

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.01.019
网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190910.1631.020.html(2019-09-11)

NSCLC 罕见 EGFR 双突变继发 KRAS 突变 1 例报道并文献复习^{*}

房爱菊¹, 万玉刚², 戴宗燕¹, 程凤凤¹, 杨香山^{1△}
(1. 山东省立第三医院病理科, 济南 250031; 2. 中国重汽医院外科, 济南 250031)

[摘要] **目的** 探讨非小细胞肺癌(NSCLC)中表皮生长因子受体(EGFR)基因罕见双突变病例的临床病理学特征及治疗意义。**方法** 对 1 例 EGFR 基因罕见双突变,并在使用酪氨酸激酶抑制剂(TKI)后继发 KRAS 基因突变的肺腺癌病例进行回顾,同时进行相关文献复习,基因检测分别应用 ARMS-PCR、二代测序(NGS)及 Sanger 测序法。**结果** 患者因头部、右肩部、右季肋部、左臀部包块 3 个月就诊,穿刺活检示转移腺癌,考虑来自肺,1 年后左前臂发现新转移灶,活检 NGS 检测示 EGFR L858R 及 KRAS G12D 突变;对 3 次活检组织行 Sanger 测序发现 EGFR 基因均为 L858R 合并 R776H 双突变。**结论** EGFR L858R 合并 R776H 突变为罕见双突变,靶向治疗后获得性 KRAS 基因突变相关报道亦少见。

[关键词] 癌,非小细胞肺;受体,表皮生长因子;双突变;R776H 突变;K-ras 获得性突变

[中图法分类号] R734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2020)01-0088-05

Acquired KRAS mutation after rare double mutation of EGFR in NSCLC: 1 case report and literature review^{*}

FANG Aiju¹, WAN Yugang², DAI Zongyan¹, CHENG Fengfeng¹, YANG Xiangshan^{1△}

(1. Department of Pathology, Shandong Provincial Third Hospital, Jinan, Shandong 250031, China;
2. Department of Surgery, CNHTC Hospital, Jinan, Shandong 250031, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the clinicopathological features and therapeutic significance of rare double mutations of epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** A rare case of double mutation of EGFR in lung adenocarcinoma was retrospectively analyzed whose KRAS gene mutation was acquired after using tyrosine kinase inhibitor (TKI). The related literatures were reviewed. The gene mutations were detected using ARMS-PCR, next generation sequencing (NGS) and Sanger sequencing respectively. **Results** A 68-year-old female presented with multiple masses of head, right shoulder, right quarte rib and left hip for 3 months. Puncture biopsy showed metastatic adenocarcinoma from the lung. One year later, new metastases were found in the left forearm, EGFR L858R and KRAS G12D mutations were detected by using NGS from biopsy samples. At last, all the three biopsies were tested by Sanger sequencing, it was confirmed that L858R and R776H double mutations of EGFR gene were found in all of three samples. **Conclusion** EGFR L858R combined with R776H mutation is a rare double mutation in lung adenocarcinoma, also acquired mutation of KRAS gene after targeted therapy is rarely reported.

[Key words] carcinoma, non-small-cell lung; receptor, epidermal growth factor; double mutation; R776H mutation; K-ras acquired mutation

国家癌症中心最新一期的统计数据显示我国恶性肿瘤发病首位是肺癌^[1], 其在全球报告中同样显示位居男性恶性肿瘤第 1 位, 女性第 2 位^[2]。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)占肺癌的

^{*} 基金项目: 山东省重点研发计划(2018GSF121040)。 作者简介: 房爱菊(1976—), 主管技师, 硕士, 主要从事分子病理学研究。 △ 通信作者, E-mail: yangshan1998@163.com。

80%以上,亚洲 NSCLC 患者表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)突变发生率达 50%~60%^[3],主要集中在 18~21 外显子中,其中 19 外显子缺失和 21 单一外显子突变最常见,约占 EGFR 总突变的 90%。对于 EGFR 敏感突变的 IIIa 期及以上的患者,常规推荐酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor,TKI)治疗^[4]。但随着研究的深入,EGFR 双基因突变也有相应文献报道,但由于双突变的发生率极低,样本量小,EGFR 双突变患者的临床特征及对 EGFR-TKIs 治疗的敏感性仍未完全明确。本研究对 1 例罕见 EGFR 双突变病例的临床病理特征进行总结并进行相应的文献复习,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

患者女,68 岁,因 3 个月前发现头顶、右肩部、右季肋区、左臀部包块于 2016 年 12 月 14 日入院。专科检查头顶、右肩部、右季肋区、左臀部包块,1~3 cm 不等,无压痛及破溃,周围皮肤无红肿。CT 示:双肺多发结节灶,右下肺结节最大截面约 50 mm×47 mm,右侧胸腔积液。血液肿瘤标志物检测显示:癌胚抗原(CEA) 147.13 ng/mL、CA199 956.00 U/mL、CA125 67.43 U/mL、CA153 46.55 U/mL,头部包块活检病理诊断为“转移的腺癌,考虑来自肺”。第 1 天给予培美曲赛二钠 0.8 g、第 2~4 天顺铂 40 mg,4 个周期。2017 年 2 月 3 日复查血液肿瘤标志物显示 CEA 122.85 ng/mL、CA199 781.22 U/mL、CA125 73.49 U/mL、CA153 35.49 U/mL,较化疗前有所降低,但 CT 检查示右下肺病灶最大截面约 70 mm×50 mm,较之前相比病灶增大,病情进展。2017 年 3 月 24 日患者开始服用 EGFR-TKI 易瑞沙每日 1 片,2 个月后进行 CT 检查示右肺病灶最大截面 32 mm×39 mm,较前明显缩小。2018 年 6 月 21 日再次复查时血液肿瘤标志物 CEA 40.33 ng/mL,但患者左前臂出现包块,包块约 3 cm×2 cm,其他部位未见明显异常。遂行手术将包块部分切除,病理示转移性腺癌,考虑来自肺。同时右侧胸腔积液较前明显增多,给予多次胸腔穿刺引流,给予注射用重组人肿瘤坏死因子胸腔灌注治疗 3 次,胸腔积液逐渐减少并稳定。2018 年 8 月 27 日、2018 年 12 月 16 日、2019 年 2 月 26 日多次行 CT 检查示右肺病灶无明显变化。2019 年 2 月 25 日血液肿瘤标志物 CEA 46.84 ng/mL、CA199 241.60 U/mL、CA125 5.96 U/mL、CA153 116.74 U/mL,患者病情稳定,行相关检查未见明显转移及其他部位结节形成,无明显癌性疼痛。患者总体评价:目标病灶评价为部分缓解(partial response,PR),非

目标病灶评价为疾病稳定(stable disease,SD)。

1.2 方法

1.2.1 一般病理检查

标本经 10%中性缓冲福尔马林固定 24 h,常规取材脱水石蜡包埋,3 μ m 切片,行苏木素-伊红(HE)染色后显微镜下观察;免疫组织化学染色使用全自动免疫组织化学染色机(Roche Benchmark XT,瑞士罗氏公司),抗体 TTF-1、NapsinA、ER、CK20、CDX2 和免疫组织化学试剂盒 Ultra View Universal DAB Detection Kit (Ventana)均购自罗氏诊断产品(上海)有限公司。

1.2.2 分子病理学检测

DNA 提取使用德国凯杰公司的 QIAamp DNA FFPE Tissue 试剂盒,按试剂盒说明操作。EGFR 基因检测试剂盒 ARMS-PCR 法购自厦门艾德生物有限公司,操作过程按试剂盒说明,使用仪器为罗氏 LightCycler480 II 实时荧光定量 PCR 仪;Sanger 测序使用美国 ABI 公司 3500Dx 测序仪,引物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成,测序反应试剂购自 Thermo Fisher Scientific Batica UAB,部分试剂为本实验室自制试剂;二代测序(next generation sequencing,NGS)由安龙基因科技有限公司完成。

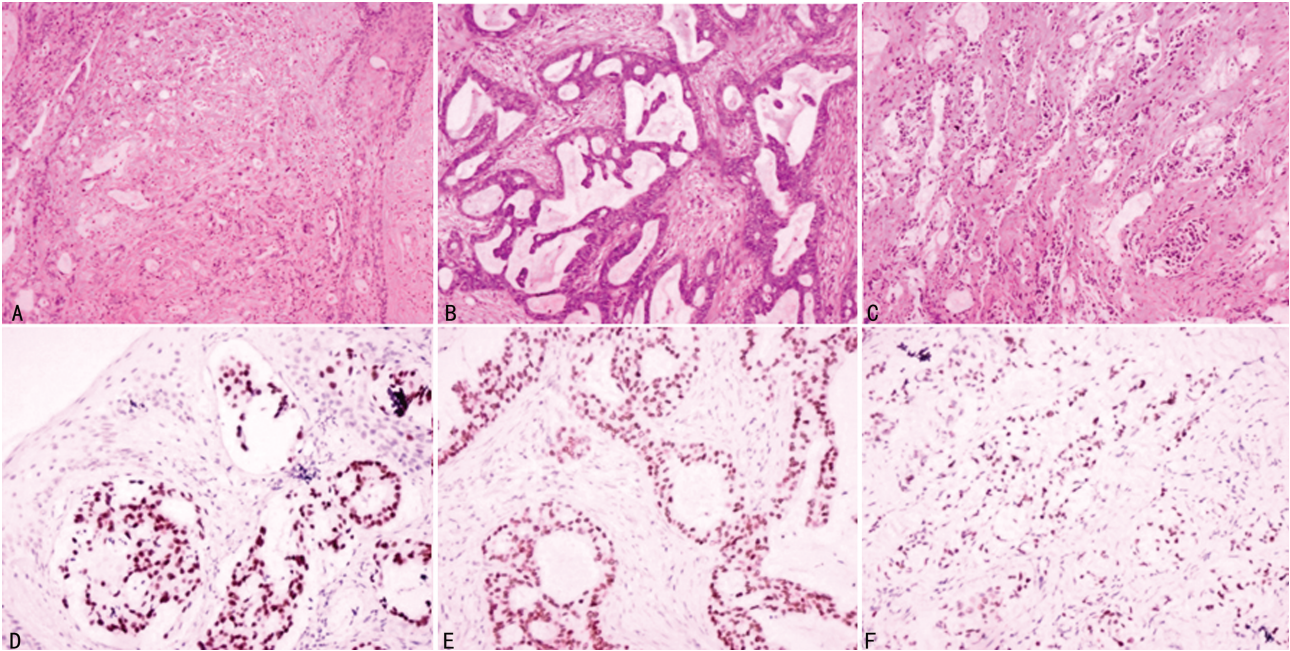
2 结果

2.1 病理诊断结果

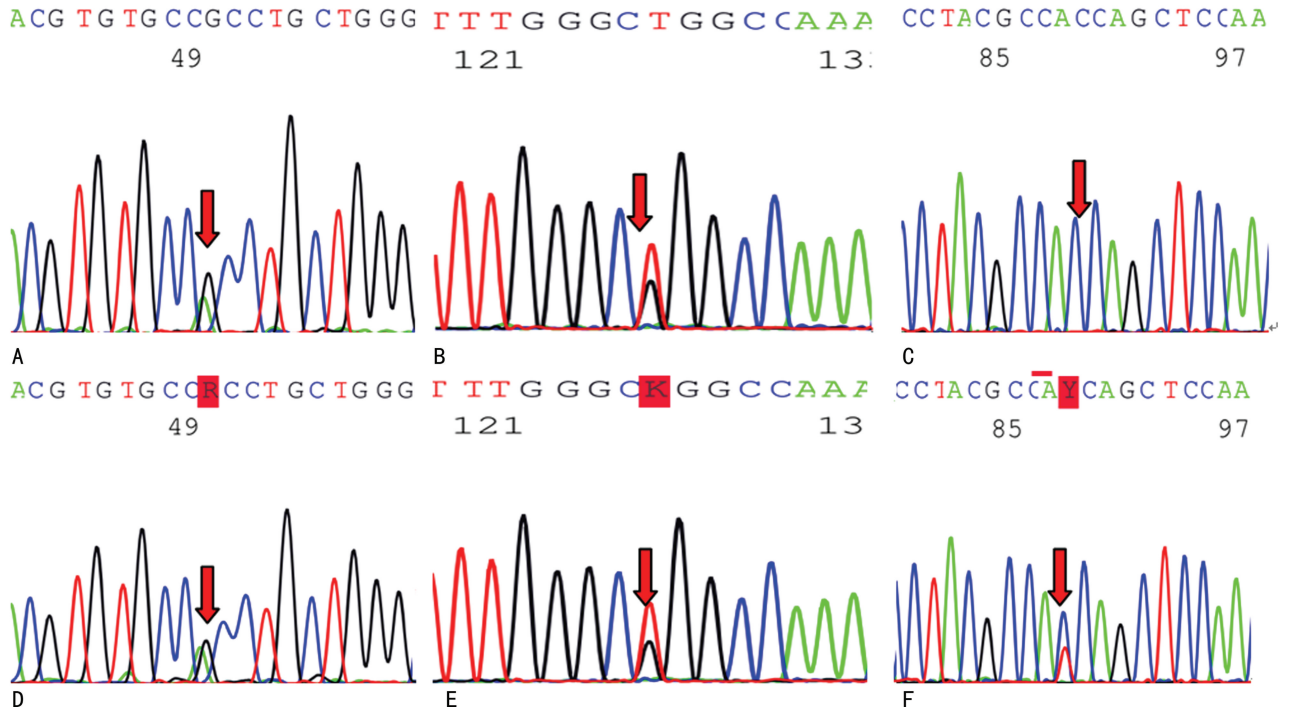
2016 年 12 月 7 日完整切除头部包块,HE 染色显微镜下可见纤维结缔组织中成片不规则腺管状结构,呈蟹爪样浸润性生长,细胞异型明显,细胞核体积增大,核质比明显增大,细胞核呈多形性并可见双核,考虑腺癌;免疫组织化学显示 TTF-1 和 NapsinA 均弥漫阳性,符合肺腺癌转移。左臀部、右肩部及右季肋部包块切除病理图像与头部包块相似,结果示转移的腺癌,结合免疫组织化学结果 TTF-1 和 NapsinA 均阳性,符合肺腺癌转移;2018 年 7 月患者服用易瑞沙 16 个月后发现左前臂质韧包块,约 3 cm×2 cm×2 cm,切除后行病理检查示转移性腺癌,结合病史及免疫组织化学结果 TTF-1 和 NapsinA 均阳性考虑为肺腺癌转移,见图 1。

2.2 基因检测结果

2016 年 12 月 22 日取头部包块石蜡包埋组织进行 EGFR 基因突变检测,结果显示 EGFR 基因第 21 外显子 L858R 突变。2018 年 7 月 6 日取左前臂包块石蜡包埋组织采用同种方法进行 EGFR 基因突变检测,结果显示 EGFR 基因第 21 外显子 L858R 突变。2018 年 9 月 18 日取左前臂包块石蜡包埋组织采用 NGS 行肺癌 13 个基因(包含 EGFR、KRAS、NRAS、ALK、ROS1、AKT1、BRAF、DDR2、FGFR1、HER2、



A:头部(HE,×20);B:右肩部(HE,×20);C:左前臂(HE,×20);D:头部(TTF-1,×20);E:右肩部(TTF-1,×20);F:左前臂(TTF-1,×20)。
图 1 患者头部、右肩部、左前臂包块病理图像



A:头部包块 EGFR 第 20 外显子测序结果;B:头部包块 EGFR 第 21 外显子测序结果;C:头部包块 KRAS 第 2 外显子测序结果;D:左前臂包块 EGFR 第 20 外显子测序结果;E:左前臂包块 EGFR 第 21 外显子测序结果;F:左前臂包块 KRAS 第 2 外显子测序结果。

图 2 活检组织测序结果

MAP2K1、MET、RET)检测,发现 EGFR 基因 L858R 突变及 KRAS 基因 G12 突变。2018 年 10 月 8 日对患者头部、右肩部、左前臂行 3 次活检,并对石蜡包埋组织行 EGFR 基因 18、19、20、21 外显子及 KRAS 基因 2、3、4 外显子 Sanger 测序检测,发现头部、右肩部及左前臂包块均存在 EGFR 基因第 20 外显子 R776H 和 21 外显子 L858R 双突变,并在左前臂包块中新检测出 KRAS 基因 2 外显子 G12D 突变,见图 2。

3 讨 论

目前 NSCLC 的治疗已进入精准医学时代,层出不穷的临床研究不断为其精准治疗增加循证医学证据,使得 NSCLC 治疗的获益人群更加精准,治疗方式更加合理。EGFR 基因是目前为止在东亚人群 NSCLC 患者中最常见的驱动基因,其突变位点集中

在 18、19、20、21 外显子,其中 19 外显子缺失突变和 21 外显子 L858R 突变为最常见突变位点,约占突变的 90%以上,针对 EGFR 基因突变的 TKI 已经发展到第 3 代,针对常见突变位点的耐药机制也有了深入的研究^[4-5]。

20 外显子插入突变在 EGFR 基因突变中约占 1%~4%,临床病理学特征与经典 EGFR 突变相似^[6]。根据 20 外显子氨基酸插入位置的不同分为两组:插入位于 aC-螺旋酪氨酸激酶结构域后(A767-C775)和插入 aC-螺旋中(E762-M766),前者为 EGFR-TKI 耐药突变,后者为 EGFR-TKI 敏感突变^[7]。有研究提出 R776H 突变通过改变 aC-螺旋构象增强 EGFR 活性,且 R776H 突变增加对二聚体的亲和力,从而维持 aC-螺旋构象^[8]。发生 R776H 突变的 NSCLC 患者对于 EGFR-TKI 的应用是敏感或是耐药,目前因病例太少缺乏数据。笔者通过搜索 COSMIC 数据库 2018.3 版本共查阅到相关文献 7 篇,并检索 PubMed 数据库共检索出相关病例 12 例^[9-17]。VAN 等^[9]在体外实验发现,R776H+G719A 和 R776H+G719S 双突变体对吉非替尼和厄洛替尼敏感。临床研究中,1 例 R776H+L861Q 突变患者,TKI 治疗后病情评估为病情稳定,无瘤生存期为 1.8 个月^[10],2 例 R776H+L858R 突变患者经 TKI 治疗后,病情评估为部分缓解,无瘤生存期为 16.0 个月^[11-12]。综上所述,结合本研究推断 R776H 突变可能为敏感突变。

EGFR 敏感的肺癌患者多数在接受第 1 代 EGFR-TKI 治疗 9~13 个月后产生获得性耐药,其分子机制包括继发 EGFR 基因 20 号外显子 T790M 突变、替代增殖信号通路的激活、c-Met 基因的扩增及病理类型的转化等^[18]。而 KRAS 基因是 NSCLC 中除 EGFR 基因之外的最常见的驱动基因,且普遍认为其与 EGFR 基因突变是互斥的,突变患者对 EGFR-TKI 原发耐药^[19]。已经完成的大样本量再活检组织队列研究中都未在继发耐药中检测到 KRAS 基因突变^[20-22]。通过文献检索的第 1 例 KRAS 获得性突变 EGFR 突变报道于 2016 年^[23],1 例 L858R 突变的患者在使用 EGFR-TKI 治疗进展后获取的组织中检测到了 KRAS 基因 G12S 突变。最近的一项研究也证实了 KRAS 基因突变为获得性 EGFR-TKI 耐药机制之一^[24],该研究发现在 EGFR-TKI 获得性耐药患者外周血循环 DNA 中检测出 KRAS 突变。笔者通过对患者进行 EGFR-TKI 治疗前、治疗中、进展后 3 次活检肿瘤组织进行检测,也证实了患者在 EGFR-TKI 治疗中出现 KRAS 基因获得性突变,新获得的 KRAS 基因突变使患者病情进展,出现新发病灶。

本研究报道的病例不仅存在 EGFR 基因 L858R

敏感突变,还合并罕见的 R776H 突变,且患者在应用 EGFR-TKI 15 个月后出现获得性 KRAS 基因的 G12D 突变,为临床罕见双突变的治疗及耐药机制的研究提供了完整临床资料。

参考文献

[1] 郑荣寿,孙可欣,张思维,等. 2015 年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志,2019,41(1):19-28.

[2] TORRE L A, SIEGEL R L, JEMAL A. Lung cancer statistics [J]. Adv Exp Med Biol, 2016, 893:1-19.

[3] SHIGEMATSU H,GAZDAR A F. Somatic mutations of epidermal growth factorreceptor signaling pathway in lung cancers[J]. Int J Cancer,2006,118(2):257-262.

[4] 岳东升,张华天. 非小细胞肺癌术后辅助治疗中国胸外科专家共识(2018 版)[J]. 中国肺癌杂志,2018,21(10):731-737.

[5] ZHANG Y C,ZHOU Q,WU Y L. Clinical management of third-generation EGFR inhibitor-resistant patients with advanced non-small cell lung cancer:current status and future perspectives[J]. Cancer Lett,2019,9(10):240-247.

[6] YASUDA H, KOBAYASHI S,COSTA D B. EGFR exon20 insertion mutations in un-small-cell lung cancer:preclinical data and clinical implications[J]. Lancet Oncol,2012,13(1):823-831.

[7] YASUDA H,PARK E,YUN C H,et al. Structural, biochemical, and clinical characterization of epidermal growth factor receptor (EGFR) exon 20 insertion mutations in lung cancer[J]. Sci Transl Med,2013,5(216):216ra177.

[8] RUAN Z,KANNAN N. Mechanistic insights into R776H mediated activation of epidermal growth factor receptor kinase [J]. Biochemistry,2015,54(27):4216-25.

[9] VAN N J,VAN W H,VAN T A,et al. Activating germline R776H mutation in the epidermal growth factor receptor associated with lung cancer with squamous differentiation[J]. J Clin Oncol,2013,31(10):e161-164.

[10] WU J Y,YU C J,CHANG Y C. Effectiveness of tyrosine kinase inhibitors on "uncommon" epidermal growth factor receptor mutations of

- unknown clinical significance in non-small cell lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(11): 3812-3821.
- [11] SEQUIST L V, JOSHI V A, JANNE P A, et al. Response to treatment and survival of patients with non-small cell lung cancer undergoing somatic EGFR mutation testing [J]. *Oncologist*, 2007, 12(1): 90-98.
- [12] KOSAKA T, YATABE Y, ENDOH H, et al. Analysis of epidermal growth factor receptor gene mutation in patients with non-small cell lung cancer and acquired resistance to gefitinib [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(19): 5764-5769.
- [13] LIM E H, ZHANG S L, LI J L. Using whole genome amplification (WGA) of low-volume biopsies to assess the prognostic role of EGFR, KRAS, p53, and CMET mutations in advanced-stage non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. *J Thorac Oncol*, 2009, 4(1): 12-21.
- [14] IMIELINSKI M, BERGER A H, HAMMERMAN P S, et al. Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing [J]. *Cell*, 2012, 150(6): 1107-1120.
- [15] ARCILA M E, NAFA K, CHAFE J E, et al. EGFR exon 20 insertion mutations in lung adenocarcinomas: prevalence, molecular heterogeneity, and clinicopathologic characteristics [J]. *Mol Cancer Ther*, 2013, 12(2): 220-229.
- [16] LIN M W, WU C T, SHIH J Y, et al. Clinicopathologic characteristics and prognostic significance of EGFR and p53 mutations in surgically resected lung adenocarcinomas ≤ 2 cm in maximal dimension [J]. *J Surg Oncol*, 2014, 110(2): 99-106.
- [17] PENG L, SONG Z G, JIAO S C. Efficacy analysis of tyrosine kinase inhibitors on rare non-small cell lung cancer patients harboring complex EGFR mutations [J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 6104.
- [18] 皮灿, 张一辰, 徐崇锐, 等. 表皮生长因子受体敏感突变阳性非小细胞肺癌耐药后的精准治疗 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2017, 39(2): 94-97.
- [19] BEAU F M, TEXIER M, BLONS H, et al. Clinical relevance of EGFR- or KRAS-mutated subclones in patients with advanced non-small-cell lung cancer receiving erlotinib in a French prospective cohort (IFCT ERMETIC2 Cohort-Part 2) [J]. *Clin Lung Cancer*, 2019, 20(3): 222-230.
- [20] YU H A, ARCILA M E, REKHTMAN N, et al. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(8): 2240-2247.
- [21] 王阿曼, 宁振, 刘基巍. 非小细胞肺癌 EGFR-TKI 耐药的分子机制及防治策略 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2017, 24(1): 71-78.
- [22] JI W, CHIO C M, RHO J K, et al. Mechanisms of acquired resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitor in Korean patients with lung cancer [J]. *BMC Cancer*, 2013, 13: 606.
- [23] BELCHIS D A, TSENG L H, GNIADK T, et al. Heterogeneity of resistance mutations detectable by next generation sequencing in TKI-treated lung adenocarcinoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(29): 45237-45248.
- [24] DEL R M, TISEO M, BORDI P, et al. Contribution of KRAS mutations and c. 2369C > T (p. T790M) EGFR to acquired resistance to EGFR-TKIs in EGFR mutant NSCLC: a study on circulating tumor DNA [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(8): 13611-13619.

(收稿日期: 2019-03-08 修回日期: 2019-05-20)