和多个位点单孔检测的特点, 是研究 EGFR 基因突变的理想平台^[5]。

MALDI-TOF-MS 平台开发 EGFR 等多个基因突变检测产品, 其分析突变频率灵敏度为 1% (5~10 ng)^[5]。RIVERO 等^[11]使用 UltraSEEK™ 方法在 MALDI-TOF-MS 平台分析 BRAF V600E 突变, 分析突变灵敏度可达 0.1%, 但在突变频率低于 0.2% 时分析准确的降低。LAMY 等^[12]使用 UltraSEEK™ 和 Cobas® panels 分析 115 例 EGFR 组织突变标本, 发现 UltraSEEK™ 在检测 19 外显子缺失和 L858R 时会漏检更多, 提示需要更高灵敏度的分析方法, 以尽可能避免发生漏检。本研究建立的 MALDI-TOF-MS 检测 EGFR 基因 3 个位点突变方法, E746_A750del 和 T790M 可检测低至 2.8 拷贝的突变核酸分子, L858R 位点可检测低至 12 拷贝的突变核酸分子, 突变频率分别低至 0.1% 和 0.5%, 尽可能地减少了漏检。

本研究中 MALDI-TOF-MS 检测 E746_A750del 和 L858R 的突变患者比例为 81.4% (70/86), 与其他研究基本吻合^[13]。ddPCR 检测一个标本同时含有 E746_A750del 和 L858R 突变, 而 MALDI-TOF-MS 只检测到 L858R 突变, 回溯 ddPCR 数据发现, 该标本 E746_A750del 的突变频率仅为 0.05%。ddPCR 检测 L858R 和 T790M 双突变标本 6 例, MALDI-TOF-MS 检测到其中 4 例, 剩余 2 例因 T790M 频率过低未检测到质谱峰。ddPCR 检测 E746_A750del 和 T790M 双突变标本 6 例, MALDI-TOF-MS 检测到其中 5 例, 同样因为 T790M 突变频率过低而产生漏检。ddPCR 仍然在灵敏度方面存在优势, 但本研究中 MALDI-TOF-MS 的方法能够实现多位点单孔检测, 使仅使用少量标本而完成多位点的高灵敏度分析成为现实, 且不需要像 UltraSEEK™ 过程中用磁珠进行纯化, 简化操作过程, 节省检测成本。

综上所述, 本研究建立了一种 MALDI-TOF-MS 平台 EGFR 基因高灵敏度检测方法, 可仅用 7 ng 标

本, 一次性对 EGFR 基因的 E746_A750del、L858R 和 T790M 位点进行突变检测, 且与 ddPCR 检测具有非常高的一致性, 有助于高效筛选 NSCLC 的靶向治疗方案, 具有广阔的临床应用前景。

参考文献

- [1] World Health Organization. Data visualization tools for exploring the global cancer burden in 2020 [EB/OL]. (2020-01-15) [2022-05-31]. <http://gco.iarc.fr/today/home>.
- [2] JOHN A, YANG B, SHAH R. Clinical impact of adherence to nccn guidelines for biomarker testing and first-line treatment in advanced non-small cell lung cancer (aNSCLC) using real-world electronic health record data [J]. *Adv Ther*, 2021, 38(3):1552-1566.
- [3] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer statistics, 2022 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2022, 72(1):7-33.
- [4] CORTOT A B, MADROSZYK A, GIROUX-LEPRIEUR E, et al. First-line afatinib plus cetuximab for egfr-mutant non-small cell lung cancer: results from the randomized phase ii ifct-1503 ace-lung study [J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27(15):4168-4176.
- [5] 中国核酸质谱应用专家共识协作组. 中国核酸质谱应用专家共识 [J]. *中华医学杂志*, 2018, 98(12):895-900.
- [6] 曹喆, 王静, 秦娜, 等. 微滴数字 PCR 和 Super-ARMS 检测晚期肺癌患者血浆循环肿瘤 DNA 表皮生长因子受体基因突变的临床价值研究 [J]. *中国肺癌杂志*, 2020, 23(2):84-90.
- [7] 潘亚强, 李振华, 李定彪. 表皮生长因子受体突变非小细胞肺癌患者表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂继发性耐药机制及靶向治疗新策略的研究进展 [J]. *实用心脑血管病杂志*, 2019, 27(12):21-27.
- [8] GEN S, TANAKA I, MORISE M, et al. Clinical efficacy of osimertinib in EGFR-mutant non-small cell lung cancer with distant metastasis [J]. *BMC Cancer*, 2022, 22(1):654.
- [9] Ettinger D S, Wood D E, Aisner D L, et al. Non-Small Cell Lung Cancer, Version 3. 2022, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology [J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2022, 20(5):497-530.
- [10] 郭雅琪, 赵志军, 师志云, 等. 微滴数字 PCR 在非小细胞肺癌 EGFR、ALK、ROS1 基因联合检测中的应用价值 [J]. *宁夏医科大学学报*, 2019, 41(11):1101-1107.
- [11] RIVERO J, ZURITA A, CUTILLAS C, et al. The use of MALDI-TOF MS as a diagnostic tool for adult trichuris species [J]. *Front Vet Sci*, 2022, 9:867919.
- [12] LAMY P J, LEEST P, LOZANO N, et al. Mass spectrometry as a highly sensitive method for specific circulating tumor DNA analysis in NSCLC: a comparison study [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(10):3002.
- [13] TASDEMIR S, TAHERI S, AKALIN H, et al. Increased EGFR mRNA expression levels in non-small cell lung cancer [J]. *Eurasian J Med*, 2019, 51(2):177-185.