

甲状腺乳头状癌并 BRAF^{V600E} 突变及原癌基因 重排蛋白表达与其侵袭性的关系

孟超¹, 高洁², 梁军¹, 梁智勇², 林岩松³

¹青岛大学医学院附属医院肿瘤科, 青岛 266003

中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院 ²病理科 ³核医学科, 北京 100730

通信作者: 林岩松 电话: 010-69155610, 电子邮件: linyansong68@yahoo.com.cn

摘要: 目的 探讨 BRAF^{V600E} 突变及原癌基因重排 (RET) 蛋白表达并存与甲状腺乳头状癌 (PTC) 侵袭性的关系。方法 收集 50 例 PTC 患者术后病理, 分别用 RT-PCR 检测 BRAF^{V600E} 突变, 免疫组织化学 SP 法检测 RET 表达情况。分析 BRAF^{V600E} 突变合并 RET 表达组 ($n=24$) 和 BRAF^{V600E} 单突变或 RET 单表达组 ($n=19$) 的临床及病理特征。结果 BRAF^{V600E} 突变率、RET 表达率分别为 76% (38/50)、56% (28/50), 存在 BRAF^{V600E} 突变合并 RET 表达者占 48% (24/50)。与 BRAF^{V600E} 突变合并 RET 表达组比较, BRAF^{V600E} 单突变或 RET 单表达组肿瘤组织分化程度差, 且甲状腺癌评分系统评分较高 ($P=0.011$, $P=0.022$)。结论 BRAF^{V600E} 突变并存 RET 表达时提示 PTC 肿瘤组织分化差、更易出现实体亚型等侵袭性较高的病理亚型, 有可能增加肿瘤相关死亡风险。

关键词: BRAF^{V600E} 突变; 原癌基因重排蛋白表达; 甲状腺乳头状癌; 侵袭性

中图分类号: R736.1 文献标志码: A 文章编号: 1000-503X(2013)01-0064-05

DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.2013.01.012

Invasive Properties of Papillary Thyroid Cancer with Concurrent BRAF^{V600E} Mutation and Rearranged during Transfection Proto-oncogene Protein Expression

MENG Chao¹, GAO Jie², LIANG Jun¹, LIANG Zhi-yong², LIN Yan-song³

¹Department of Oncology, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, China

²Department of Pathology, ³Department of Nuclear Medicine, PUMC Hospital, CAMS and PUMC, Beijing 100730, China

Corresponding author: LIN Yan-song, Tel: 010-69155610, E-mail: linyansong68@yahoo.com.cn

ABSTRACT: Objective To investigate the aggressive properties of papillary thyroid cancer (PTC) with concurrent BRAF^{V600E} mutation and rearranged during transfection (RET) proto-oncogene protein expression. **Methods** Fifty pathologically confirmed PTC patients who had received thyroidectomy were enrolled in this study. BRAF^{V600E} mutation was detected by real time polymerase chain reaction (RT-PCR), while RET protein expression was measured by immunohistochemical SP method. Clinical and pathological features were compared between the concurrent BRAF^{V600E} mutation and RET protein expression group ($n=24$) and BRAF^{V600E} mutation or RET protein expression alone group ($n=19$). Seven patients were ruled out from the final analysis due to the absence of either BRAF^{V600E} mutation or RET protein expression. **Results** Of these 50

基金项目: 国家自然科学基金 (30970850) 和卫生行业科研专项项目 (201202012) Supported by the National Natural Sciences Foundation of China (30970850) and the Research Special Fund of the Health Industry (201202012); 第一、二位作者对本文贡献一致 The first two authors contributed equally to this article

patients, BRAF^{V600E} mutation and RET protein expression were detected in 38 patients (76%) and 28 patients (56%), respectively. Concurrent BRAF^{V600E} mutation and RET expression was detected in 24 patients (48%). Compared with the concurrent BRAF^{V600E} mutation and RET protein expression group, the BRAF^{V600E} mutation or RET protein expression alone group had relatively poorer tissue differentiation and higher prognostic score ($P=0.011$, $P=0.022$). **Conclusion** PTC patients with concurrent BRAF^{V600E} mutation and RET expression present poorer differentiation, more highly aggressive variant in carcinoma tissues, and higher cancer-related mortality risk.

Key words: BRAF^{V600E} mutation; tyrosine kinase receptor protein expression; papillary thyroid cancer; aggressiveness

Acta Acad Med Sin, 2013, 35(1): 64-68

甲状腺乳头状癌 (papillary thyroid cancer, PTC) 是甲状腺恶性肿瘤中最常见的一种类型, 发病率为 70%~80%^[1]。Xing 等^[2]对近 30 篇 PTC 相关基因突变文献分析后总结其 BRAF^{V600E} 突变率为 29%~83%, 即 15 外显子第 1799 位核苷酸 T 被 A 取代, 导致 600 密码子编码的缬氨酸被谷氨酸替代 (V600E)^[3-4], 与 PTC 的局部淋巴结及远处转移相关^[5-6]。原癌基因重排 (rearranged during transfection proto-oncogene, RET) 蛋白, 尤其是 RET/PTC 活化表达不仅是 PTC 的致病因素之一, 还与其局部侵袭性^[7]、预后及复发^[8]有关。目前国内外研究二者突变并存的文献较少, Musholt 等^[9]对可疑 PTC 患者的细针穿刺活检组织联合行 BRAF^{V600E}突变及 RET/PTC 检测, 有助于 PTC 术前诊断、恶性程度评估及优化手术方式。Henderson 等^[10]对 PTC 复发人群的研究结果提示二者双突变可能与 PTC 复发有关。在临床工作中 PTC 患者可同时出现 BRAF^{V600E}突变及 RET 表达, 有关 BRAF^{V600E}突变和 RET 表达并存与其侵袭性的关系, 目前报道较少。本研究拟对初诊 PTC 患者手术切除肿瘤组织行 BRAF、RET 检测, 旨在分析 BRAF^{V600E}突变和 RET 表达并存与 PTC 侵袭性之间的关系。

资料和方法

标本来源 选取北京协和医院 2011 年 11 月至 2012 年 2 月甲状腺全切除术后病理确诊为 PTC 并均无远处转移的 50 例患者, 男女比为 1:2.1, 平均年龄 (40.49±11.44) 岁。所有患者术后病理组织学切片均由 2 位高年资病理医师复查确认为 PTC, 其中 PTC 亚型包括滤泡亚型 9 例、实体亚型 10 例、淋巴上皮瘤样亚型及透明细胞型各 1 例 (因亚型罕见未行分析)。

RT-PCR 法检测 PTC 组织中 BRAF^{V600E} 突变

组织 DNA 提取: 严格按 QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50) (中美艾德 AmoyDX 公司) 说明书进行。紫外光光度计检测 DNA 纯度及浓度。

PCR 扩增: 取 cDNA 5 μl, 上下游引物各 35 μl, TaqDNA 聚合酶 0.4 μl 等, 加入 PCR 反应体系中扩增。反应条件: 95℃ 5 min 1 个循环; 95℃ 25 s, 64℃ 20 s, 72℃ 20 s 15 个循环; 93℃ 25 s, 60℃ 35 s, 72℃ 20 s 31 个循环。

PCR 产物分析: (1) 确定实验是否成功可信: 待测样品的内控内对照信号 (VIC 信号) 应升起。(2) 确认未选择校正荧光参照, 按管号顺序依次选择单一突变检测反应管进行检测分析。需要同时选择阳性质控品反应孔、无模板对照孔和样品反应孔, 然后根据实际情况调节阈值至目的基因 FAM 扩增曲线升起的拐点处, 得到突变组的 Ct 值, 即荧光达到阈值时候的 PCR 循环次数。若样本的 Ct 大于或等于 28, 则样本为阴性; 若样本的 Ct 小于 28, 则样本为阳性。

免疫组织化学法检测 RET 在 PTC 组织中的表达

标本经 4% 甲醛溶液固定, 常规石蜡包埋, 4 μm 厚连续切片, 分别行 HE 和免疫组织化学染色。采用免疫组织化学 SP 法 (免疫组织化学试剂购于丹麦 DAKO 公司, RET 鼠抗人单克隆抗体为即用型制剂), 具体操作步骤按试剂说明书进行, 以 1 mmol/L 的 EDTA pH 9.0 修复液进行高压锅抗原修复, DBS 溶液显色, 苏木精复染, 中性树胶封闭, 镜下观察。RET 阳性表达位于细胞浆, <5% 细胞着色为阴性, ≥5% 细胞着色为阳性。

统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件包进行。计数资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计量资料以率表示, 采用 t 检验, χ^2 检验和 Fisher 精确概率检验分析两组间数据差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

PTC 肿瘤组织 BRAF^{V600E} 突变、RET 表达情况

76% (38/50) 患者检测到 BRAF^{V600E} 突变; 56% (28/50) 患者癌组织中检测出 RET 表达, 2 例患者癌旁正常组织中检测出 RET 蛋白表达 (合并桥本氏甲状腺炎和结节性甲状腺肿者各 1 例); 48% (24/50) 患者同时存在 BRAF^{V600E} 突变及 RET 表达, 19 例患者为 BRAF^{V600E} 单突变或 RET 单表达, 7 例患者既不存

在 BRAF^{V600E} 突变也无 RET 表达 (统计数据时已将其剔除)。

临床病理特征 BRAF^{V600E} 突变和 RET 表达并存组 (G1 组) 患者肿瘤组织呈中分化者明显高于二者单表达组 (G2 组) ($P=0.011$); G1 组患者实体亚型者明显高于 G2 组 ($P=0.020$); 甲状腺乳头状癌评分系统 (MACIS 评分) 高于 G2 组 ($P=0.022$)。G1 组中患者肿瘤侵出甲状腺包膜与周围组织黏连例数明显高于 G2 组 ($P=0.036$) (表 1、图 1)。

表 1 两组患者临床病理资料比较

Table 1 Comparison of the clinical and pathological characteristics of two groups

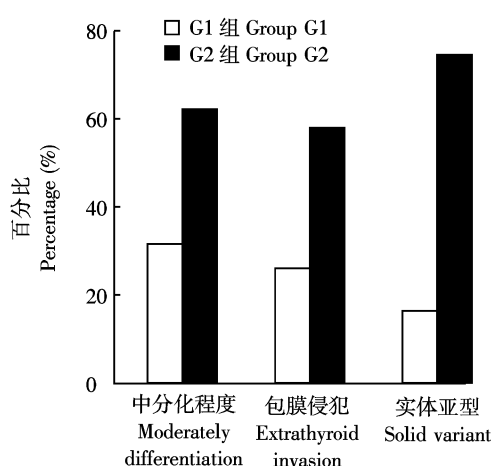
分组 Group	n	病程 Course of diseases ($\bar{x} \pm s$, months)	MACIS 评分 MACIS score ($\bar{x} \pm s$)	性别 Sex (n)		淋巴结转移 Lymph node metastasis (n)			
				男 Male	女 Female	N0	N1a	N1b	Nx
G1 组 Group G1	24	13.16 ± 25.36	4.74 ± 0.94	6	18	8	10	6	0
G2 组 Group G2	19	16.41 ± 29.89	4.10 ± 0.82	7	12	4	9	5	1
t/χ^2 值 t/χ^2 value		0.386	2.391		0.705				2.306
P 值 P value		0.702	0.022		0.401				0.511

分组 Group	n	原发肿瘤分期 Primary tumor staging (n)			远处转移 Distant metastasis staging (n)		病灶 Lesion (n)		
		T1	T2	T4	M0	M1	单叶病灶 Unifocal lesion of single leaf	单叶多发病灶 Multifocal lesion of single leaf	双叶病灶 Double leaf lesions
G1 组 Group G1	24	7	3	14	24	19	13	3	8
G2 组 Group G2	19	11	2	6	0	0	7	5	7
t/χ^2 值 t/χ^2 value			3.806		—			1.810	
P 值 P value			0.149		—			0.405	

分组 Group	n	合并疾病 Complication (n)			TNM 分期 TNM staging (n)		包膜侵犯 Extrathyroid invasion (n)	
		无 None	桥本氏甲状腺炎 Hashimoto's thyroiditis	结节性甲状腺肿 Nodular goiter	I ~ II	III ~ IV	是 Yse	否 No
G1 组 Group G1	24	7	7	10	14	16	14	10
G2 组 Group G2	19	9	3	7	10	3	5	14
t/χ^2 值 t/χ^2 value				1.823		3.367		4.408
P 值 P value				0.402		0.067		0.036

分组 Group	n	病理亚型 Pathological subtypes (n)		分化程度 Differentiation (n)		
		实体亚型 Solid variant	滤泡型 Follicular variant	n	高分化 Highly differentiated	中分化 Moderately differentiated
G1 组 Group G1	12	9	3	24	9	15
G2 组 Group G2	6	1	5	19	13	6
t/χ^2 值 t/χ^2 value			5.828			4.058
P 值 P value			0.016			0.044

G1 组: BRAF^{V600E} 突变合并 RET 表达组; G2 组: BRAF^{V600E} 单突变或 RET 单表达组; RET: 原癌基因重排; Nx: 未被评估的局部结节
Group G1: concurrent BRAF^{V600E} and RET protein expression; Group G2: only one of BRAF^{V600E} mutation and RET protein expression; RET: rearranged during transfection proto-oncogene; Nx: regional nodes cannot be assessed



G1 组: BRAF^{V600E} 突变合并 RET 表达组; G2 组: BRAF^{V600E} 单突变或 RET 单表达组

GroupG1: concurrent BRAF^{V600E} and RET protein expression; GroupG2: only one of BRAF^{V600E} mutation and RET protein expression

图 1 两组患者肿瘤组织实体亚型、中分化程度及包膜侵犯发生率

Fig 1 Percentages of solid variant, moderately differentiation and extrathyroid invasion in two groups

讨 论

PTC 是甲状腺恶性肿瘤中最常见的类型^[1], 经甲状腺全切或次全切除术辅以选择性¹³¹I 治疗及甲状腺激素抑制治疗后, 大多数患者预后较好, 但仍约 30% 复发率^[11]。包膜侵犯、颈部淋巴结转移可使 PTC 肿瘤组织侵袭性增强, 导致患者 10 年生存率下降^[12]。研究显示 PTC 患者 BRAF^{V600E} 突变率为 29% ~ 83%^[2], RET/PTC 重排发生率为 17% ~ 44%^[13]。二者均与 PTC 患者局部侵袭性、预后及复发相关^[5-8,14]。有关 BRAF^{V600E} 突变合并 RET 表达对 PTC 侵袭性影响的报道较少, Musholt 等^[9]证实联合检测 BRAF^{V600E} 突变及 RET/PTC 异常表达有助于 PTC 术前细针穿刺活检组织诊断、恶性程度评估及优化手术方式; 针对复发性 PTC 的研究显示 BRAF^{V600E} 突变和 RET/PTC 重排可能与 PTC 复发及恶性程度有关^[10]。本研究首次观察了 PTC 患者初次手术病理 BRAF^{V600E} 突变并存 RET 表达与 PTC 侵袭性的关系, 结果显示 BRAF^{V600E} 突变和 RET 表达并存组 (G1 组) 患者包膜外侵犯率明显高于单一突变或表达组 (G2 组), 提示两者并存时肿瘤组织的侵袭性更高。

PTC 患者肿瘤组织的侵袭性与其分化程度及病

理亚型类型有关。RET 原癌基因高表达, RAS/BRAF/MAPK 信号通路持续激活被认为是 PTC 发病的主要分子机制之一, 影响 PTC 肿瘤组织的分化程度及亚型^[15]。Kakudo 等^[16]研究提示中分化甲状腺癌患者 10 年生存率较经典型甲状腺癌者下降约 20%, 提示其预后较差。实体亚型是 PTC 病理特殊组织学亚型, 属于侵袭性强、预后差的类型, 其患者颈部淋巴结及远处转移率、复发率高^[16-18]。本研究 G1 组 PTC 患者肿瘤组织呈中分化者明显高于 G2 组, 同时实体亚型者明显高于 G2 组, 提示 BRAF^{V600E} 突变和 RET 表达并存时使 PTC 肿瘤组织分化程度降低、更易出现实体亚型等侵袭性较高的病理亚型。

MACIS 评分主要依据患者年龄、原发肿瘤直径、局部侵犯情况、是否完全切除及远处转移进行计算。有报道 MACIS 评分 > 6 时可作为 PTC 患者死亡率的预测指标之一, 其分值高, 提示 PTC 患者肿瘤组织的侵袭性增强, 生存率降低^[19]。本研究 G1 组 PTC 患者 MACIS 评分较 G2 组高, 分析其原因主要与本组患者包膜侵犯率较高有关, 提示 BRAF^{V600E} 突变和 RET 表达并存时, 患者肿瘤组织侵袭性增高, 增加了肿瘤相关死亡风险。

将 G2 组进一步分为两个亚组, 即 BRAF^{V600E} 突变或 RET 单表达组, 两组患者病理资料差异无统计学意义, 可能与患者病例数较少有关, 在今后研究中将增加病例数继续对其进行进一步观察。

综上, PTC 患者初次术后病理 BRAF^{V600E} 突变和 RET 表达并存时与肿瘤组织的侵袭性明显相关, 使其具有更高包膜侵犯率, 导致分化程度变差且更易出现实体亚型等侵袭性较高的病理亚型, 有可能增加肿瘤相关死亡风险。

参 考 文 献

- [1] Ain KB. Papillary thyroid carcinoma. Etiology, assessment, and therapy [J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 1995, 24(4):711-760.
- [2] Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2005, 12(2):245-262.
- [3] Wellbrock C, Karasarides M, Marais R. The RAF proteins take centre stage [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5(11):875-885.
- [4] Wojciechowska K, Lewinski A. BRAF mutations in papillary thyroid carcinoma [J]. *Endocr Regul*, 2006, 40(4):129-138.

- [5] Kim TH, Park YJ, Lim JA, et al. The association of the BRAF (V600E) mutation with prognostic factors and poor clinical outcome in papillary thyroid cancer: a meta-analysis [J]. *Cancer*, 2012, 118(7):1764-1773.
- [6] Kebebew E, Weng J, Bauer J, et al. The prevalence and prognostic value of BRAF mutation in thyroid cancer [J]. *Ann Surg*, 2007, 246(3):466-470.
- [7] Wang YL, Zhang RW, Luo ZW, et al. High frequency of level II-V lymph node involvement in RET/PTC positive papillary thyroid carcinoma [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2008, 34(1):77-781.
- [8] Kogan EA, Rozhkova EB, Seredin VP, et al. Prognostic value of the expression of thyroglobulin and oncomarkers (p53, EGFR, ret-oncogene) in different types of papillary carcinoma of the thyroid: clinicomorphological and immunohistochemical studies [J]. *Arkh Patol*, 2006, 68(4):8-11.
- [9] Musholt TJ, Fottner C, Weber MM, et al. Detection of papillary thyroid carcinoma by analysis of BRAF and RET/PTC1 mutations in fine-needle aspiration biopsies of thyroid nodules [J]. *World J Surg*, 2010, 34(11):2595-2603.
- [10] Henderson YC, Shellenberger TD, Williams MD, et al. High rate of BRAF and RET/PTC dual mutation associated with recurrent papillary thyroid carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(2):485-491.
- [11] Tuttle RM, Leboeuf R. Follow up approaches in thyroid cancer: a risk adapted paradigm [J]. *Endocrinol Metab Clin N Am*, 2008, 37(2):419-435.
- [12] Hamzany Y, Soudry E, Strenov Y. et al. Early death from papillary thyroid carcinoma [J]. *Am J Otolaryngol*, 2012, 33(1):104-108.
- [13] Zhu Z, Ciampi R, Nikiforova MN, et al. Prevalence of RET/PTC rearrangements in thyroid papillary carcinomas: effects of the detection methods and genetic heterogeneity [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, 91(9):3603-3610.
- [14] Zafón C, Castellví J, Obiols G. Usefulness of the immunohistochemical analysis of several molecular markers in the characterization of papillary thyroid carcinoma with initial lymph node metastasis [J]. *Endocrinol Nutr*, 2010, 57(4):165-169.
- [15] Tang KT, Lee CH. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma: pathogenic role and clinical implications [J]. *J Chin Med Assoc*, 2010, 73(3):113-128.
- [16] Kakudo K, Bai YH, Katayama S. et al. Classification of follicular cell tumors of the thyroid gland: analysis involving Japanese patients from one institute [J]. *Pathol Int*, 2009, 59(6):359-367.
- [17] Nikiforov YE, Erickson LA, Nikiforova MN, et al. Solid variant of papillary thyroid carcinoma: incidence, clinical-pathologic characteristics, molecular analysis, and biologic behavior [J]. *Am J Surg Pathol*, 2001, 25(12):1478-1484.
- [18] Silver CE, Owen RP, Rodrigo JP, et al. Aggressive variants of papillary thyroid carcinoma [J]. *Head Neck*, 2011, 33(7):1052-1059.
- [19] Holler T, Theriault J, Payne RJ, et al. Prognostic factors in patients with multiple recurrences of well-differentiated thyroid carcinoma [J]. *J Oncol*, 2009, doi: 10.1155/2009/650340.

(收稿日期: 2012-04-25)