

·临床研究·

中国黏膜黑色素瘤的临床特点及基因突变分析

黄复雪, 李丹丹, 文习之, 李婧婧, 祝保艳, 张晓实
(中山大学肿瘤防治中心生物治疗科, 广东 广州 510060)

摘要:【目的】采用二代测序(NGS)检测黏膜黑色素瘤中的295个基因突变情况,分析黏膜黑色素瘤患者的基因突变谱及突变特点,探索潜在治疗靶点。【方法】组织标本来自2017年9月至2018年9月在中山大学肿瘤防治中心生物治疗科就诊的黏膜黑色素瘤患者,于我院分子诊断科行NGS检测295个基因变异。【结果】黑色素瘤主要驱动基因突变频率分别为BRAF 20%(5/25),KIT 20%(5/25),NRAS 12%(3/25),NF1 8%(2/25)。最常见的基因突变为MYC拷贝数增加(36%,9/25),其次为KDR拷贝数增加,突变率为24%(6/25)。DNA损伤修复,细胞周期,PI3K-mTOR,生长因子受体,MAPK,免疫应答和WNT/NOTCH相关通路广泛存在突变,突变率分别为76%(19/25),72%(18/25),56%(14/25),60%(15/25),36%(9/25),28%(7/25),24%(6/25)。可见多个靶向治疗靶点,如ATM,ATR, EMSY, FANCI, RAD52, MET, PDGFRA, KDR, FLT4, ALK, ERBB3及ROS1等。【结论】中国黏膜黑色素瘤基因突变谱与皮肤型存在差异,且与西方人群不同,NGS测序可为黏膜黑色素瘤的治疗提供潜在治疗靶点。

关键词:二代测序;基因突变;黏膜黑色素瘤

中图分类号:R73 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2019)02-0244-07

Clinical Characteristics and Mutation Landscape of Chinese Mucosal Melanoma

HUANG Fu-xue, LI Dan-dan, WEN Xi-zhi, LI Jing-jing, ZHU Bao-yan, ZHANG Xiao-shi
(Biotherapy Center, State key Laboratory of Oncology in south China, Collaborative Innovation Center for Cancer Medicine, Sun-sen University Cancer Center, Guangzhou 510060, China)
Correspondence to: ZHANG Xiao-shi; E-mail: zhangxsh@sysucc.org.cn

Abstract:【Objective】To use next generation sequencing (NGS) for examining 295 gene mutations in Chinese mucosal melanoma, and explore the mutation landscape of Chinese mucosal melanoma for potential therapeutic targets.【Methods】The specimens were from 25 mucosal melanoma patients from September 2017 to September 2018 in Biotherapy Center, Sun Yat-sen University Cancer Center. Mutations of 295 genes were detected by NGS sequencing in the Department of Molecular Diagnostics in our hospital.【Results】The mutation frequency of major driver genes of melanoma was: BRAF 20% (5/25), KIT 20% (5/25), NRAS 12% (3/25), and NF1 8% (2/25), respectively. The most common mutation was an increase copy number in MYC (9/25, 36%), followed by an increase in KDR copy number, 24% (6/25). DNA damage repair, cell cycle, PI3K-mTOR, growth factor receptor, MAPK, immune response and WNT/NOTCH related pathways were widely mutated. Mutation rates were 76% (19/25), 72% (18/25), 56% (14/25), 60% (15/25), 36% (9/25), 28% (7/25), and 24% (6/25), respectively. Multiple therapeutic targets were observed, such as ATM, ATRX, EMSY, FANCI, RAD52, MET, PDGFRA, KDR, FLT4, ALK, ERBB3 and ROS1.【Conclusion】Gene mutations in Chinese mucosal melanoma were different from that of Chinese cutaneous melanoma and that of Caucasians. NGS could provide potential therapeutic targets for the treatment of Chinese mucosal melanoma.

Key words: next generation sequencing (NGS); gene mutation; mucosal melanoma

J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2019, 40(2):244-250]

收稿日期:2018-11-09

基金项目:国家自然科学基金(81772910,81572493)

作者简介:黄复雪,硕士,研究方向:肿瘤的免疫治疗及靶向治疗,E-mail:huangfx@sysucc.org.cn;张晓实,通信作者:教授,E-mail:zhangxsh@sysucc.org.cn

黑色素瘤是一种具有高度侵袭性和种族特异性的恶性肿瘤。在中国每年新发病人数超过2万^[1]。与西方人不同,中国黑色素瘤人群以肢端及黏膜型为主,黏膜型发病率约为24%^[2],明显高于西方的1.3%,且具有发现晚,预后差的特点(中位生存时间,黏膜型9.1个月 vs. 皮肤型11.7个月)^[3]。近年来,免疫治疗及靶向治疗在黑色素瘤治疗方面发展迅速,但可获益患者占比少,且黏膜型黑色素瘤免疫治疗疗效较皮肤型黑色素瘤差^[4],可供选择靶向治疗药物有限。新的治疗方法有赖于对肿瘤分子机制的不断深入探索,本研究拟通过联合中国黏膜黑色素瘤患者的二代测序(next generation sequencing, NGS)测序结果及临床资料,为探寻中国黏膜黑色素瘤患者的个体化治疗提供依据和参考。

1 材料与方法

1.1 材料

收集2017年9月至2018年9月在中山大学肿瘤防治中心生物治疗科就诊并在我院行NGS测序的25例黏膜型黑色素瘤患者的临床资料及基因检测结果。本研究经医院医学伦理委员会批准,所有患者均知情同意并签署知情同意书。

1.2 实验方法

1.2.1 组织样本采集和DNA提取 基因组DNA按照QIAamp DNA FFPE Tissue Kit说明书提取,DNA浓度使用Qubit dsDNA assay (Life Technologies)进行测定。

1.2.2 NGS文库制备 使用Covaris M220超声仪行DNA片段化,随后行末端补平、磷酸化和接头连接。使用Agencourt AMPure beads (Beckman Coulter, Brea, CA, USA)回收200~400 bp的DNA片段,随后行捕捉探针(钓饵)杂交,捕获杂交片段和聚合酶链反应(PCR)扩增。采用生物分析仪进行高灵敏度DNA检测以评估片段的质量和大小。50ng DNA用于文库构建。12个PCR循环用于文库扩增。富集的双端测序(读取长度150 bp)的样品在Nextseq500测序仪(Illumina, Inc, San Diego, CA, USA)上进行测序。

1.2.3 Panel描述 包含295个与癌症发生机理及靶向治疗密切相关的基因,利用探针杂交法富集其中287个基因的外显子区域和22个基因的内含子区域,报告与癌症有明确临床相关性的基因突变、扩增及融合变异(图1)。

1.3 统计学方法

采用SPSS 20.0对数据进行统计学分析,计数资料以样本的绝对数和相应的百分比表示。

2 结果

2.1 患者基本信息

研究共纳入黏膜黑色素瘤患者25例,其中男性14例(56%),女性11例(44%)。中位年龄为57岁,各亚型比例为:头颈黏膜13例(52%),阴道及尿道6例(24%),直肠肛管2例(8%),食管4例(16%),见表1。

ABL1	BARD1	CD79A	CTNNA1	ETV6	FGF7	IDH1	KMT2A	MTOR	NUP93	PRKAR1A	RUNX1	TET2
AKT1	BCL2	CD79B	CTNNB1	EWSR1	FGFR1	IDH2	KMT2D	MUTYH	PAK3	PRKDC	RUNX1T1	TGFBR2
AKT2	BCL2L2	CDC73	CUL4A	EZH2	FGFR2	IGF1	KRAS	MYC	PAK7	PRSS8	SETD2	TIPARP
AKT3	BCL6	CDH1	CUL4B	FAM46C	FGFR3	IGF1R	LMO1	MYCL1	PALB2	PTCH1	SF3B1	TMPRSS2
ALK	BCOR	CDK12	CYP17A1	FANCA	FGFR4	IGF2	LRP1B	MYCN	PARP1	PTEN	SH2B3	TNFAIP3
ALOX12B	BCORL1	CDK4	DAXX	FANCC	FLT1	IKBKE	MAP2K1	MYD88	PARP2	PTPN11	SMAD2	TNFRSF14
AMER1	BCR	CDK6	DDR2	FANCD2	FLT3	IKZF1	MAP2K2	NBN	PARP3	RAD50	SMAD4	TOP1
APC	BLM	CDK8	DIS3	FANCE	FLT4	IL7R	MAP2K4	NCOR1	PARP4	RAD51	SMARCA4	TP53
APCDD1	BRAF	CDKN1B	DNMT3A	FANCF	FOXL2	INHBA	MAP3K1	NF1	PAX5	RAD51B	SMARCB1	TRRAP
AR	BRCA1	CDKN2A	DOT1L	FANCG	GATA1	IRF4	MAP3K13	NF2	PBRM1	RAD51C	SMARCD1	TSC1
ARAF	BRCA2	CDKN2B	EGFR	FANCI	GATA2	IRS2	MCL1	NFE2L2	PDGFRA	RAD51D	SMO	TSC2
ARFRP1	BRIP1	CDKN2C	EP300	FANCL	GATA3	JAK1	MDM2	NFKBIA	PDGFRB	RAD52	SOCS1	TSHR
ARID1A	BTG1	CEBPA	EPHA3	FANCM	GID4	JAK2	MDM4	NKX2-1	PDK1	RAD54L	SOX10	WHL
ARID2	BTK	CHEK1	EPHA5	FAT3	GNA11	JAK3	MED12	NOTCH1	PIK3C2G	RAF1	SOX2	WISP3
ASXL1	C11ORF30	CHEK2	EPHB1	FBXW7	GNA13	JUN	MEF2B	NOTCH2	PIK3C3	RARA	SPEN	WT1
ATM	CARD11	CHUK	ERBB2	FGF10	GNAQ	KAT6A	MEN1	NOTCH3	PIK3CA	RB1	SPOP	XPO1
ATR	CASP8	CIC	ERBB3	FGF12	GNAS	KDM5A	MET	NOTCH4	PIK3CG	REL	SRC	XRCC3
ATRX	CBFB	CRBN	ERBB4	FGF14	GPR124	KDM5C	MITF	NPM1	PIK3R1	RET	STAG2	ZNF217
AURKA	CBL	CREBBP	ERG	FGF19	GRIN2A	KDM6A	MLH1	NRAS	PIK3R2	RICTOR	STAT4	ZNF703
AURKB	CCND1	CRKL	ESR1	FGF23	GSK3B	KDR	MPL	NSD1	PMS2	RNF43	STK11	
AXL	CCND2	CRLF2	ETV1	FGF3	HGF	KEAP1	MRE11A	NTRK1	PNRC1	RPA1	SUFU	
BACH1	CCND3	CSF1R	ETV4	FGF4	HLA-A	KIT	MSH2	NTRK2	PPP2R1A	RPTOR	SYK	
BAP1	CCNE1	CTCF	ETV5	FGF6	HRAS	KLHL6	MSH6	NTRK3	PRDM1	ROS1	TBX3	

Genes are sorted alphabetically

■ Mutation
■ Mutation/amplification
■ Mutation/Fusion

图1 295个基因列表

Fig.1 The 295 genes in our panel

表1 病人临床病理特点

Table 1 Clinicopathological characteristics of the patients

Variable	Total (n=25)
Gender	
Male	14 (56%)
Female	11 (44%)
Median age	57 (53-65.5)
Anatomical site	
Head and neck	13 (52%)
Genital area	6 (24%)
Anorectum	2 (8%)
Digestive tract	4 (16%)
Sample type	
Primary tumor	16 (64%)
Metastasis	7 (28%)
Recurrence	2 (8%)

2.2 黏膜黑色素瘤患者主要驱动基因突变情况

在25例黏膜黑色素瘤患者中,*BRAF*基因共观察到5例突变(5/25, 20%),均发生在头颈黏膜黑色素瘤患者,其他类型黏膜黑色素瘤患者未见突变,其中2例为p.V600E突变,1例p.D94G突变,1例*KCTD15-BRAF*基因融合和1例基因拷贝数增加。*KIT*基因突变共在5(20%, 5/25)例患者中检测到,3例拷贝数增加,2例错义突变,突变位点分别为p.W557G和p.L576P。3(12%, 3/25)例患者检测到*NRAS*基因突变,位点分别为p.Q61R, p.G12V和p.G12D,均为热点突变。*NF1*基因突变共在2(8%, 2/25)例患者中检测到3个变异,其中一例患者为p.Ala399fs移码突变,1例患者为p.Ser1331fs移码突变和p.K2593M错义突变,黑色素瘤驱动基因*BRAF*, *NRAS*, *KIT*, *NF1*的分布见图2。

2.3 黏膜黑色素瘤患者基因突变频率及各不同通路的突变情况

295个基因中125个基因发生至少一个变异,变异类型包括错义突变,剪切突变,拷贝数增加及缺失,无义突变,基因重排和基因融合。变异最多的基因为*MYC*基因,共观察到9例(9/25, 36%),均表现为基因拷贝数增加(CN=2.67-6.74)。其次发生变异的基因为*KDR*,突变率为24%(6/25),除1例病人*KDR*同时观察到基因错义突变和拷贝数增加,其余患者均表现为基因拷贝数增加。目前,这些基因在黏膜黑色素瘤高频突变尚未见报道。

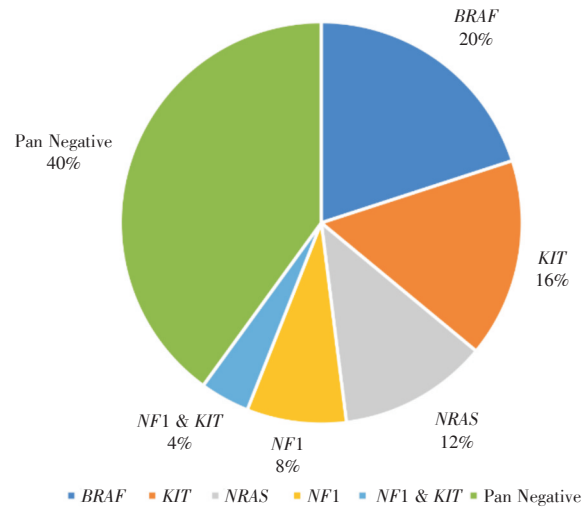


图2 25例黏膜黑色素瘤患者*BRAF*, *NRAS*, *NF1*及*KIT*基因突变分布

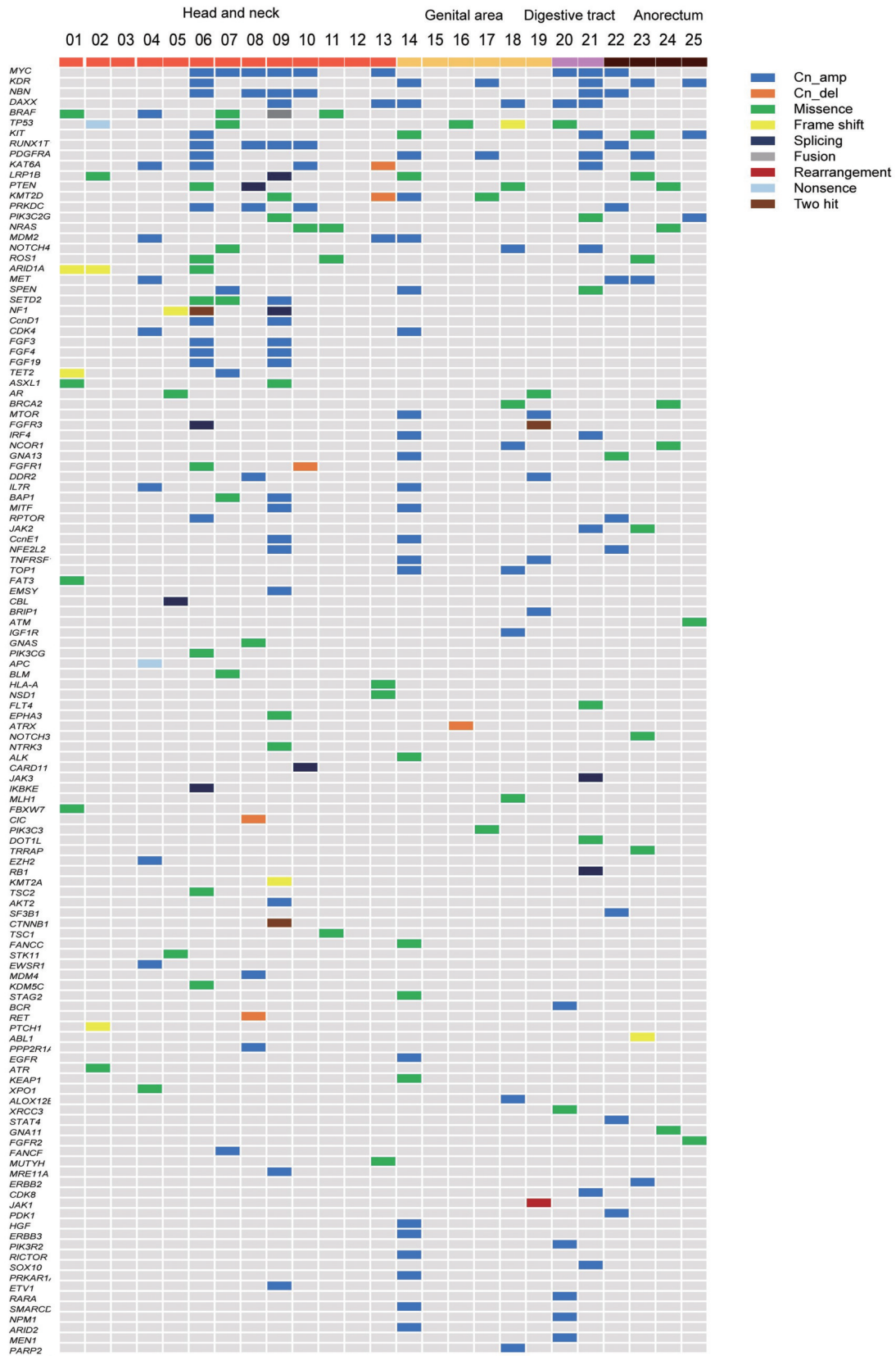
Fig.2 Mutations of *BRAF*, *NRAS*, *NF1*, and *KIT* in 25 mucosal melanoma patients

多靶点药物治疗靶点如*MET*, *PDGFRA*, *FLT4*, *ROS1*等,及其他靶向治疗靶点如*ALK*, *EGFR*, *ERBB3*, *mTOR*等均在黏膜黑色素瘤患者有观察到。具体基因突变类型及分布见图3。

随后,我们将125个基因根据功能分为DNA损伤修复、MAPK、生长因子及其受体、细胞周期、PI3K-mTOR、免疫应答和WNT/NOTCH相关通路,未纳入相关通路的基因没有纳入本部分分析。变异率最高的通路为DNA损伤修复76%(19/25),随后依次为细胞周期72%(18/25),生长因子及其受体60%(15/25),PI3K-mTOR56%(14/25),MAPK36%(9/25),免疫应答28%(7/25)和WNT/NOTCH相关通路24%(6/25)。在DNA损伤修复相关通路,我们可观察到多个同源重组修复相关基因突变,如*NBN*, *BLM*, *BRCA2*, *BRIP1*, *SMARCD1*。细胞周期相关通路中,包含多个与黑色素瘤发生发展相关的基因,如*CCND1*, *CDK4*, *SOX10*等。生长因子受体通路包含多个超进展相关基因,如*FGF19*, *FGF3*和*FGF4*据报道可能与免疫治疗后超进展现象的发生有关。MAPK通路变异主要表现在*BRAF*, *NF1*及*NRAS*热点基因突变。各个通路包含的基因及分布见图4。

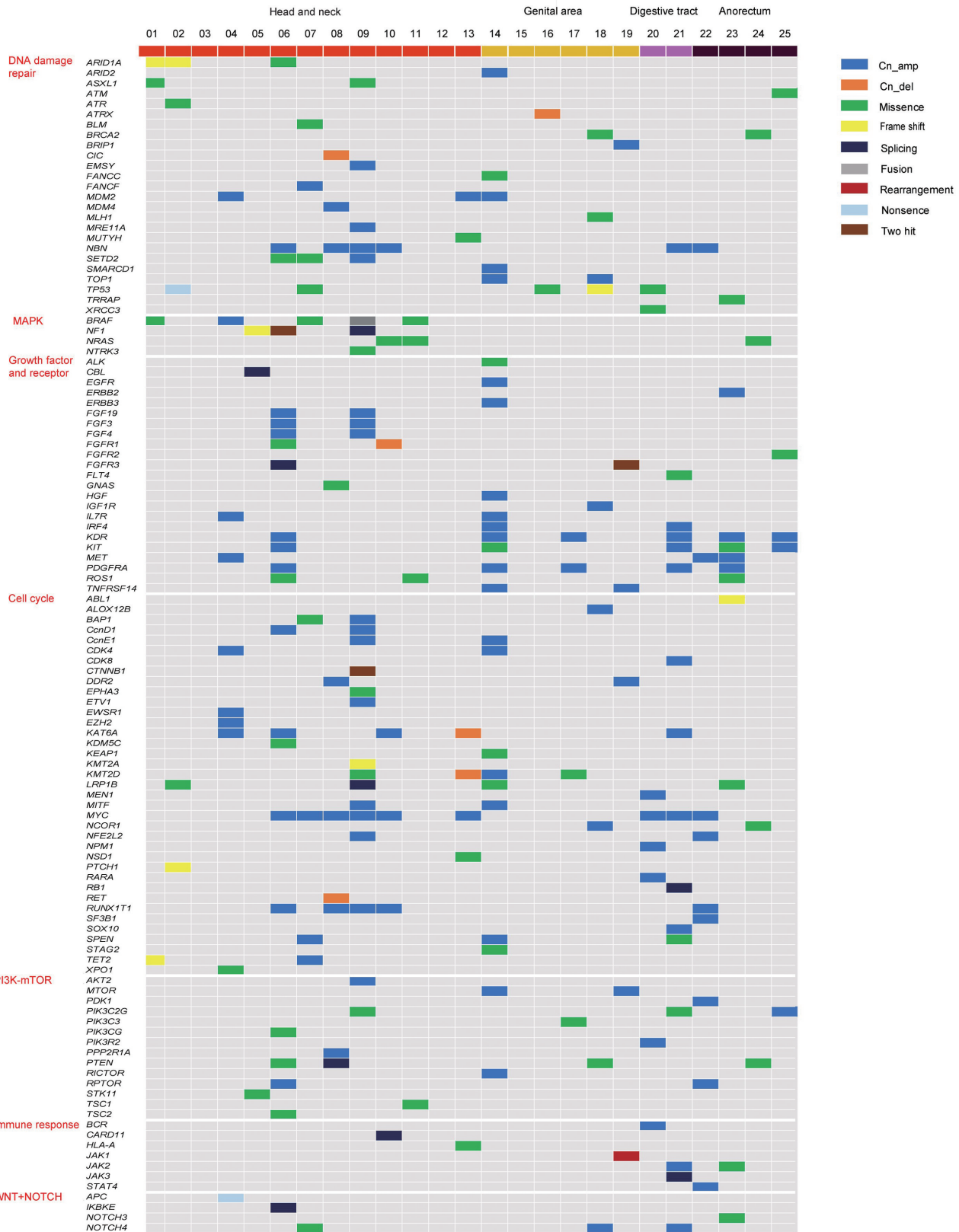
2.4 黏膜黑色素瘤患者的肿瘤突变负荷(Tumor mutation burden, TMB)及免疫相关基因突变情况

在25例黏膜黑色素瘤患者中,中位TMB为6.12(2.04~10)/Mb(图5)。免疫应答通路突变率为28%



At least one mutation occurred in 125 of the 295 genes. The variants included missense, splicing, copy number amplification and deletion, nonsense, gene rearrangement and fusion. Arranged by frequency.

图3 125个突变基因突变频率
Fig.3 Mutation frequency of 125 mutated genes

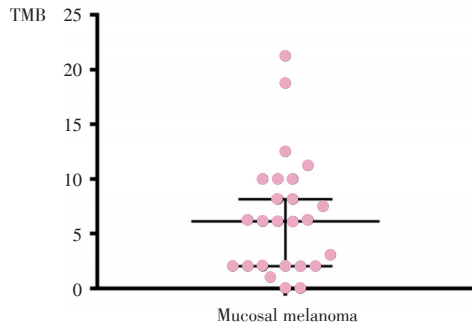


Mutated genes were divided into 7 main pathways based on their function, namely DNA damage pathway, MAPK pathway, Growth factors and receptors pathway, cell cycle pathway, PI3K-mTOR pathway, Immune response pathway, and WNT/NOTCH pathway, genes belong to other pathways did not conduct analysis. One gene aberration represents an aberration in the pathway the gene belongs to.

图4 7条主要信号通路的突变情况

Fig.4 Mutations in 7 main signal pathways

(7/25),我们观察到了与免疫治疗相关的 *JAK1/2*, *HLA-A* 基因的变异,突变频率分别为8%(2/25)和4%(1/25)。其他基因如 *BCR*, *CARD11*, *JAK3* 及 *STAT4* 也观察到4%(1/25)的突变(图4)。



The median TMB is 6.12(2.04-10)/Mb

图5 25例黏膜黑色素瘤病人的肿瘤突变负荷

Fig.5 TMB of our 25 mucosal melanoma patients

3 讨论

黏膜黑色素瘤整体发病率低,侵袭性强,发展到晚期缺乏有效的治疗选择,深入了解其基因突变谱,探索新的治疗方法迫在眉睫。我们首次运用NGS对中国黏膜黑色素瘤人群的基因突变谱进行了探索,并发现多个目前在中国黏膜黑色素瘤人群尚未见报道的基因突变。

首先,我们观察了25例黏膜黑色素瘤患者中黑色素瘤的主要驱动基因变异,并与西方黏膜黑色素瘤测序结果及我中心皮肤黑色素瘤数据进行对比。不同于西方人群测序结果,在我们的黏膜黑色素瘤病人中,*BRAF*突变频率较高,为20%(5/25),且突变率高于我中心总的黑色素瘤人群(20% vs. 16.3%),但低于皮肤黑色素瘤人群(20% vs. 27%)^[5],且均集中在头颈黏膜,其中2例为p.V600E突变,1例p.D94G突变,1例*KCTD15-BRAF*基因融合和1例基因拷贝数增加。*BRAF-V600*抑制剂可为p.V600E突变提供治疗选择,对于非*BRAF-V600*突变患者,已有研究表明FDA已批准的*BRAF-V600*抑制剂,如vemurafenib及dabrafenib对非*BRAF-V600*突变的患者无效,而其他*BRAF*抑制剂的有效性尚未可知,有待大规模临床试验进一步证实,广谱RAF抑制剂及MEK抑制剂可能会发挥疗效,也有待进一步证实^[6-7]。*KIT*基因突变率为20%(5/25),*NF1*基因突变频率为12%(3/25),均低于Hintzsche报道的西方人群的48%及37%,

且各黏膜类型突变频率均低于Hintzsche^[8]的报道,但*KIT*基因突变频率高于我们之前报道的总突变率5.8%,及皮肤型黑色素瘤的3%,也证实在中国黏膜黑色素瘤患者中,*KIT*或也属于主要驱动基因。*NRAS*基因突变频率为12%(3/25),位点分别为p.Q61R,p.G12V和p.G12D,均为热点突变,也高于我们此前报道的皮肤的7%,与总的10.5%类似^[5]。

随后,我们对黏膜黑色素瘤中各信号通路及基因的变化进行了观察。在我们的研究中,最常见的基因突变为*MYC*基因扩增,其次为*KDR*扩增。*MYC*基因家族及其产物可促进细胞增殖,永生,去分化和转化等,在多种肿瘤形成过程中发挥重要作用。已有体外实验证实*c-MYC*基因高表达与皮肤黑色素瘤侵袭性呈正相关,*MYC*抑制剂JQ1可有效抑制肿瘤生长^[9],并有报道表明*MYC*或可调控PD-L1表达,影响免疫治疗疗效^[10]。尽管*MYC*在黏膜黑色素瘤发生发展中的作用尚待研究,在存在有效抑制剂的情况下,*MYC*或可为黏膜黑色素瘤的治疗提供新的治疗靶点。*KDR*(*VEGFR-2*)是VEGF发挥促血管生成作用的主要功能性受体,具有明显趋化性和促分裂活性,是血管形成的主要调控因子,在维持肿瘤细胞生长过程中发挥重要作用^[11]。

在各信号相关通路变异中,DNA损伤修复通路变异率最高,为76%(19/25)。既往我们认为黏膜黑色素瘤发生部位隐匿,无日光损伤,此通路变异率低,然而我们的数据表明,在黏膜黑色素瘤病人中广泛存在DNA损伤修复通路变异,或许与慢性炎症介导的DNA损伤有关。*PARP*抑制剂被认为是*BRCA*胚系突变的有效治疗药物,在乳腺癌,卵巢癌及前列腺癌的治疗上发挥重要作用,最近有报道显示在非*BRCA*突变的肿瘤中,*PARP*抑制剂同样可以发挥作用,存在*ATM*,*ATR*,*EMSY*,*FANCI*,*RAD52*等其他DNA损伤修复相关通路突变的肿瘤或也可获益于*PARP*抑制剂^[12-14]。对于合并细胞周期及PI3K-mTOR相关通路变异的黑色素瘤,有学者此前在体内及体外实验中均证实CDK4/6抑制剂及PI3K-mTOR通路抑制剂可发挥疗效^[15-16]。生长因子受体通路上我们可见多个散发有可选靶向药物治疗的靶点,如*MET*,*PDGFRA*,*KDR*,*FLT4*,*ALK*,*ERBB3*及*ROS1*等。免疫应答相关通路中的基因突变,如*JAK1/2*,可能与免疫治疗继发耐药相关,对于合并此类基因突变的患者,联合治疗或许可

以使患者获益^[17]。

综上所述,在我们25例行NGS测序的黏膜黑色素瘤患者中,最常见的基因突变为*MYC*,*KDR*等基因扩增,DNA损伤修复,细胞周期,PI3K-mTOR

及生长因子受体通路广泛存在突变,且存在多个药物治疗靶点。黏膜黑色素瘤基因突变与其他类型黑色素瘤存在差异,NGS测序可为黏膜黑色素瘤的治疗提供潜在治疗靶点。

参考文献

- [1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] Chi Z, Li S, Sheng X, et al. Clinical presentation, histology, and prognoses of malignant melanoma in ethnic Chinese: a study of 522 consecutive cases [J]. *BMC Cancer*, 2011, 11: 85.
- [3] Kuk D, Shoushtari AN, Barker CA, et al. Prognosis of Mucosal, Uveal, Acral, Nonacral Cutaneous, and Unknown Primary Melanoma From the Time of First Metastasis [J]. *Oncologist*, 2016, 21(7): 848-854.
- [4] Wen X, Ding Y, Li J, et al. The experience of immune checkpoint inhibitors in Chinese patients with metastatic melanoma: a retrospective case series [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2017, 66(9): 1153-1162.
- [5] Zhou QM, Li W, Zhang X, et al. The mutation profiles of common oncogenes involved in melanoma in southern China [J]. *J Invest Dermatol*, 2012, 132(7): 1935-1937.
- [6] Dahlman KB, Xia J, Hutchinson K, et al. BRAF (L597) mutations in melanoma are associated with sensitivity to MEK inhibitors [J]. *Cancer Discov*, 2012, 2(9): 791-797.
- [7] Smalley KS, Xiao M, Villanueva J, et al. CRAF inhibition induces apoptosis in melanoma cells with non-V600E BRAF mutations [J]. *Oncogene*, 2009, 28(1): 85-94.
- [8] Hintzsche JD, Gorden NT, Amato CM, et al. Whole-exome sequencing identifies recurrent SF3B1 R625 mutation and comutation of NF1 and KIT in mucosal melanoma [J]. *Melanoma Res*, 2017, 27(3): 189-199.
- [9] Kfoury A, Armaro M, Collodet C, et al. AMPK promotes survival of c-Myc-positive melanoma cells by suppressing oxidative stress [J]. *EMBO J*, 2018, 37(5): e97673.
- [10] Wang Y, Wang H, Yao H, et al. Regulation of PD-L1: Emerging Routes for Targeting Tumor Immune Evasion [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 536.
- [11] Fine BA, Valente PT, Feinstein GI, et al. VEGF, flt-1, and KDR/flk-1 as prognostic indicators in endometrial carcinoma [J]. *Gynecol Oncol*, 2000, 76(1): 33-39.
- [12] Gelmon KA, Tischkowitz M, Mackay H, et al. Olaparib in patients with recurrent high-grade serous or poorly differentiated ovarian carcinoma or triple-negative breast cancer: a phase 2, multicentre, open-label, non-randomised study [J]. *Lancet Oncol*, 2011, 12(9): 852-861.
- [13] De P, Sun Y, Carlson JH, et al. Doubling down on the PI3K-AKT-mTOR pathway enhances the antitumor efficacy of PARP inhibitor in triple negative breast cancer model beyond BRCA-ness [J]. *Neoplasia*, 2014, 16(1): 43-72.
- [14] Gilardini Montani MS, Prodosmo A, Stagni V, et al. ATM-depletion in breast cancer cells confers sensitivity to PARP inhibition [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2013, 32: 95.
- [15] Wu X, Yu J, Yan J, et al. PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors inhibit the growth of melanoma cells with mTOR H2189Y mutations in vitro [J]. *Cancer Biol Ther*, 2018, 19(7): 584-589.
- [16] Kong Y, Sheng X, Wu X, et al. Frequent Genetic Aberrations in the CDK4 Pathway in Acral Melanoma Indicate the Potential for CDK4/6 Inhibitors in Targeted Therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(22): 6946-6957.
- [17] Zaretsky JM, Garcia-Diaz A, Shin DS, et al. Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma [J]. *N Engl J Med*, 2016, 375(9): 819-829.

(编辑 孙慧兰)