

内蒙古地区甲状腺乳头状癌中 BRAF V600E 基因的表达及意义

肖丽丽¹, 张 瑞^{2*}

(1. 内蒙古医科大学, 内蒙古 呼和浩特 010059; 2. 内蒙古医科大学附属医院 甲乳外科, 内蒙古 呼和浩特 010050)

【摘要】目的 测定内蒙古地区汉族与蒙古族甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)患者 BRAF V600E 突变率及分布情况, 进而评估基因突变与临床病理特征的关系。**方法** 从内蒙古医科大学附属医院甲乳外科及病理科收集2017年1月至2019年12月行手术治疗的20例汉族与40例蒙古族甲状腺乳头状癌患者的临床资料及存档石蜡组织进行基因检测及分析。**结果** 蒙古族PTC患者 BRAF V600E 突变率显著高于汉族患者, 组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。蒙古族 BRAF V600E 突变与 PTC 患者是否合并桥本、淋巴结转移及被膜侵犯有关, 而与年龄、性别、肿瘤直径、病灶数目、有无钙化无关。**结论** 内蒙古地区蒙古族与汉族 BRAF V600E 突变率不同, 蒙古族患者 BRAF V600E 突变与 PTC 患者是否合并桥本、淋巴结转移及被膜侵犯有关, 这些发现可为 PTC 患者手术方案的制订及预后评估提供参考。

【关键词】 甲状腺乳头状癌; BRAF V600E 基因突变; 蒙古族; 汉族

中图分类号: R475

文献标识码: B

文章编号: 2095-512X(2022)03-0288-04

甲状腺癌是内分泌系统中最为常见的恶性肿瘤, 其中甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)又是甲状腺癌中最常见的亚型^[1]。随着人们的健康意识及诊疗水平的提高, PTC的发病率也呈现出明显上升趋势。虽然 PTC 的生物学行为温和, 且患者预后良好, 但也具有一定的侵袭与复发倾向, 影响患者的生存质量。因此, PTC 的诊疗方法成了近年来研究的重点内容。BRAF V600E 突变是 PTC 最常见的分子标志物, 有助于 PTC 患者的诊断和预后评估。BRAF 突变激活有丝分裂活化蛋白激酶(MAPK)通路, 导致细胞增殖、去分化和凋亡的增加, 其中 T1799A 点突变最为常见, 使密码子 600 上的缬氨酸被谷氨酸替代(V600E)。BRAF V600E 突变在不同人群中有所差异。研究表明, 不同国家、不同地区 PTC 患者 BRAF V600E 突变情况是有差别的, 而 BRAF V600E 突变情况在内蒙古地区汉族和蒙古族人群中尚未被明确研究^[2]。因此, 本研究主要评估内蒙古地区汉族与蒙古族 BRAF V600E 基因突变情况。

1 材料与方法

1.1 样本收集

从内蒙古医科大学附属医院甲乳外科及病理

科收集2017年1月至2019年12月行手术治疗的20例汉族与40例蒙古族甲状腺乳头状癌患者的临床资料及存档石蜡组织进行基因检测及分析。病例纳入标准:(1)蒙古族患者的三代及三代以上均为纯蒙古族, 汉族患者的三代及三代以上均为纯汉族;(2)所有 PTC 患者的标本均经两名高年资病理医师再次读片证实;(3)所有 PTC 患者均未合并其他良、恶性肿瘤。60例原发 PTC 患者组织标本均于术中切取制作。所有组织样本都经过福尔马林浸泡, 石蜡包埋。60例 PTC 患者中, 8例男性汉族患者, 12例女性汉族患者; 22例男性蒙古族患者, 18例女性蒙古族患者。从患者病历中收集以下临床信息: 年龄(<45岁或≥45岁), 性别, 肿瘤直径(cm), 是否合并桥本, 病灶数(单发或多发), 有无钙化, 有无淋巴结转移, 以及是否有被膜外侵犯。

1.2 BRAF V600E 基因测定及结果判断

1.2.1 脱蜡 取适量石蜡样本到1.5 mL离心管中, 加入1 mL脱蜡剂, 涡旋振荡, 放入金属浴56℃ 2 min; 放入离心机14000 rpm离心2 min; 弃掉废液, 加入1 mL无水乙醇, 涡旋振荡。放入离心机14000 rpm离心2 min; 弃掉废液, 晾干。

1.2.2 DNA 提取 (QIAGEN FFPE 提取试剂盒) 加入180 μL ATL裂解液, 20 μL蛋白酶K, 涡旋振荡,

收稿日期: 2022-02-05; 修回日期: 2022-04-12

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金项目(NJZY18102)

第一作者: 肖丽丽(1996-), 女, 2020级在读硕士研究生。E-mail: 2721483385@qq.com

*通信作者: 张瑞, 男, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师。研究方向: 甲状腺和甲乳外科。E-mail: zhangrui999999@163.com

放入金属浴 56 °C 1~3 h, 结束后转到金属浴 90 °C 1 h; 加入 200 μ L AL, 涡旋振荡, 短暂离心; 加入 200 μ L 无水乙醇, 涡旋振荡, 短暂离心; 将液体全部转移到 QIAamp MinElute Column 吸附柱中, 放入离心机 13000 rpm 离心 1 min; 弃掉废液, 吸附柱中加入 500 μ L AW1 洗液(使用前确认已加入无水乙醇), 放入离心机 13000 rpm 离心 1 min; 弃掉废液, 吸附柱中加入 500 μ L AW2 洗液(使用前确认已加入无水乙醇), 放入离心机 13000 rpm 离心 1 min; 将吸附柱放入新的套管, 放入离心机 13000 rpm 离心 2 min; 将吸附柱放入 1.5 mL 离心管中开盖晾干 2 min; 加入 50 μ L ATE 洗脱液, 室温放置 2 min, 放入离心机 13000 rpm 离心 1 min, 收集 DNA 待测浓度。

1.2.3 DNA 浓度测定(YEASEN Qubit dsDNA) 荧光染料与 dsDNA Buffer 试剂配比 1:199; 分装 199 μ L 到 200 μ L EP 管中, 加入 1 μ L 待测 DNA; 选用 Qubit3.0 仪器测定 DNA 浓度; NanoDrop 测定 OD260/OD280 在 1.8~2.0 之间。

1.2.4 基因突变检测(鑫诺美迪 B-raf 基因 V600E 突变检测试剂盒(PCR-荧光探针法)) 将 DNA 稀释浓度至 10 ng/ μ L; 每个样本两个反应管: M(突变): B-raf PCR 反应液 P 12.5 μ L+引物探针混合液(M)6.5 μ L+纯化水 4 μ L、W(外控): B-raf PCR 反应液 P 12.5 μ L+引物探针混合液(W)6.5 μ L+纯化水 4 μ L; 每管加入 2 μ L 稀释 DNA, 涡旋振荡, 短暂离心。PCR 扩增程序: UDG 酶反应 37 °C 2 min 1 循环; 预变性 95 °C 3 min 1 循环; 变性 94 °C 15 s; 退火、延伸、荧光信号采集 60 °C 35 s (与变性同步 45 循环); 仪器冷却 25 °C 1 min; 荧光收集: 靶基因 FAM; 内标 VIC。

1.2.5 基因突变结果判定 依次确定各反应管突变 Ct 值(CtM)和外控 Ct 值(CtW): Δ Ct 值(CtM-CtW) \leq 8 且 CtW \leq 35: 满足判断条件, 即可确定为对应突变型(1%~100% 突变)。 Δ Ct 值(CtM-CtW) $>$ 8 且 CtW \leq 35: 满足判断条件, 即可确定为野生型或低于 1% 突变。 Δ Ct 值(CtM-CtW) \leq 8 且 CtW $>$ 35: 外控 FAM 信号出现明显扩增, 但 CtW $>$ 35, 且突变检测孔 FAM 信号出现明显扩增曲线, 并且在突变判读范围内, 即使 CtW $>$ 35, 该样本无需重复检测, 检测结果仍为突变型。

1.3 统计学方法

实验数据使用 SPSS 26.0 软件分析处理, 使用卡方检验及 Fisher's 精确检验 BRAF V600E 突变与 PTC 临床病理特征之间的关系。检验水准为 $\alpha=0.05$, 统计学意义界定为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 内蒙古地区汉族与蒙古族 BRAF V600E 突变率的比较

20 例汉族 PTC 患者标本中 12 例出现 BRAF V600E 突变, 突变发生率为 60.00%(12/20)。40 例蒙古族 PTC 患者标本中 35 例出现 BRAF V600E 突变, 突变发生率为 87.50%(35/40)。蒙古族 PTC 患者 BRAF V600E 突变率明显高于汉族 PTC 患者 BRAF V600E 突变率, 组间差异有统计学意义($P < 0.05$)(表 1)。

表 1 内蒙古地区汉族与蒙古族 PTC 患者 BRAF V600E 突变的比较

族别	V600E(%)		χ^2	P
	突变型	野生型		
汉族	12(60.00)	8(40.00)		
蒙古族	35(87.50)	5(12.50)	5.941	0.022*

注: 与对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 蒙古族人群基本信息及临床病理特征

40 例蒙古族 PTC 患者标本中, BRAF V600E 突变率为 87.50%(35/40), 其与 PTC 临床病理参数的关系见表 2。男性突变率为 86.36%(19/22), 女性为 88.89%(16/18), 两者差异无统计学意义($P > 0.05$)。年龄 $<$ 45 岁组突变率为 90.91%(20/22), 年龄 \geq 45 岁组突变率为 83.33%(15/18), 两者差异无统计学意义($P > 0.05$)。肿瘤最大径 $>$ 1 cm 突变率 90%(9/10), 肿瘤直径 \leq 1 cm 者突变率为 86.67%(26/30), 两者差异无统计学意义($P > 0.05$)。合并桥本者突变率为 80.00%(15/30), 未合并桥本者突变率为 100%(20/20), 二者差异有统计学意义($P < 0.05$)。单发灶突变率为 85.71%(12/14), 多发灶突变率为 88.46%(23/26), 差异无统计学意义($P > 0.05$)。PTC 伴有钙化组突变率为 94.44%(17/18), 不伴钙化组突变率为 81.82%(18/22), 差异无统计学意义($P > 0.05$)。有淋巴结转移者突变率为 96.43%(27/28), 无淋巴结转移者突变率 66.67%(8/12), 有淋巴结转移者突变率显著高于无淋巴结转移, 两者组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。有被膜外侵犯者突变率为 100.00%(19/19), 无被膜外侵犯者突变率为 76.19%(16/21), 与 BRAF V600E 突变有明显相关性($P < 0.05$)。

3 讨论

本研究初步测定内蒙古地区汉族与蒙古族 PTC

患者 BRAF V600E 突变频率及分布情况,进而评估基因突变与 PTC 临床病理特征的关系。本研究首次报道了内蒙古地区蒙古族 PTC 患者 BRAF V600E 突变率,并对蒙古族患者 BRAF V600E 突变与 PTC 临床病理特征的关系进行描述,见表 2。

表 2 蒙古族人群基本信息及临床病理特征

名称	V600E(%)		总计	χ^2	P
	突变型	野生型			
性别					
女	16(88.89)	2(11.11)	18	0.058	1.000
男	19(86.36)	3(13.64)	22		
年龄					
≥45	15(83.33)	3(16.67)	18	0.519	0.642
<45	20(90.91)	2(9.09)	22		
肿瘤直径					
≤1	26(86.67)	4(13.33)	30	0.076	0.076
>1	9(90.00)	1(10.00)	10		
病灶数					
单发	12(85.71)	2(14.29)	14	0.063	1.000
多发	23(88.46)	3(11.54)	26		
钙化类型					
无	18(81.82)	4(18.18)	22	1.443	0.355
有	17(94.44)	1(5.56)	18		
合并桥本					
无	20(100.00)	0(0.00)	20	5.714	0.047*
有	15(50.00)	15(50.00)	30		
淋巴结转移					
无	8(66.67)	4(33.33)	12	6.803	0.022*
有	27(96.43)	1(3.57)	28		
被膜侵犯					
无	16(76.19)	5(23.81)	21	5.170	0.049*
有	19(100.00)	0(0.00)	19		

注:与对照组比较* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

BRAF V600E 突变在不同国家、不同民族具有不同的突变率^[3]。已有研究表明,中国汉族 PTC 患者 BRAF V600E 突变的频率约为 28.00%~85.00%^[4],与本研究中内蒙古地区汉族 PTC 患者 BRAF V600E 突变率相似,为 60.00%(12/20)。然而,本研究中内蒙古地区蒙古族 PTC 患者 BRAF V600E 突变的频率为 87.50%(35/40),明显高于内蒙古地区汉族 PTC 患者。这种基因突变率的差异可能与碘摄入量及遗传因素有关。Kim 等^[5]认为碘缺乏和碘过量均是 PTC 患者 BRAF 基因突变发生的重要危险因素。胡传祥等^[6]也认为 BRAF V600E 突变的频率可

能与碘摄入水平有关。内蒙古地区蒙古族是传统的游牧民族,具有独特的饮食文化,其饮食以肉类和奶制品为主,肉类和奶制品的含碘量很高,这种高碘饮食可能使蒙古族 PTC 患者具有较高的 BRAF V600E 突变率,但还需要进一步研究证实。内蒙古地区蒙古族患者与汉族患者相比具有较高的 BRAF V600E 突变率还可能与遗传因素有关,但各种地理和种族群体之间 BRAF V600E 突变水平的不同还有待进一步深入研究鉴定。

近年来,学术界为揭示 BRAF V600E 突变与 PTC 患者临床病理特征之间的关系进行了多项研究,但研究结果差异性较大。例如李林平等^[7]通过多因素回归分析发现 BRAF V600E 突变与性别、肿瘤直径、是否侵袭被膜、颈部淋巴结是否转移及 TNM 分期有关,与年龄和病灶数无关。吴文年等^[8]研究发现 BRAF V600E 突变与淋巴结转移有关,与患者年龄、性别、肿瘤直径、癌灶数目、是否合并桥本氏甲状腺炎、临床肿瘤分期无关。而乔伟昌等^[9]通过对 175 例 PTC 患者进行研究发现 BRAF V600E 突变的 PTC 患者较未突变的 PTC 患者肿瘤多灶性的比例更大,且未发现 BRAF V600E 突变与 PTC 患者肿瘤直径、包膜侵犯及淋巴结转移有关。本研究回顾性分析了 40 例蒙古族患者 BRAF V600E 突变与 PTC 临床病理特征之间的关系,结果显示,BRAF V600E 基因突变与是否合并桥本氏甲状腺炎、淋巴结转移及被膜侵犯有关,而与患者的性别、年龄、肿瘤直径、病灶数目、有无钙化无关。

研究表明,桥本氏甲状腺炎是 PTC 发生的独立危险因素,患有桥本氏甲状腺炎的患者中 PTC 的发病率更高,但 PTC 合并桥本氏甲状腺炎患者的 BRAF V600E 突变率更低、预后更好^[10-12]。本研究发现蒙古族 PTC 患者中未合并桥本氏甲状腺炎的患者较合并桥本氏甲状腺炎的患者 BRAF V600E 突变率高。这提示我们,对于未合并桥本氏甲状腺炎的 PTC 患者,应密切监测其病情进展。

PTC 的手术治疗包括甲状腺手术和区域淋巴结清扫手术^[13],其中,区域淋巴结清扫手术方式包括中央区淋巴结清扫和侧颈区淋巴结清扫^[14]。但是,国际上对于 CN0 期 PTC 是否应预防性清扫颈侧区淋巴结仍存在争议。美国甲状腺协会建议只对术前或术中诊断为中央区淋巴结转移的 PTC 进行中央区淋巴结清扫。而我国建议在术中有效保留甲状旁腺和喉返神经的情况下,对 PTC 患者行病灶同侧中央区淋巴结清扫术。本研究发现伴有淋巴结转

移的蒙古族 PTC 患者更容易发生 BRAF V600E 突变,因此,术前检测 PTC 是否发生 BRAF V600E 突变可以为术中是否行预防性淋巴结清扫提供可靠指导。多项研究还证实,PTC 发生被膜侵犯或淋巴结转移时,患者的复发率更高,预后更差,且更容易发生 BRAF V600E 突变^[15-17]。本研究也发现 BRAF V600E 突变与被膜侵犯的关系。因此,术前检测 BRAF V600E 突变不仅可以为手术方案的制订提供参考,还能更准确地评估患者的预后及复发风险。

这些发现对蒙古族甲状腺乳头状癌患者个体化治疗方案的制订具有重要意义。但是本研究样本量少,且为单中心回顾性研究,故存在一定的局限性,实验结果的准确性需要大样本、多中心的前瞻性研究进一步证实。

参考文献

- [1]Asarkar A, Shaha M, Shaha A, et al. Does mutational analysis influence the management of differentiated thyroid cancers[J]. *Laryngoscope*, 2018, **128**(1):1-2
 - [2]Rashid FA, Munkhdelger J, Fukuoka J, et al. Prevalence of BRAFV600E mutation in Asian series of papillary thyroid carcinoma—a contemporary systematic review[J]. *Gland Surg*, 2020, **9**(5):1878-1900
 - [3]Goh X, Lum J, Yang SP, et al. BRAF mutation in papillary thyroid cancer—Prevalence and clinical correlation in a South-East Asian cohort[J]. *Clin Otolaryngol*, 2019, **44**(2):114-123
 - [4]Pierry C, Caumont C, Blanchard E, et al. Assessment of BRAFV600E mutation in pulmonary Langerhans cell histiocytosis in tissue biopsies and bronchoalveolar lavages by droplet digital polymerase chain reaction[J]. *Virchows Arch*, 2018, **472**(2):247-258
 - [5]Kim HJ, Park HK, Byun DW, et al. Iodine intake as a risk factor for BRAF mutations in papillary thyroid cancer patients from an iodine-replete area[J]. *Eur J Nutr*, 2018, **57**(2):809-815
 - [6]胡传祥,赵静,于洋,等.甲状腺乳头状癌碘摄入与 BRAF~(V600E)突变的相关性研究[J]. *中华普通外科杂志*, 2015, **30**(9):687-691
 - [7]李林平,柴芳,王俊,等. BRAFV600E 基因突变与甲状腺乳头状癌的临床病理关系[J]. *中国老年学杂志*, 2020, **40**(11):2304-2306
 - [8]吴文年,白超,杨镇玮,等. BRAF~(V600E)基因与甲状腺乳头状癌的相关性研究[J]. *新疆医学*, 2021, **51**(8):877-881
 - [9]乔伟昌,王保为,孙彦. 青岛地区 BRAF~(V600E)基因突变型甲状腺乳头状癌的临床病理特点[J]. *青岛大学学报:医学版*, 2018, **54**(5):559-562
 - [10]吉盼盼,张光亮,蒋蓓蓓. 合并桥本甲状腺炎的甲状腺乳头状癌患者的临床特征及预后复发的影响因素分析[J]. *癌症进展*, 2021, **19**(6):596-598+629
 - [11]肖敏,周戌,李三荣,等. 桥本甲状腺炎对甲状腺乳头状癌患者颈淋巴结清扫程度及预后的影响[J]. *实用临床医药杂志*, 2021, **25**(6):29-33
 - [12]高嘉良,袁方均,武伦,等. 桥本甲状腺炎对甲状腺乳头状癌的影响[J]. *锦州医科大学学报*, 2021, **42**(3):83-86
 - [13]中华人民共和国国家卫生健康委员会. 甲状腺癌诊疗规范(2018年版)[J]. *中华普通外科学文献:电子版*, 2019, **13**(1):1-15
 - [14]陈立波,丁勇,关海霞,等. 中国临床肿瘤学会(CSCO)持续/复发及转移性分化型甲状腺癌诊疗指南-2019[J]. *肿瘤预防与治疗*, 2019, **32**(12):1051-1080
 - [15]郭斌,陈蕊,王圣应,等. 208例甲状腺乳头状癌患者颈部淋巴结转移相关因素分析[J]. *中华全科医学*, 2022, **20**(2):195-198+262
 - [16]Park YM, Wang SG, Lee JC, et al. Metastatic lymph node status in the central compartment of papillary thyroid carcinoma: a prognostic factor of locoregional recurrence[J]. *Head & Neck*, 2016, **38**(S1):1172-1176
 - [17]赵勇,高博,陈卓妙语,等. BRAF~(V600E)基因突变丰度与甲状腺乳头状癌临床病理学特征的关系[J]. *中华普通外科杂志*, 2021, **36**(9):684-686
-
- (上接第 287 页)
- [9]Sargin M, Uluer MS, Ozmen S. Comparison of the effects of different positive end-expiratory pressure levels on cerebral oxygen saturation with near infrared spectroscopy during laparoscopic cholecystectomy[J]. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech*, 2017, **27**(1):30-35
 - [10]Liu H, Wu X, Li J, et al. Individualized PEEP ventilation between tumor resection and dural suture in craniotomy[J]. *Clin Neurol Neurosurg*, 2020, **196**(11):e106027
 - [11]王美霞,钟晓,卓李圆,等. 神经元特异性烯醇化酶升高对继发性脑损伤病人预后的评估价值[J]. *内蒙古医科大学学报*, 2019, **41**(4):131-135
 - [12]Simon P, Girrbach F, Petroff D, et al. Individualized versus fixed positive end-expiratory pressure for intraoperative mechanical ventilation in obese patients: a secondary analysis[J]. *Anesthesiology*, 2021, **134**(6):887-900
 - [13]McKeon A, Benarroch EE. Glial fibrillary acid protein: functions and involvement in disease[J]. *Neurology*, 2018, **90**(20):925-930
 - [14]范之丹,邵静,丁炜宏. Dex 对行三孔法 LRP 术的高龄前列腺癌患者术后镇静情况、神经功能及脑氧代谢的影响[J]. *海南医学院学报*, 2020, **26**(7):524-528
 - [15]Wang Z, Liu Y, Shao M, et al. Combined prediction of miR-210 and miR-374a for severity and prognosis of hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. *Brain Behav*, 2018, **8**(1):e00835
 - [16]Zhang S, Wu M, Peng C, et al. GFAP expression in injured astrocytes in rats[J]. *Exp Ther Med*, 2017, **14**(3):1905-1908