

Nghiên cứu xây dựng quy trình kỹ thuật xét nghiệm xác định đột biến gen EGFR ở bệnh nhân ung thư phổi tế bào không nhỏ

Bạch Thị Như Quỳnh^{1*}, Vũ Trang Linh¹, Phạm Thị Nguyệt², Nguyễn Trường Giang²

¹ Trường Đại học Y Dược Hải Phòng
² Bệnh viện Hữu Nghị Việt Tiệp

*Tác giả liên hệ

Bạch Thị Như Quỳnh
Trường Đại học Y Dược Hải Phòng
Điện thoại: 0906027488
Email: btnguyenh@hpmu.edu.vn

Thông tin bài đăng

Ngày nhận bài: 28/06/2025
Ngày phản biện: 30/06/2025
Ngày duyệt bài: 13/09/2025

TÓM TẮT

Mục tiêu: Xây dựng quy trình chuẩn kỹ thuật xét nghiệm xác định đột biến gen EGFR từ mẫu đúc Paraffin. **Phương pháp:** Nghiên cứu mô tả cắt ngang, sử dụng kỹ thuật Realtime-PCR trong quy trình xác định đột biến gen. Sáu mẫu mô đúc paraffin FFPE của bệnh nhân được chẩn đoán ung thư phổi bằng mô bệnh học và đã xác định mang đột biến gen EGFR bằng kỹ thuật Sinh học phân tử được sử dụng cho việc xây dựng quy trình. Áp dụng quy trình phát hiện đột biến gen EGFR sau khi xây dựng trên 109 mẫu đúc paraffin FFPE của bệnh nhân được chẩn đoán ung thư phổi bằng mô bệnh học.

Kết quả: Với 4-5 lát cắt cho mỗi mẫu, thu được nồng độ DNA là đảm bảo số lượng và mẫu đầu vào cho phản ứng khuếch đại gen. Khi thực hiện ngâm xylene 2 lần liên tiếp với thời gian ngâm mỗi lần là 5' trong điều kiện lắc và ủ ở 560C, mẫu được loại bỏ hoàn toàn Paraffin đảm bảo độ tinh sạch cho DNA đầu vào của phản ứng khuếch đại gen. Trong 109 mẫu bệnh phẩm đã làm, có 38 mẫu bệnh phẩm dương tính. Trong đó, có 1 mẫu bệnh phẩm dương tính với cả S768I và G719C; L858R chiếm tỷ lệ dương tính cao nhất với 31.58%, tiếp theo là ex19del với 28.95%; G719x và EGFR S768I cùng có tỷ lệ 10.53%; EGFR ex20ins chiếm tỉ lệ 7.89 %, cuối cùng là EGFR T790M và EGFR L861Q chiếm 5.26%. **Kết luận:** Chuẩn hoá, xây dựng thành công quy trình kỹ thuật xét nghiệm xác định đột biến gen EGFR. Quy trình cho kết quả xét nghiệm có hiệu suất cao hơn, phù hợp với cơ sở vật chất, trang thiết bị tại bệnh viện. Tỷ lệ bệnh nhân UTP xác định mang đột biến gene EGFR 34,86% là khá cao. Tỷ lệ dương tính đột biến gen EGFR ở bệnh nhân UTPKTBN là 34,86 %.

Từ khóa: EGFR, Ung thư Phổi tế bào không nhỏ (NSCLC)

Establishment of a technical protocol for EGRF mutation testing in patients with non-smal cell lung cancer (NSCLC)

ABSTRACT: Objective: Develop a standard technical procedure for testing to determine EGFR gene mutations from paraffin cast samples. **Methods:** Cross-sectional descriptive study, using Realtime-PCR technique in the process of determining gene mutations. Six paraffin cast tissue samples FFPE of patients diagnosed with lung cancer by histopathology and identified with EGFR gene mutations by molecular biology techniques were used to develop the procedure. Apply the procedure to detect EGFR gene mutations after being built on 109 paraffin cast samples FFPE of patients diagnosed with lung cancer by histopathology. **Results:** With 4-5 slices for each sample, the DNA concentration obtained ensures the quantity

and input sample for the gene amplification reaction. When soaking in xylene twice in a row with each soaking time of 5 minutes under shaking and incubation conditions at 560C, the sample completely removed Paraffin, ensuring the purity of the input DNA of the gene amplification reaction. Of the 109 specimens tested, 38 were positive. Of these, 1 specimen was positive for both S768I and G719C; L858R had the highest positive rate of 31.58%, followed by ex19del at 28.95%; G719x and EGFR S768I both had a rate of 10.53%; EGFR ex20ins accounted for 7.89%, and finally EGFR T790M and EGFR L861Q accounted for 5.26%. **Conclusion:** Standardization and successful construction of the technical process for testing to determine EGFR gene mutations. The process gives higher test results, suitable for the facilities and equipment at the hospital. The rate of NSCLC patients identified to carry EGFR gene mutations of 34.86% is quite high.

Keywords: EGFR, non-small cell lung cancer (NSCLC)

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư phổi là loại ung thư thường gặp nhất và có tỷ lệ tử vong cao nhất trong các loại ung thư. Theo số liệu thống kê tình hình ung thư trên toàn thế giới GLOBOCAN năm 2018, ước tính thế giới có khoảng 2,09 triệu ca UTP mới mắc và khoảng 1,76 triệu ca tử vong, đứng đầu trong các loại ung thư [1]. Ung thư phổi được chia làm 2 thể: thể không tế bào nhỏ (non-small cell lung cancer-NSCLC) chiếm khoảng 85% và thể tế bào nhỏ (small cell lung cancer-SCLC), chiếm khoảng 15% [2].

Các nghiên cứu ở cấp độ phân tử cho thấy, sự phát sinh, phát triển UTP diễn ra qua nhiều giai đoạn dưới tác động của các yếu tố nguy cơ, sự mất cảm gen và quá trình tích lũy đột biến xảy ra trên các gen gây ung thư oncogene và gen áp chế ung thư (tumor suppressor gene). Các cơ chế điều hòa gen vốn hoạt động nhịp nhàng và chặt chẽ khi bị rối loạn sẽ dẫn tới sự tăng cường hay ức chế bất thường các gen chức năng [3]. Thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGFR) là một protein xuyên màng có hoạt tính kinase tế bào chất, chuyển tín hiệu yếu tố tăng trưởng quan trọng từ môi trường ngoại bào vào tế bào. Do hơn 60% ung thư phổi không phải tế bào nhỏ (NSCLC) biểu hiện EGFR, EGFR đã trở thành mục tiêu điều trị quan trọng để điều trị

các khối u này [4]. EGFR exon 19 deletion và đột biến điểm L858R chiếm tới 85% các đột biến soma ở EGFR và chúng có thể được sử dụng để dự đoán đáp ứng với EGFR tyrosine kinase inhibitors (TKIs). Các đột biến khác của EGFR được gọi là không phổ biến, trong đó có L861Q và exon 20 insertions là phổ biến nhất. Đặc biệt đột biến điểm L861Q dẫn tới nhạy cảm với TKIs thế hệ một và hai, trong khi đó exon 20 insertions gây kháng với các TKIs đã được phê duyệt lâm sàng [5,6]. Các chất ức chế nhắm vào miền kinase của EGFR đã được phát triển và có hoạt tính lâm sàng. Quan trọng hơn, các chất ức chế tyrosine kinase (TKI) như vậy đặc biệt hiệu quả ở những bệnh nhân có khối u chứa đột biến hoạt hóa trong miền tyrosine kinase của gen EGFR. Các thử nghiệm gần đây hơn đã chỉ ra rằng đối với những bệnh nhân NSCLC tiến triển có khối u đột biến EGFR, liệu pháp ban đầu bằng TKI thay vì hóa trị có thể là lựa chọn điều trị tốt nhất. Do đó, xét nghiệm đột biến là bắt buộc vì việc điều trị chỉ dựa trên các đặc điểm lâm sàng hoặc các xét nghiệm thường quy khác là không đủ [7,8]. Hải Phòng là một thành phố lớn cùng với số lượng bệnh nhân mắc ung thư phổi là khá nhiều. Các bệnh nhân điều trị ung thư chủ yếu tập trung tại Trung tâm u bướu Bệnh viện hữu nghị Việt Tiệp. Xuất phát từ

tình hình thực tế, việc triển khai xét nghiệm xác định đột biến gen EGFR là hết sức cần thiết. Do đó nghiên cứu nhằm tiến hành xây dựng quy trình chuẩn phù hợp với điều kiện trang thiết bị và cơ sở vật chất tại labo xét nghiệm s, đảm bảo chất lượng xét nghiệm để lựa chọn thuốc đích phù hợp theo liệu pháp nhắm đích.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu: mẫu đúc paraffin FFPE của bệnh nhân được chẩn đoán ung thư phổi bằng mô bệnh học tại khoa Giải phẫu bệnh – Bệnh viện Việt Tiệp Hải Phòng

Địa điểm và thời gian nghiên cứu: Khoa Xét nghiệm cơ sở An Đồng – BV Hữu nghị Việt Tiệp, từ tháng 08/2024 đến tháng 2/2025.

Thiết kế nghiên cứu: Mô tả cắt ngang sử dụng số liệu tiến cứu.

Cỡ mẫu, chọn mẫu: Chọn mẫu thuận tiện cho 2 mục đích

- Để phục vụ việc tối ưu hóa quy trình, lựa chọn 6 mẫu mô đúc paraffin FFPE được lưu trữ tại Khoa Giải phẫu bệnh, Bệnh viện Hữu nghị Việt Tiệp.

- Ứng dụng quy trình để xác định đột biến gene trên các bệnh nhân (109 mẫu)

Tiêu chuẩn lựa chọn:

- 6 mẫu mô đúc paraffin FFPE đã được xác định có đột biến EGFR, là mẫu mô được thu nhận trong phẫu thuật, đảm bảo khối đúc có lượng mẫu đủ lớn để thực hiện lặp lại quy trình nghiên cứu nhiều lần.

- Các mẫu bệnh phẩm Ứng dụng quy trình xác định đột biến gene EGFR là mẫu sinh thiết từ những bệnh nhân được chẩn đoán ung thư phổi, được sự đồng thuận của bệnh nhân và sự cho phép của Ban lãnh đạo, hội đồng khoa học của Bệnh viện. Đồng thời tất cả những mẫu này có chỉ định của Bác sĩ điều trị nhằm ứng dụng trong điều trị hướng đích.

Tiêu chuẩn loại trừ: mẫu sinh thiết từ những bệnh nhân được chẩn đoán ung thư phổi nhưng không có chỉ định điều trị hướng đích.

Vật liệu, hóa chất và thiết bị chính: bộ kit tách chiết QIAamp DNA FFPE Tissue Kit, Bộ kit Quick guide for RT003 của công ty DIATECH giúp phát hiện 86 đột biến của oncogene EGFR bằng real-time PCR, máy CFX96

Đạo đức nghiên cứu: Nghiên cứu được sự đồng ý của Ban lãnh đạo bệnh viện Hữu nghị Việt Tiệp và hội đồng khoa học của bệnh viện. Các mẫu bệnh phẩm sử dụng trong nghiên cứu được sự đồng ý của Bệnh nhân, đảm bảo nguyên tắc bảo mật thông tin và tuân thủ đạo đức nghiên cứu.

KẾT QUẢ

Tối ưu lượng mẫu đầu vào

Để tách chiết DNA từ mẫu mô đúc paraffin FFPE, số lượng lát cắt được lựa chọn từ 1-6. Tiến hành tách chiết thử nghiệm trên 6 mẫu bệnh phẩm. DNA sau tách chiết được xác định nồng độ và độ tinh sạch theo phương pháp đo quang.

Bảng 1. Kết quả tách chiết DNA tương ứng với số lát cắt từ mẫu mô đúc paraffin FFPE

	1 lát		2 lát		3 lát		4 lát		5 lát		6 lát	
	A260/ A280	NĐ	A260/ A280	NĐ	A260/ A280	NĐ	A260/ A280	NĐ	A260/ A280	NĐ	A260/ A280	NĐ
1	1.9	7,95	1,8	8,88	2.0	14,07	1.78	17,98	1.6	28,10	1.66	35,05
2	2	8,02	1.9	8,79	1.9	17,74	1.76	18,91	1.54	28,81	1.52	34,71

3	2.1	8.25	1.95	8,99	1.86	17,95	1.60	19,69	1.49	28,06	1.43	36,04
4	1.8	8.13	1.82	8,87	1.91	17,89	1.73	18,94	1.71	28,65	1.68	36,15
5	1.97	6,79	1.88	7,02	1.84	16,10	1.80	18,72	1.68	27,33	1.61	34,01
6	1.85	7,09	1.80	8,15	1.83	15,85	1.86	17,93	1.59	26,74	1.50	35,02

(Ghi chú: ND: Nồng độ, nồng độ DNA được tính theo đơn vị ng/μl)

Nồng độ đạt tiêu chuẩn cho phản ứng xác định đột biến gen bằng kỹ thuật realtime - PCR theo khuyến cáo của nhà sản xuất là 15-30 ng/μl. Từ kết quả bảng 1 cho thấy, khi sử dụng 1-4 lát cắt thì nồng độ thấp hơn 15-30 ng/μl. Với 5-6 lát cắt thì nồng độ đạt tiêu chuẩn từ 20-30 ng/μl. Để phù hợp với điều kiện tiêu chuẩn của nhà sản xuất, đồng thời phù hợp với thực tế về số lượng mẫu mô đúc tại Bệnh viện, số lát cắt đầu vào phù hợp nhất là 5. Bảng 1 cũng chỉ ra rằng tuy nồng độ DNA với số lượng mẫu đầu vào là từ 5-6 lát cắt đạt nồng độ tiêu chuẩn nhưng lại không đảm bảo độ tinh sạch cho các phản ứng tiếp theo. Quy trình nhà sản xuất đưa ra là tiến hành ngâm mẫu bệnh phẩm với xylen 1 lần duy nhất trong 5' ở nhiệt độ thường. Tuy nhiên thực tế sau 1 lần ngâm, paraffin không tan hoàn toàn, kết quả này có thể quan sát bằng mắt thường. Từ đó có thể kết luận rằng trong các mẫu sau tách chiết vẫn còn lẫn nhiều tạp chất, trong trường hợp này có thể là lượng paraffin tồn dư chưa loại bỏ được hoàn toàn.

Tối ưu hóa quy trình loại bỏ paraffin

Để loại bỏ hoàn toàn lượng paraffin tồn dư trong mẫu tách chiết, quy trình xử lý với xy len cũng được xem xét và cải biến. Khi tiến hành ngâm xylen 2 lần liên tiếp với thời gian ngâm mỗi lần là 5', lượng paraffin tan nhiều hơn rất nhiều. Đặc biệt khi ngâm xylen 5' trong điều kiện lắc và ủ ở 56⁰C, mẫu được loại bỏ hoàn toàn Paraffin. DNA thu được sau tách chiết được kiểm tra độ tinh sạch dựa trên các chỉ số A260/A280 (2.0 >= A260/A280 >=1.8)

Bảng 2. Đánh giá hiệu quả khi thay đổi thời gian ngâm xylen 5' ở 56⁰ (thực hiện 2 lần liên tiếp).

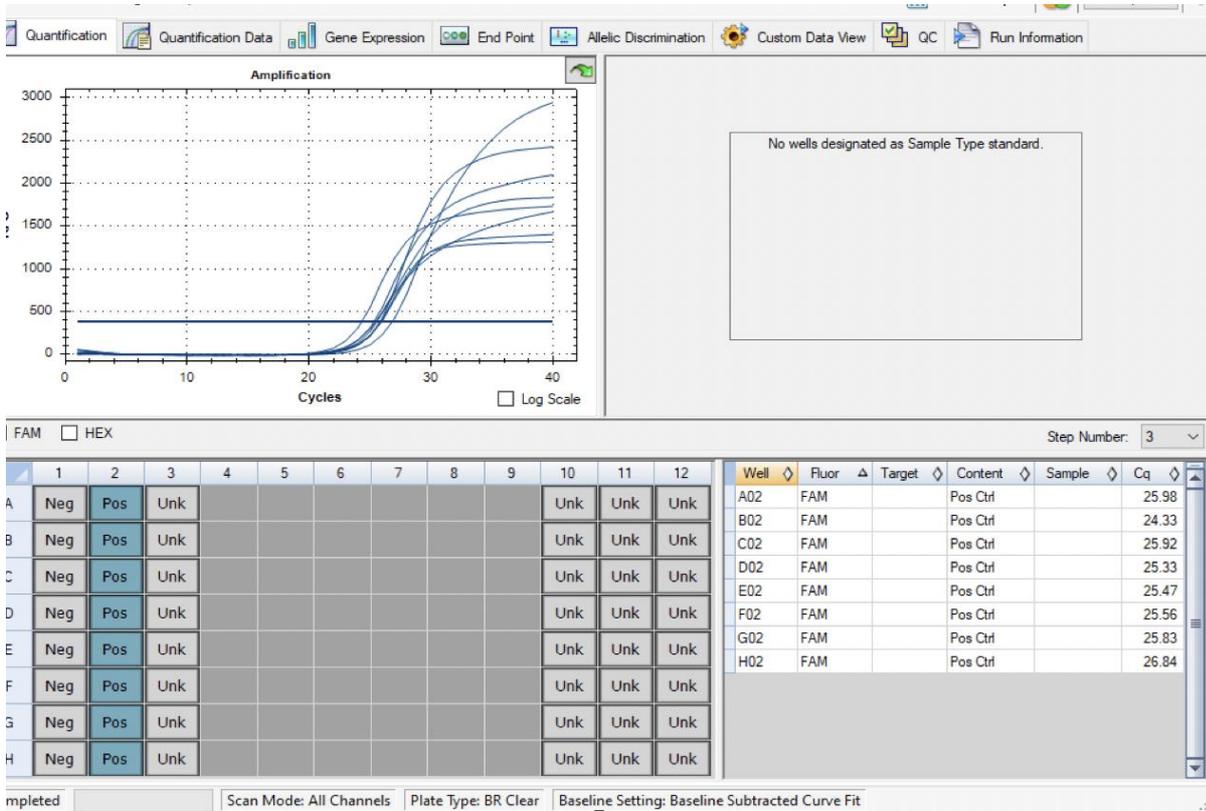
Mẫu	Nồng độ DNA (ng/μl)	A260/A280
1	29,37	1.9
2	29,87	1.89
3	29,43	1.85
4	29,54	1.82
5	28,38	1.89
6	27,81	1.81

Kết quả bảng 2 chỉ ra rằng sau khi thực hiện cải biến, tối ưu quy trình loại bỏ xy len, cả 6 mẫu mô đúc paraffin FFPE với 5 lát cắt đều đạt nồng độ DNA phù hợp và độ tinh sạch hoàn toàn tối ưu.

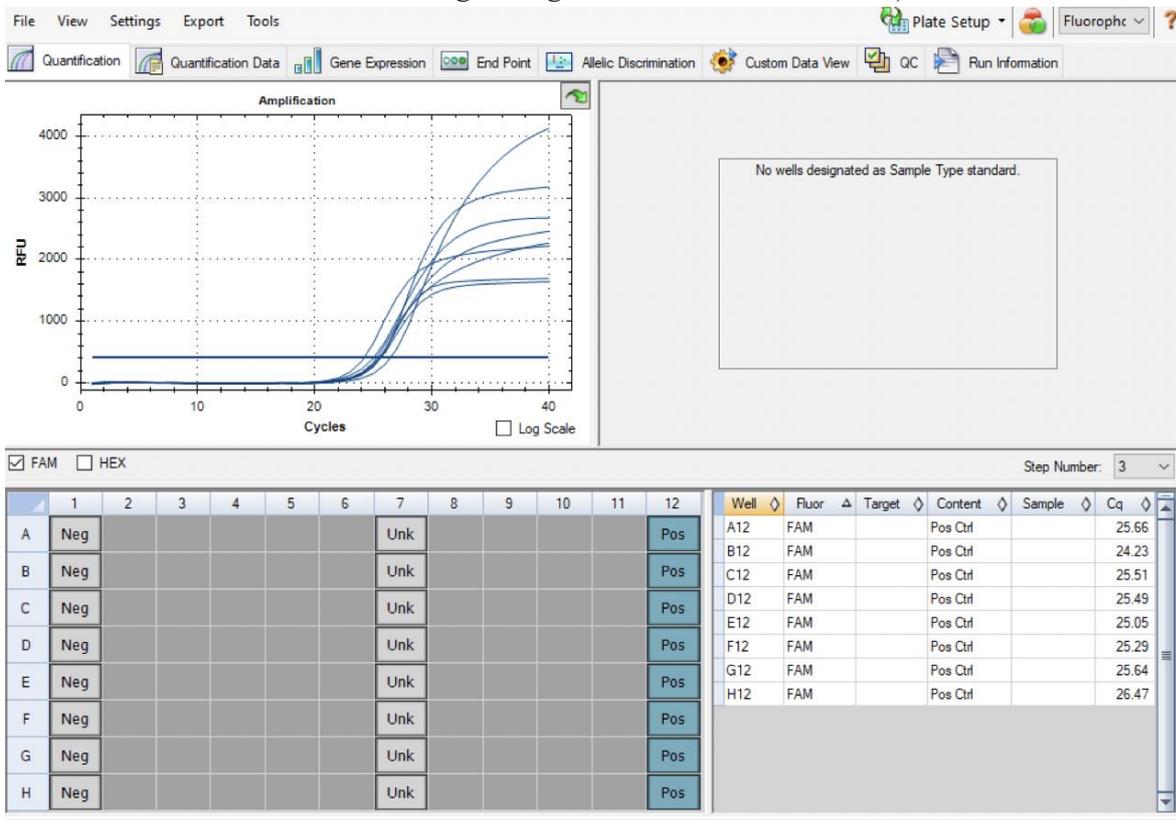
Tối ưu nồng độ DNA trong phản ứng Realtime- PCR

Theo khuyến cáo của NSX tiêu chuẩn phân tích các mẫu đối chứng, lượng DNA đầu vào cho phản ứng PCR là 15 – 30 ng/μl đều đảm bảo xét nghiệm. Tiến hành thử nghiệm trên hai nồng độ đầu vào lần lượt là 15 ng/μl và 25 ng/μl trên mẫu đã được tách chiết. Kết quả cho thấy ở cả hai nồng độ đều đảm bảo phản ứng phát hiện đột biến gen trên 6 mẫu bệnh phẩm. Đồng thời

chất lượng DNA cũng được đánh giá thông qua phản ứng thực hiện với EGRF control, đây là vùng trình tự gen bình thường có ở người. Do đó tất cả các mẫu bệnh phẩm sau tách chiết khi thực hiện phản ứng khuếch đại gen đều phải xuất hiện sản phẩm này.

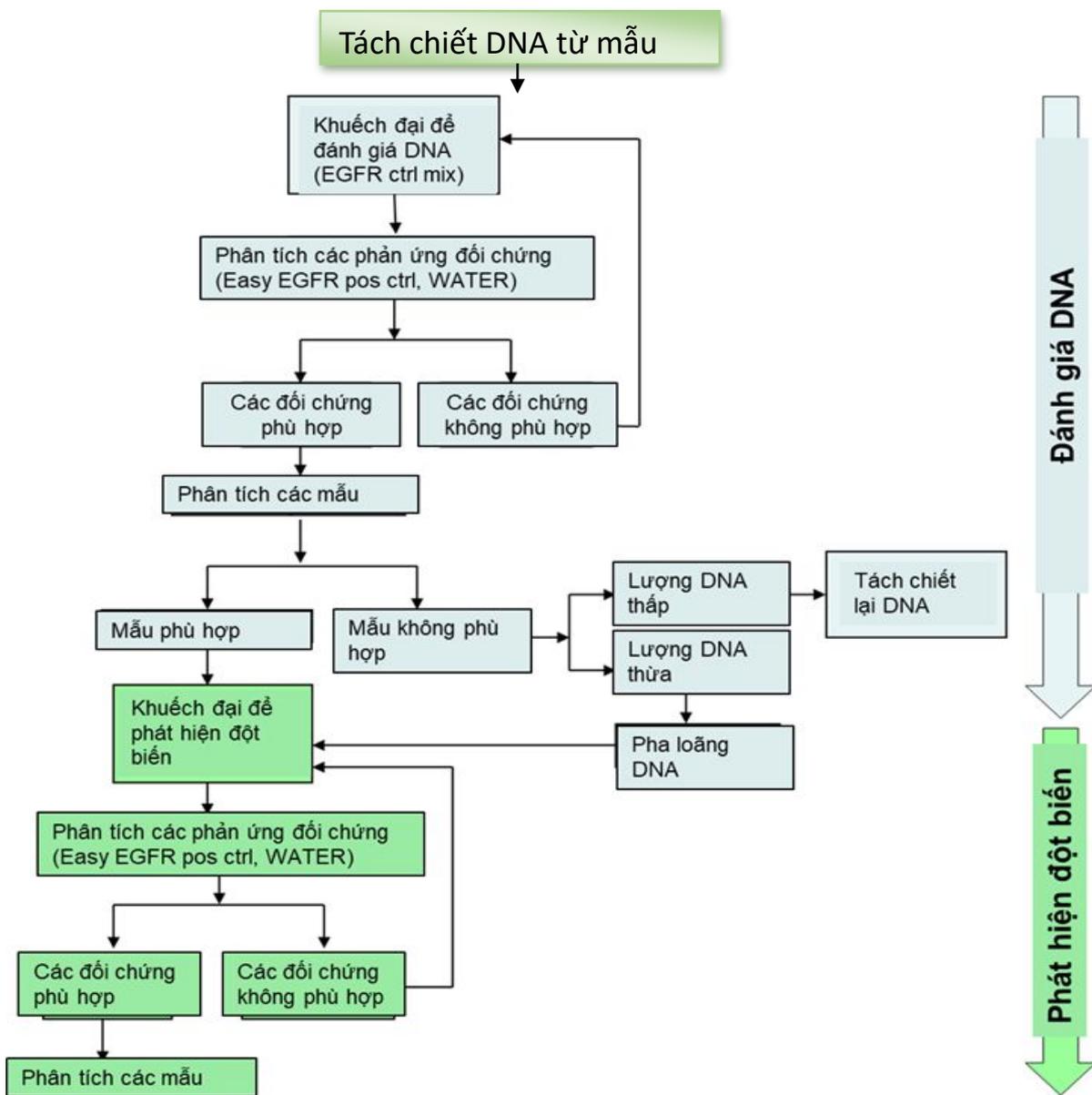


Hình 1. Biểu đồ chạy PCR xác định đột biến EGFR với nồng độ DNA là 15 ng/ μ l. (A02: mẫu số 1; B02: mẫu số 2; C02: mẫu số 3; D02: mẫu số 4; E02: mẫu số 5; F02: mẫu số 6; G02: mẫu đối chứng dương, H02: mẫu control EGFR)



Hình 2. Biểu đồ chạy PCR xác định đột biến EGFR với nồng độ DNA là 25 ng/μl (A02: mẫu số 1; B02: mẫu số 2; C02: mẫu số 3; D02: mẫu số 4; E02: mẫu số 5; F02: mẫu số 6; G02: mẫu đối chứng dương, H02: mẫu control EGFR)

Xây dựng quy trình xác định đột biến EGFR mẫu mô dục paraffin FFPE



Hình 3. Sơ đồ Quy trình xác định đột biến gene EGFR từ mẫu mô dục paraffin FFPE

Phát hiện đột biến EGFR trên các bệnh nhân UTPKTBN

Áp dụng quy trình để phát hiện đột biến gene EGFR trên 109 bệnh nhân NSCLC (sử dụng mẫu mô dục paraffin FFPE), kết quả thu được 38 bệnh nhân mang gene đột biến EGFR, chiếm 34,86%. Trong đó có 1 bệnh nhân đồng thời xuất hiện 2 đột biến S768I Và G719C.

Bảng 3. Kết quả xét nghiệm các đột biến gen EGFR

Các đột biến	n	%
EGFR G719C	4	10.53

EGFR T790M	2	5.26
EGFR S768I	4	10.53
EGFR ex20ins	3	7.89
EGFR L858R	12	31.58
EGFR L861Q	2	5.26
EGFR ex19del	11	28.95
Tổng	38	100

Bảng 3 cho thấy tỉ lệ phân bố các loại đột biến trên đối tượng nghiên cứu như sau: EGFR L858R chiếm tỷ lệ dương tính cao nhất với 31.58%, tiếp theo là EGFR ex19del với 28.95%; EGFR G719x và EGFR S768I cùng có tỷ lệ 10.53%; EGFR ex20ins chiếm tỉ lệ 7.89 %, cuối cùng là EGFR T790M và EGFR L861Q chiếm 5.26%.

BÀN LUẬN

Nghiên cứu của chúng tôi đã chỉ ra rằng: Với 4-5 lát cắt cho mỗi mẫu, thu được nồng độ là ổn định nhất và đảm bảo lượng mẫu để thực hiện xét nghiệm. Trong khi theo hướng dẫn của nhà sản xuất Kit tách chiết, số lượng lát cắt đầu vào là 10 lát. Kết quả của chúng tôi không nói lên rằng hướng dẫn của nhà sản xuất là không phù hợp, kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng số lượng lát cắt đã được lựa chọn phù hợp với kỹ thuật thực tế tại Khoa Giải phẫu bệnh của Bệnh viện về độ dày của lát cắt, số lượng tế bào chứa trên một lát cắt... Quy trình loại bỏ parafin bằng xylen được cải tiến đã thể hiện sự tối ưu vượt trội so với hướng dẫn của nhà sản xuất. Ở điều kiện kiện lắc và ủ ở 560C đảm bảo cho quá trình tan chảy parafin được nhanh hơn nhưng không ảnh hưởng đến chất lượng DNA trong quá trình tách chiết, loại bỏ hoàn toàn parafin và tăng nồng độ DNA và độ tinh sạch. Lượng DNA đầu vào cho phản ứng PCR dao động trong khoảng 15- là ng/μl đảm bảo cho việc phát hiện đột biến gen trong mẫu bệnh phẩm. Với 6 mẫu bệnh phẩm được lựa chọn cho việc tối ưu hoá quy trình đều phát hiện được đột biến EGFR phù hợp với kết quả đã thực hiện trước đây khi áp dụng quy trình đã được tối ưu hoá. So sánh với khuyến cáo của nhà sản xuất là nồng độ đầu vào từ 15-30 ng, kết quả

cũng hoàn toàn phù hợp. Tuy nhiên chúng tôi đưa ra lựa chọn dải nồng độ 15- 25 ng/μl tương đương với 4-5 lát cắt đầu vào, hoàn toàn phù hợp cho phản ứng khuếch đại.

Thực hiện xác định đột biến gen EGFR trên 109 bệnh nhân, tỉ lệ phát hiện đột biến là 34,86% cao hơn không đáng kể so với nghiên cứu của các tác giả Yue-Lun Zang cùng các cộng sự là 32,2% [6]. Về các loại đột biến được phát hiện, trong nghiên cứu này các loại đột biến chủ yếu trong 7 loại đột biến, trong đó L858R chiếm tỷ lệ dương tính cao nhất với 31.58%, tiếp theo là ex19del với 28.95%; 39,47% còn lại cho các loại đột biến G719C; S768I ex20ins; T790M và L861Q. Kết quả này có sự khác nhau về tỉ lệ so với kết quả nghiên cứu của tác giả Lecia V. Sequist, M.D., M.P.H., Jean-Charles Soria và cộng sự với 90% bệnh nhân dương tính với đột biến mất đoạn trong khung ở exon 19 hoặc đột biến điểm L858R ở exon 21[8]. Tuy nhiên kết quả vẫn có sự tương đồng là tỉ lệ về đột biến điểm L858R ở exon 21 trong nghiên cứu của chúng tôi cũng chiếm tỉ lệ cao nhất. Sự khác nhau về tỉ lệ % có thể do cỡ mẫu trong nghiên cứu này còn nhỏ.

Việc phát hiện đột biến gen hay không ngoài việc phụ thuộc vào kỹ thuật tách chiết và quy trình thực hiện phản ứng thì còn phụ thuộc vào vị trí lấy mẫu, vị trí của lát cắt có chứa tế bào mang đột biến hay không.

KẾT LUẬN

Với sự thay đổi trong quy trình kỹ thuật từ các khâu số lượng bệnh phẩm sử dụng, thời gian xử lý mẫu, cũng như nồng độ mẫu đưa vào thực hiện xét nghiệm, chúng tôi đã xây dựng được một quy trình cho kết quả xét nghiệm có hiệu suất cao hơn, phù hợp với cơ sở vật chất, trang thiết bị tại bệnh viện, tiết kiệm được nguồn bệnh phẩm lưu trữ của người bệnh, giúp người bệnh có cơ hội thực hiện thêm nhiều xét nghiệm liên quan mà không cần sinh thiết lại hoặc đã cắt bỏ khối u sau phẫu thuật. Tỷ lệ bệnh nhân UTPKTBN xác định đột biến mang đột biến gene EGFR 34,86% là khá cao. Điều đó cho thấy việc triển khai xét nghiệm xác định đột biến gene EGFR đối với bệnh nhân UTPKTBN nhằm phục vụ điều trị hướng đích rất cần thiết về mặt khoa học cũng như đáp ứng nhu cầu của người bệnh tại Hải Phòng.

KHUYẾN NGHỊ

Ngoài EGFR, còn một số các đột biến khác liên quan đến ung thư phổi như KRAS, BRAF... Vì vậy khuyến cáo nên làm thêm các xét nghiệm phát hiện các đột biến khác để có được kết quả đầy đủ hơn.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin cảm ơn Ban giám đốc Bệnh viện Hữu nghị Việt Tiệp Hải Phòng đã đồng ý cho nhóm nghiên cứu được tiến hành nghiên cứu này, khoa Giải phẫu bệnh viện Việt Tiệp đã hỗ trợ thu thập mẫu nghiên cứu. Xin gửi lời cảm ơn sâu sắc đến Ban Giám hiệu trường Đại học Y dược Hải Phòng đã tạo điều kiện trong suốt quá trình nghiên cứu. Nguồn kinh phí thực hiện nghiên cứu được tài trợ bởi công ty Diatech pharmacogenetics.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chin L, Andersen JN, Futreal PA. Cancer genomics: from discovery science to personalized medicine. *Nat Med.* 2011, 17(3), 297-303.
2. Lander ES. Initial impact of the sequencing of the human genome. *Nature* 2011, 470(7333), 187-197.
3. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med.*, 2004, 10(8), 789-799.
4. Ding L, Getz G, Wheeler DA, Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* 2008, 455, 1069-1075.
5. Weinstein IB, Joe AK. Mechanisms of disease: Oncogene addiction-a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nat Clin Pract Oncol.* 2006, 3(8), 448-457.
6. Torti D, Trusolino L. Oncogene addiction as a foundational rationale for targeted anticancer therapy: promises and perils. *EMBO Mol Med.* 2011, 3(11), 623-636.
7. Kantarjian HM. et al. Survival benefit with imatinib mesylate versus interferon-alpha based regimens in newly diagnosed chronic-phase chronic myelogenous leukemia. *Blood.* 2006, 108(6), 1835-1840.
8. Coudert B, Ciuleanu T, Park K, et al. Survival benefit with erlotinib maintenance therapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC) according to response to first-line chemotherapy. *Ann Oncol.* 2012, 23(2), 388-3894.
9. Peeters M. et al. Randomized phase III study of panitumumab with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) compared with FOLFIRI alone as second-line treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2010, 28(31), 4706-4713.
10. Paez JG. et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science.* 2004, 304(5676), 1497-1500.