

循环肿瘤 DNA 在三阴性乳腺癌中的检测及其潜在应用价值

李 伟, 李文杰, 钱 诚

(哈尔滨医科大学附属肿瘤医院, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘 要:三阴性乳腺癌(TNBC)是一种复发率高、总生存率低的高侵袭性疾病。TNBC 具有高度异质性,且雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)及人类表皮生长因子受体 2(Her-2)均为阴性,决定了其临床预后较差。循环肿瘤 DNA(ctDNA)作为新型生物标志物,不仅可以监测 TNBC 的新辅助疗效与微小残留病灶,而且有助于早期发现转移性疾病,进而指导 TNBC 的个体化治疗,改善其临床预后。全文就 ctDNA 检测技术作一介绍,并重点阐述 ctDNA 在 TNBC 中的潜在应用价值。

关键词:循环肿瘤 DNA;三阴性乳腺癌;潜在应用价值

中图分类号:R737.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1671-170X(2019)01-0007-05

doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2019.01.B003

Detection and Potential Value of Circulating Tumor DNA in Triple-Negative Breast Cancer

LI Wei, LI Wen-jie, QIAN Cheng

(Harbin Medical University Cancer Hospital, Harbin 150086, China)

Abstract: Triple-negative breast cancer (TNBC) is a highly invasive disease with high recurrence rate and low overall survival rate. TNBC has high heterogeneity, and estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and human epidermal growth factor receptor 2 (Her-2) are all negative, which determine the poor clinical prognosis. Circulating tumor DNA(ctDNA) as a new biological marker, not only can indicate neoadjuvant curative effect and minimal residual disease, but can detect the early metastatic disease, which guides TNBC individualized treatment, and improves the clinical prognosis. This review briefly shows the detection technology of ctDNA, and highlights the potential value of ctDNA in TNBC.

Subject words: circulating tumor DNA; triple-negative breast cancer; potential value

乳腺癌是全球女性最常见的恶性肿瘤,其中三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)占15%~20%,表现为雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)及人类表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, Her-2)均为阴性^[1],其缺乏药物作用靶点,主要行化疗治疗。TNBC 具有较高的肿瘤侵袭性及异质性,容易发生内脏和脑部转移,临床预后较差。此外,一些特殊类型的乳腺癌如髓样癌、分泌性癌及腺样囊性癌均可呈现 TNBC 的表型^[2]。TNBC 中较常见的基因突变包括 BRCA 突变,约占 10%~20%^[3]; TP53 突变,约占 62%;PIK3CA 突变,约占 10%^[4],但

目前并未发现频发性的热点突变。因此,明确 TNBC 患者预测性生物标志物和靶向基因突变位点方面的进展是很有必要的。循环肿瘤 DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)可以通过非侵袭性途径识别肿瘤相关性分子变异,从而指导靶向治疗。本文将从定性的液态活检技术及定量的动态生物标志物检测两方面来阐述 ctDNA 在 TNBC 中的潜在应用价值,进而为 TNBC 的临床治疗提供新思路。

1 ctDNA 生物学与检测技术

1.1 ctDNA 生物学

组织穿刺活检受瘤内和瘤间异质性的影响很大,并不能真正反映一个患者全部的肿瘤生物学信息^[5]。在患者随访期间,及时调整治疗方案需要实时

通信作者:钱诚,副主任,博士生导师,博士;哈尔滨医科大学附属肿瘤医院乳腺外科,黑龙江省哈尔滨市南岗区哈平路 150 号(150086);E-mail:qiancheng@ems.hrbmu.edu.cn

收稿日期:2017-08-03

的分子表达谱,而在临床上连续的穿刺活检是不可行的。相比之下,非侵袭性的液体活检能够检测所有与肿瘤相关的基因突变,还可以系统地追踪基因突变,从而真正反映肿瘤的异质性^[6],而且在监测可控性肿瘤基因突变方面,液体活检比组织活检有更好的临床效益^[7]。

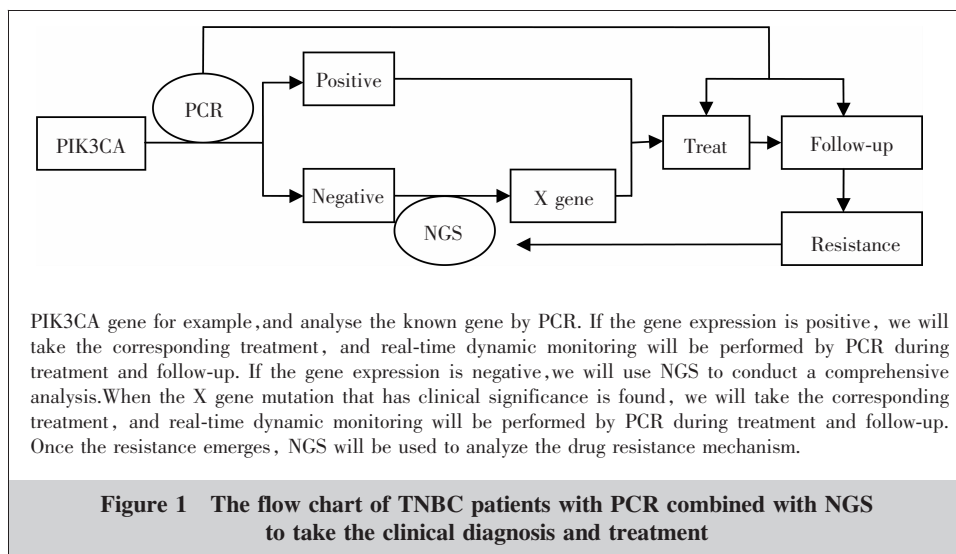
ctDNA 是由约 170 个碱基对组成的小分子片段,来源于坏死、凋亡的肿瘤细胞,或肿瘤细胞直接分泌的 DNA^[8],随后进入血液中。有研究表明,在乳腺癌、前列腺癌、胃癌等多种恶性肿瘤患者血浆中均能检测到 ctDNA^[9-11]。因此,通过 ctDNA 可以直接从患者血浆中检测肿瘤相关的遗传性变异,如点突变、拷贝数变异、染色体重排及甲基化模式的改变^[12]。ctDNA 半衰期较短,约 15 分钟到 2 小时,因此可作为动态生物标志物来实时精准检测肿瘤的变化^[13]。但是,ctDNA 仅占总循环 DNA 的 0.01%,且不同患者或同一患者的不同时间点,ctDNA 的数量与质量相差很大。因此,ctDNA 的检测技术是关键问题。基于 PCR 和 NGS 技术的各种分子生物学方法已经被发展应用于检测和量化不同肿瘤的 ctDNA。这些技术能把肿瘤源性 DNA 从野生型 DNA 中鉴别出来,并且能定量分析血浆中低含量 ctDNA。

1.2 ctDNA 检测技术

PCR 技术广泛用于检测不同恶性肿瘤的 ctDNA,检出率可达 0.001%^[6]。PCR 技术检测 ctDNA 的局限性在于被检测基因是已知的,而且检测多重性基因突变时可涵盖的基因数量有限。扩增阻碍突变系统聚合酶链反应(amplification refractory mutation system PCR, ARMS-PCR)可以从 80% 的乳腺癌患者肿瘤组织中检测到 PIK3CA 突变^[14]。使用个体化液滴数字 PCR(customized droplet digital PCR, ddPCR)对 19 例乳腺癌患者血浆的突变基因 TP53 和 PIK3CA 进行检测,并对多重随访时间点进行分析^[15]。在 82% 的患者血浆中可检测到灵

敏度高达 0.1% 的 ctDNA,随访期间 ctDNA 含量变化可能与肿瘤的治疗反应有关。

新一代测序技术(next-generation sequencing, NGS)能同时测序成千上万的 DNA,从而快速检出有基因突变的 ctDNA。在各种乳腺癌易感基因中, BRCA1/2、TP53 和 PTEN 属于非热点性突变,但外显率高^[16]。因此,NGS 技术检测大范围基因片段的遗传变异时,这些非热点性突变的研究很有意义。当检测已知的基因突变时,靶向测序比较合适;反之,当检测未知的基因突变时,全外显子组或全基因组测序更合适。标记扩增子深度测序(tagged-amplicon deep sequencing, Tam-Seq)有较高灵敏度,能检出总循环 DNA 中 1% 的 ctDNA 突变。但在非转移性乳腺癌中 ctDNA 含量极低, Tam-Seq 技术的检测灵敏度会受限。安全测序系统(safe-sequencing system, Safe-SeqS)能提高 ctDNA 检测的特异性和灵敏度^[17]。Murtaza 等^[18]通过用外显子测序技术证实了基因突变和治疗耐药性有关,该技术对发现可导致耐药机制的未知靶向突变有其独特之处。NGS 技术还未被应用于乳腺癌早期或微小残留病灶 ctDNA 拷贝数极低的样品检测,因为这类患者血浆 ctDNA 含量极低。相反,在转移性乳腺癌患者血浆中 ctDNA 含量很高, NGS 技术的应用较常见。借助 PCR 和 NGS 技术对 ctDNA 进行检测与量化将为 TNBC 的临床诊断与治疗提供多种潜在应用价值(Figure 1)。



2 早期 TNBC 的 ctDNA 检测

2.1 ctDNA 的检测特征

早期 TNBC 患者血浆中 ctDNA 含量较低,如果检测技术灵敏度不高,则不能检测到低浓度 ctDNA。因此,研究早期 TNBC 的分子变异时,固态穿刺活检可能更占优势。研究表明早期乳腺癌或许可以行 ctDNA 检测^[9]。实验者对 29 例术前患者血浆中 PIK3CA 的基因突变进行了检测,发现与肿瘤组织中筛查到的突变有高度一致性。在野生型 PIK3CA 的肿瘤标本中未检测到 PIK3CA 突变。该实验采用了 ddPCR 技术,灵敏度高达 93.3%,特异性为 100%,证实了早期乳腺癌患者血浆 ctDNA 检测的可行性。

2.2 新辅助疗效应答

新辅助治疗(neoadjuvant therapy,NAT)可使肿块缩小。然而,新辅助疗效应答的监测仍存在争议。影像学分辨率有限,很难观察到细微影像学改变。此外,NAT 肿瘤缩小后,组织活检也较难实施。不同于影像学和固态活检,评估血浆中的 ctDNA 或许能解决以上存在的问题。由于 ctDNA 在血浆中半衰期较短,在影像学发生改变之前,血浆中 ctDNA 含量已经发生变化。通过 ctDNA 还可以对肿瘤负荷进行实时监测,及时发现新出现的耐药性肿瘤克隆,从而指导临床及时调整治疗方案^[20,21]。NAT 期间 ctDNA 的含量可能很低,为了充分研究其临床应用价值,必须有高灵敏度的技术来检测血浆 ctDNA 的含量变化。一项 50 例经 NAT 后 TNBC 患者的研究^[22]中,分析其血浆 ctDNA 的频发突变基因 TP53。对穿刺活检组织行靶向 NGS 来识别突变基因,明确突变基因后,用 ddPCR 来监测血浆中的这种突变基因,以便动态监测肿瘤的发展变化。一项研究纳入 40 例 TP53 突变的早期非转移性 TNBC 患者,通过 ddPCR 检测发现新辅助化疗期间,ctDNA 水平升高与肿瘤进展有关,提示预后不良^[23]。因此,NAT 期间对 TNBC 患者血浆 ctDNA 的检测可及时了解肿瘤基因突变情况,动态监测肿瘤发展变化,预测 NAT 后 TNBC 患者的早期复发^[24]。

2.3 微小残留病灶监测

早期乳腺癌细胞可能会播散到骨髓或其他靶器官。因此,在无明显临床和影像学转移征象的乳腺癌患者中或许会存在微小残留病灶(minimal residual

disease,MRD),我们可以通过一些技术手段来监测 MRD 及其转移复发风险^[25]。播散在骨髓的肿瘤细胞可以通过细胞学技术来检测,其临床效益已得到证实。如果 TNBC 患者经手术完整切除了整个肿瘤,理论上我们希望在患者血浆中监测不到 ctDNA。Riva 等^[23]研究发现,TNBC 患者 NCT 期间,血浆 ctDNA 快速降低的患者在术后监测不到 MRD,提示较好生存;而 ctDNA 缓慢降低的患者大多与较差生存期相关。Beaver 等^[19]对 6 例术后仍可检测到 ctDNA 的患者进行研究,其中有 1 例 TNBC 患者经正规治疗 2 年后出现了脑肝肺的复发转移,又经过 2 个周期的辅助化疗后仍可在血浆中持续检测到 ctDNA。因此,ctDNA 可对术后 MRD 进行监测,还可以预测原发性乳腺癌术后早期复发,进而判断患者生存获益。

3 晚期 TNBC 的 ctDNA 检测

转移性 TNBC 患者血浆中 ctDNA 含量较高^[13,15],这促进了 ctDNA 在晚期 TNBC 中的潜在应用。

3.1 早期发现转移性疾病

早期发现转移可以改善 IV 期 TNBC 患者的预后。Olsson 等^[26]研究证实,早期乳腺癌经治疗后监测 ctDNA 有助于早期发现转移性肿瘤。通过 ddPCR 在患者血浆中检测到有基因突变的 ctDNA 比临床影像学首次发现转移的时间要早,换句话说,当影像学不能明确有无转移时,ctDNA 有助于转移复发的诊断,而且可以避免穿刺活检^[27]。因此,ctDNA 对于早期发现转移复发有潜在应用价值。

目前,转移性 TNBC 主要通过重复的影像学检查来诊断。血清动态标志物癌抗原 15-3(cancer antigen15-3,CA15-3)或 CA27-29 是目前用于监测转移性乳腺癌的蛋白标志物,但灵敏度仅为 60%~70%,其他血清标志物如 CEA 和 Cyfra21-1 在 IV 期乳腺癌中的灵敏度也不高^[18]。一项关于转移性 TNBC 患者 ctDNA 检出率和预后意义的研究^[28]中,以 TP53 突变作研究,在 84%组织样品中检测到了 TP53 突变,在患者血浆中 ctDNA TP53 突变检出率也高达 81%,提示 TP53 突变的 ctDNA 可能是 TNBC 患者的生物标志物。然而对于 ctDNA 的预后意义,研究认为 ctDNA 含量变化有很大的预后影响,且不同分型的乳腺癌其 ctDNA 的预后意义可能

不同。因此, TNBC 中 ctDNA 的预后意义还需依赖于高灵敏检测技术的检出率。

3.2 指导转移性疾病的个体化治疗

肿瘤发生发展过程中, 突变基因可以增加或丢失^[29,30]。非侵袭性的 ctDNA 分析不仅能够反映转移性肿瘤的基因组情况^[31,32], 还能检测影响疗效的分子变异, 并且可以在 TNBC 患者血浆中持续追踪。

近年来, 纤维母细胞生长因子(fibroblast growth factor receptor, FGFR)被认为是 TNBC 患者可能的药物作用靶点^[33]。FGFR 参与调节细胞生长、增殖、迁移和分化。FGFR 基因的点突变很罕见, 不到 1%, 而 FGFR1 和 FGFR2 的扩增在 TNBC 患者中相对常见, 可分别达到 9% 和 4%^[34]。Sharpe 等^[35]发现 FGFR2 抑制剂能够导致含 FGFR2 扩增的基底细胞样 TNBC 细胞系的生长减少。在使用 FGFR 抑制剂治疗过程中, 可以用 ctDNA 来检测 FGFR 的扩增趋势和耐药性。ERRB2 和 ERBB3 是致癌性突变, 但对多种 Her-2 抗体具有易感性^[36]。一项研究将曲妥珠单抗(Trastuzumab)与拉帕替尼(Lapatinib)用于有 ERBB3 突变的 IV 期乳腺癌患者, 2 周后可观察到药物已彻底代谢, 治疗 18 个月后患者一直保持无疾病征兆状态。基于 PCR 的 ctDNA 检测技术可以很容易识别这些点突变, 而这些点突变很可能是 TNBC 的关键靶点^[37]。检测血浆中各种遗传基因的变异有助于 TNBC 患者治疗方案的制定。

TNBC 由于 BRCA1/2 突变而缺乏 DNA 损伤修复机制, 聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(poly-ADP-ribose polymerase, PARP)抑制剂的使用为 TNBC 提供了很好的治疗前景。PARP 是一种在 DNA 修复机制中发挥作用的酶, PARP 抑制剂能够阻止 DNA 修复, 引起双链断裂。这种双链的断裂在正常情况下可以被 BRCA1/2 基因的同源重组修复, 但在 BRCA1/2 基因缺乏的 TNBC 中, 这种双链的断裂可以直接导致细胞死亡。PARP 抑制剂还能够增强肿瘤细胞对细胞毒性药物的敏感性。奥拉帕尼作为 PARP 抑制剂, 目前正处于 I/II 期试验的研究阶段, 用于治疗 BRCA1/2 基因突变的 TNBC, 就其疗效性、安全性和耐受性表现出了良好的效果。在 III 期试验中, BRCA1/2 基因突变的转移性 TNBC 经治疗后, 奥拉帕尼用于辅助治疗的获益将被评估^[38]。然而, 血浆中 BRCA1/2 突变的检测具有很大挑战性, 需要对超过 2000 种

突变基因进行敏感性的 NGS 测序分析^[39]。对于野生型 BRCA1/2 基因的大多数 TNBC 患者, 其体细胞 BRCA 基因失活, 导致同源重组缺陷(homologous recombination deficiency, HRD)。ctDNA 或许在识别预测性 HRD 生物标志物上有潜在价值。

4 结 语

TNBC 是一种典型的异质性疾病, 以高侵袭性、多转移性和缺乏药物作用靶点为特征。研究分子变异有助于改善患者预后, 但富有挑战性, 液体活检特别是 ctDNA 或许能够代替组织活检, 更好地检测 TNBC 患者的基因突变, 从而及时调整治疗方案, 使 TNBC 患者有更好的临床获益。但随时间变化 ctDNA 含量变化很大, 这就需要精确的分子技术来检测浓度可能很低的 ctDNA。数字 PCR 在乳腺癌各阶段检测 ctDNA 的精确度和灵敏度是毋庸置疑的, 但需要明确已知的靶向遗传基因突变。相反, NGS 技术高通量分析血浆 DNA 来筛查未知的遗传性基因突变, 也是一种不错的选择。在 ctDNA 检测应用于临床之前, 一些预分析因素如血液采集、样品储存环境、提取工艺及质量监控等的准确性、再现性、稳健性和对照性需要明确规范化。对 TNBC 患者 NAT 期间血浆 ctDNA 的监测可了解 NAT 后及术后 MRD 情况, 及时制定个性合理化的治疗方案。ctDNA 对 TNBC 的治疗有极大潜在应用价值, 药物作用靶点的增殖结合 ctDNA 的检测将使 TNBC 患者有更大获益, 但仍需大量的前瞻性研究来证实其临床有效性和实用性。

参考文献:

- [1] Cheuk IW, Shin VY, Kwong A. Detection of methylated circulating DNA as noninvasive biomarkers for breast cancer diagnosis[J]. *Breast Cancer*, 2017, 20(1): 12-19.
- [2] Del Castillo M, Chibon F, Arnould L, et al. Secretory breast carcinoma: a histopathologic and genomic spectrum characterized by a joint specific ETV6-NTRK3 gene fusion[J]. *Am J Surg Pathol*, 2015, 39(11): 1458-1467.
- [3] Wong-Brown MW, Meldrum CJ, Carpenter JE, et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 germline mutations in patients with triple-negative breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2015, 150(1): 71-80.
- [4] Shah SP, Roth A, Goya R, et al. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers[J]. *Nature*, 2012, 486(7403): 395-399.

- [5] Gerlinger M, McGranahan N, Dewhurst SM, et al. Cancer: evolution within a lifetime[J]. *Annu Rev Genet*, 2014, 48(48):215–236.
- [6] Saliou A, Bidard FC, Lantz O, et al. Circulating tumor DNA for triple-negative breast cancer diagnosis and treatment decisions[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2016, 16(1):39–50.
- [7] Lebofsky R, Decraene C, Bernard V, et al. Circulating tumor DNA as a non-invasive substitute to metastasis biopsy for tumor genotyping and personalized medicine in a prospective trial across all tumor types[J]. *Mol Oncol*, 2015, 9(4):783–790.
- [8] Benesova L, Belsanova B, Suchanek S, et al. Mutation-based detection and monitoring of cell-free tumor DNA in peripheral blood of cancer patients[J]. *Anal Biochem*, 2013, 433(2):227–234.
- [9] Garcia-Murillas I, Schiavon G, Weigelt B, et al. Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer[J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(302):302ra133.
- [10] Schütz E, Akbari MR, Beck J, et al. Chromosomal instability in cell-free DNA is a serum biomarker for prostate cancer[J]. *Clin Chem*, 2015, 61(1):239–248.
- [11] Hamakawa T, Kukita Y, Kurokawa Y, et al. Monitoring gastric cancer progression with circulating tumour DNA[J]. *Br J Cancer*, 2015, 112(2):352–356.
- [12] Zhang SH, Liu Y, Jiang ZF. The progression of tumor liquid biopsy and its applications in precision medicine[J]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*, 2017, 55(6):401–405. [张少华, 刘毅, 江泽飞. 肿瘤液体活检的进展及其在精准医疗中的应用[J]. *中华外科杂志*, 2017, 55(6):401–405.]
- [13] Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies[J]. *Transl Med*, 2014, 6(224):224ra24.
- [14] Board RE, Wardley AM, Dixon JM, et al. Detection of PIK3CA mutations in circulating free DNA in patients with breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2010, 120(2):461–467.
- [15] Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(13):1199–1209.
- [16] Easton DF, Pharoah PD, Antoniou AC, et al. Gene-panel sequencing and the prediction of breast-cancer risk[J]. *N Engl J Med*, 2015, 372(23):2243–2257.
- [17] Forte VA, Barrak DK, Elhodaky M, et al. The potential for liquid biopsies in the precision medical treatment of breast cancer[J]. *Cancer Biol Med*, 2016, 13(1):19–40.
- [18] Murtaza M, Dawson SJ, Tsui DW, et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA[J]. *Nature*, 2013, 497(7447):108–112.
- [19] Beaver JA, Jelovac D, Balukrishna S, et al. Detection of cancer DNA in plasma of patients with early-stage breast cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(10):2643–2650.
- [20] Diaz LA Jr, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA[J]. *J Clin Oncol*, 2014, 32(6):579–586.
- [21] Blair BG, Bardelli A, Park BH. Somatic alterations as the basis for resistance to targeted therapies[J]. *J Pathol*, 2014, 232(2):244–254.
- [22] Saliou A, Bidard FC, Lantz O. Circulating tumor DNA for triple-negative breast cancer diagnosis and treatment decisions[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2016, 16(1):39–50.
- [23] Riva F, Bidard FC, Houy A, et al. Patient-specific circulating tumor DNA detection during neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer [J]. *Clinical Chemistry*, 2017, 63(3):691.
- [24] Chen YH, Hancock BA, Solzak JP, et al. Next-generation sequencing of circulating tumor DNA to predict recurrence in triple-negative breast cancer patients with residual disease after neoadjuvant chemotherapy[J]. *NPJ Breast Cancer*, 2017, 3:24.
- [25] Harris LN, Ismaila N, McShane LM, et al. Use of biomarkers to guide decisions on adjuvant systemic therapy for women with early-stage invasive breast cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline[J]. *J Oncol Pract*, 2016, 12(4):384–389.
- [26] Olsson E, Winter C, George A, et al. Serial monitoring of circulating tumor DNA in patients with primary breast cancer for detection of occult metastatic disease[J]. *EMBO Mol Med*, 2015, 7(8):1034–1047.
- [27] Saliou A, Bidard FC, Lantz O, et al. Circulating tumor DNA for triple-negative breast cancer diagnosis and treatment decisions[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2016, 16(1):39–50.
- [28] Madic J, Kiialainen A, Bidard FC, et al. Circulating tumor DNA and circulating tumor cells in metastatic triple negative breast cancer patients[J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(9):2158–2165.
- [29] Eirew P, Steif A, Khattra J, et al. Dynamics of genomic clones in breast cancer patient xenografts at single-cell resolution[J]. *Nature*, 2015, 518(7539):422–426.
- [30] Zardavas D, Irrthum A, Swanton C, et al. Clinical management of breast cancer heterogeneity [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2015, 12(7):381–394.
- [31] De Mattos-Arruda L, Weigelt B, Cortes J, et al. Capturing intra-tumor genetic heterogeneity by de novo mutation profiling of circulating cell-free tumor DNA: a proof-of-principle[J]. *Ann Oncol*, 2014, 25(9):1729–1735.
- [32] Rothe F, Laes JF, Lambrechts D, et al. Plasma circulating tumor DNA as an alternative to metastatic biopsies for mutational analysis in breast cancer[J]. *Ann Oncol*, 2014, 25(10):1959–1965.
- [33] Lehmann BD, Pietersen JA. Identification and use of biomarkers in treatment strategies for triple-negative breast cancer subtypes[J]. *J Pathol*, 2014, 232(2):142–150.
- [34] Turner N, Lambros MB, Horlings HM, et al. Integrative molecular profiling of triple negative breast cancers identifies amplicon drivers and potential therapeutic targets[J]. *Oncogene*, 2010, 29(14):2013–2023.
- [35] Sharpe R, Pearson A, Herrera-Abreu MT, et al. FGFR signaling promotes the growth of triple-negative and basal-like breast cancer cell lines both in vitro and in vivo[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(16):5275–5286.
- [36] Bose R, Kavuri SM, Searleman AC, et al. Activating HER2 mutations in HER2 gene amplification negative breast cancer[J]. *Cancer Discov*, 2013, 3(2):224–237.
- [37] Bidard FC, Ng CK, Cottu P, et al. Response to dual HER2 blockade in a patient with HER3-mutant metastatic breast cancer[J]. *Ann Oncol*, 2015, 26(8):1704–1709.
- [38] Tutt A, Robson M, Garber JE, et al. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial[J]. *Lancet*, 2010, 376(9737):235–244.
- [39] Karami F, Mehdipour P. A comprehensive focus on global spectrum of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer[J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013(2):928562.