



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.11.013
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract4101.shtml

· 基础研究 ·

BRAF^{V600E} 突变与乳头状甲状腺癌中央区淋巴结转移的关系

石臣磊, 丁超, 秦华东, 孙宇, 吕一辰, 石铁锋

(哈尔滨医科大学附属第二医院 普外四科, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要

目的: 探讨乳头状甲状腺癌(PTC)中 BRAF 基因突变的临床意义。

方法: 选择2年间符合条件的 PTC 手术患者 126 例, 提取患者石蜡切片中的 DNA 样本, 用荧光 PCR 法检测 BRAF 基因 V600E (BRAF^{V600E}) 的突变情况, 分析 BRAF^{V600E} 突变与 PTC 患者临床病理因素及中央区淋巴结转移的关系。

结果: 126 例 PTC 患者 BRAF^{V600E} 突变的发生率为 69.0% (87/126)。单因素与多因素分析显示, BRAF^{V600E} 突变与淋巴结转移有关 ($P < 0.05$); 中央区淋巴结转移与年龄、肿瘤大小、肿瘤分期和 BRAF^{V600E} 突变有关 (均 $P < 0.05$)。进一步分析显示, 肿瘤直径 ≤ 10 mm 时, BRAF^{V600E} 突变与中央区淋巴结转移无关 ($P > 0.05$), 肿瘤直径 > 10 mm 时, BRAF^{V600E} 突变患者的中央区淋巴结转移率高于突变阴性患者 ($P < 0.05$)。

结论: BRAF^{V600E} 突变是 PTC 中央区淋巴结转移风险的独立预测因子; 对于术前检测 BRAF^{V600E} 突变阳性患者, 肿瘤直径越大越应该重视中央区淋巴结清扫。

[中国普通外科杂志, 2014, 23(11):1522-1526]

关键词

甲状腺肿瘤; 癌, 乳头状; 突变; 淋巴转移

中图分类号: R736.1

Association of BRAF^{V600E} mutation with central compartment lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma

SHI Chenlei, DING Chao, QIN Huadong, SUN Yu, LU Yichen, SHI Tiefeng

(The Fourth Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150086, China)

Corresponding author: QIN Huadong, Email: aitianang83@126.com

ABSTRACT

Objective: To investigate the clinical significance of the BRAF gene mutation in papillary thyroid carcinoma (PTC).

Methods: One-hundred and twenty-two eligible PTC patients undergoing surgical treatment within the past 2 years were selected. DNA samples of the patients were extracted from paraffin sections and the V600E mutation of the BRAF gene (BRAF^{V600E}) was detected by fluorescent PCR. The relations of BRAF^{V600E} mutation with clinicopathologic factors and central compartment lymph node metastasis were analyzed.

基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目 (D201228); 黑龙江省教育厅课题资助项目 (12541490); 哈尔滨医科大学附属第二医院青年基金资助项目 (QN2012-07)。

收稿日期: 2014-03-03; **修订日期:** 2014-06-05。

作者简介: 石臣磊, 哈尔滨医科大学附属第二医院主治医师, 主要从事甲状腺疾病诊疗方面的研究。

通信作者: 秦华东, Email: aitianang83@126.com

Results: The incidence of BRAF^{V600E} mutation was 69.0% (87/126) in the 126 PTC patients. Univariate and multivariate analysis showed that BRAF^{V600E} mutation was significantly related to lymph node metastasis ($P<0.05$), and central compartment lymph node metastasis was significantly associated with age, tumor size, tumor stage and BRAF^{V600E} mutation (all $P<0.05$). Further analysis demonstrated that BRAF^{V600E} mutation had no significant relation with central compartment lymph node metastasis in patients whose tumor size was equal to or less than 10 mm ($P>0.05$), while among patients with tumor size larger than 10 mm, the incidence of central compartment lymph node metastasis was significantly higher in positive BRAF^{V600E} mutation cases than that in negative BRAF^{V600E} mutation ones ($P<0.05$).

Conclusion: BRAF^{V600E} mutation is an independent predictor associated with aggressive tumor behavior and is an independent predictive factor for central compartment neck dissection. In those cases with positive BRAF^{V600E} mutation, the larger the size of the tumor, the more important it is to perform central compartment neck dissection.

[Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(11):1522-1526]

KEYWORDS Thyroid Neoplasms; Carcinoma, Papillary; Mutation; Lymphatic Metastasis

CLC number: R736.1

乳头状甲状腺癌 (papillary thyroid carcinoma, PTC) 是甲状腺癌中最常见的病理类型, 约占 80%~90%^[1-3]。鼠类肉瘤滤过性毒菌致癌同源体 B1 (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1, BRAF) 基因突变是甲状腺癌中最常见的遗传学事件, 在 PTC 中发生率最高, 达 29%~83%^[4-6]。目前研究证明 BRAF 基因 V600E (BRAF^{V600E}) 突变与 PTC 的发生、发展密切相关。然而, BRAF 突变与 PTC 的某些临床病理特征的联系仍然存在争论。因此, 笔者对其所在医院甲状腺外科 2 年期间行手术治疗 126 例 PTC 患者的临床资料进行了回顾性分析, 旨在探讨 BRAF^{V600E} 突变与 PTC 预后影响因素的相关性。

1 材料与方法

1.1 一般资料

回顾性分析本院甲状腺外科从 2011 年 10 月—2013 年 10 月收治的单侧 PTC 手术患者的临床资料, 并筛选符合研究标准的样本共 126 例。其中男 11 例, 女 115 例, 男女比 1:10.45; 年龄 19~73 岁, 平均 (43.1 ± 10.6) 岁。

1.2 检查方法及入组标准

所有患者术前常规行甲状腺彩超检查 (采用仪器为 GE Vivid 7 彩色多普勒超声诊断仪, 探头频率 15 MHz)。所有患者术前均应用放射免疫测定法检测血清游离三碘甲状腺原氨酸 (FT₃)、游离

甲状腺素 (FT₄)、促甲状腺激素 (TSH)、甲状腺球蛋白抗体 (TGAb) 和抗甲状腺过氧化物酶抗体 (TPOAb)。根据术前血清甲状腺自身抗体是否增高和术后病理证实确定患者是否合并桥本甲状腺炎。患者均符合以下标准: (1) 无甲状腺病史及甲状腺相关药物服用史; (2) 无 Grave's 眼病病史及 TRAb 阳性史; (3) 术前通过触诊及高频彩超评价颈侧区未发现可疑肿大淋巴结; (4) 术中快速病理和术后病理证实为 PTC。患者的临床病理分期采用 AJCC (美国癌症联合会) 2010 年第 7 版 TNM 分期标准^[7]。

1.3 方法

1.3.1 术式选择 患者均行患侧甲状腺叶全切、峡部切除及预防性患侧中央区淋巴结清扫术。

1.3.2 免疫组织化学 对样本甲状腺组织的 HE 染色切片, 应用光学显微镜观察、判断甲状腺组织病理情况。对病理情况有疑问者重新对患者癌组织进行切片染色并经有经验病理医师会诊。

1.3.3 DNA 提取及突变基因检测 取 8 μm 厚石蜡切片 1~2 张 (总重量 <20 mg) 至离心管, 按 (厦门艾德生物公司) DNA 试剂盒内离心操作方案操作, 取得含 DNA 的洗脱液, DNA 样品溶于 pH8.0 的 TE 溶液中 (实验室常备), 近期常用的于 4℃ 冰箱保存, 短期不使用的于 -20℃ 冰箱保存。采用荧光定量 PCR 检测并判断基因突变是否阳性, 取提取后的 DNA 样本, 按人类 BRAF^{V600E} 突变检测试剂盒 (厦门艾德生物公司, 荧光 PCR 法) 操

作说明, 将洗脱液及盒内各试剂加入 PCR 反应管内, 将 PCR 反应管放入实时 PCR 仪器。设置相应程序后, 启动 PCR 开始扩增, 第三阶段 60℃ 时收集 FAM 和 HEX (或 VIC) 信号, 执行实时 PCR, 保存文件。按试剂盒说明书对收集信号进行分析, 判断样本基因是否阳性。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件包进行分析。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 计数资料以频数及率表示, 组间比较根据数据类型分别采用独立样本 t (计量) 或者 χ^2 (计数) 检验, 采用单因素和多因素 Logistic 回归分析评价临床病理因素对 BRAF^{V600E} 突变和淋巴结转移的影响。显著性检验水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 甲状腺癌患者的临床病理情况

126 例单侧 PTC 手术患者, 其中男 11 例, 女 115 例; 平均年龄 (43.1 ± 10.6) 岁; 平均肿瘤大小 (10.7 ± 7.3) mm; BRAF^{V600E} 突变的发生率为 69.0% (87/126)。患者其他临床病理情况见表 1。

表 1 126 例 PTC 患者的临床病理特征 ($n=126$)

Table 1 Clinicopathologic characteristics of the 126 PTC patients ($n=126$)

变量	[n (%)]
年龄 (岁)	
≥ 45	55 (43.7)
< 45	71 (56.3)
多发病灶	
多发 (≥ 2)	6 (4.8)
单发	120 (95.2)
肿瘤腺体外侵及	
是	7 (5.6)
否	119 (94.4)
桥本氏甲状腺炎	
是	20 (15.9)
否	106 (84.1)
淋巴结转移	
是	42 (33.3)
否	84 (66.7)
肿瘤分期	
T ₁	114 (90.5)
T ₃	12 (9.5)

2.2 BRAF^{V600E} 突变与 PTC 临床病理特征的关系

单因素分析显示 BRAF^{V600E} 突变与肿瘤大小和淋巴结转移有关 (均 $P < 0.05$)。与性别、年龄、多发病灶、腺外浸润、桥本氏甲状腺炎和肿瘤分期无关 (均 $P > 0.05$)。多因素分析显示只有淋巴结转移与 BRAF^{V600E} 突变有关 ($P < 0.05$) (表 2)。

表 2 BRAF^{V600E} 突变与 PTC 临床病理特征的关系 ($n=126$)

Table 2 Relationship between BRAF^{V600E} mutation and clinicopathologic factors ($n=126$)

变量	单因素		多因素	
	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
性别 (男 / 女)	2.1 (0.4~10.4)	0.347	2.6 (0.5~14.6)	0.265
年龄 (≥ 45 岁 / < 45 岁)	0.6 (0.3~1.4)	0.249	1.0 (0.4~2.5)	0.960
肿瘤大小 (I/II/III/IV)	1.7 (1.1~2.8)	0.027	1.3 (0.8~2.3)	0.276
多发病灶 (多发 / 单发)	2.3 (0.3~20.5)	0.45	3.2 (0.3~32.0)	0.324
腺外侵及 (是 / 否)	1.1 (0.2~6.1)	0.889	0.7 (0.1~4.8)	0.677
桥本氏甲状腺炎 (是 / 否)	0.5 (0.2~1.3)	0.144	0.6 (0.2~1.8)	0.375
淋巴结转移 (是 / 否)	5.0 (1.8~14.1)	0.002	4.6 (1.2~16.7)	0.022
肿瘤分期 (T ₃ /T ₁)	1.6 (0.7~3.4)	0.273	0.8 (0.1~5.7)	0.787

注: I ≤ 50 mm; II > 50~100 mm; III > 100~200 mm; IV > 200 mm

Note: I ≤ 50 mm; II > 50~100 mm; III > 100~200 mm; IV > 200 mm

2.3 中央区淋巴结转移与 PTC 临床病理特征的关系

单因素分析显示, 中央区淋巴结转移与年龄、肿瘤大小、肿瘤分期和 BRAF^{V600E} 突变有关 (均 $P < 0.05$)。在多因素分析中, 肿瘤大小、肿瘤分期和 BRAF^{V600E} 突变与淋巴结转移有关 (均 $P < 0.05$) (表 3)。

2.4 中央区淋巴结转移与肿瘤大小和 BRAF^{V600E} 突变的关系

中央区淋巴结转移与肿瘤大小和 BRAF 突变的关系见。肿瘤直径 ≤ 10 mm 时, BRAF^{V600E} 突变的情况对中央区淋巴结转移无影响 ($P > 0.05$)。当肿瘤直径 > 10 mm 时, BRAF^{V600E} 突变患者的中央区淋巴结转移率高于突变阴性患者, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 4)。

表 3 中央区淋巴结转移与 PTC 临床病理特征的关系 (n=126)

Table 3 Relationship between central compartment lymph node metastases and clinicopathologic factors (n=126)

变量	单因素		多因素	
	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
性别 (男/女)	0.7 (0.2~2.9)	0.656	0.3 (0.05~2.5)	0.285
年龄 (≥ 45 岁 / <45 岁)	0.3 (0.1~0.7)	0.006	0.4 (0.2~1.0)	0.050
肿瘤大小 (I/II/III/IV)	2.6 (1.6~4.2)	<0.001	2.1 (1.1~4.3)	0.029
多发病灶 (多发/单发)	1.0 (0.2~5.7)	1.000	1.9 (0.1~25.0)	0.623
腺外侵及 (是/否)	0.8 (0.1~4.3)	0.784	0.5 (0.03~9.8)	0.678
桥本氏甲状腺炎 (是/否)	0.3 (0.1~1.1)	0.07	0.4 (0.1~2.0)	0.274
肿瘤分期 (T ₃ /T ₁)	29.5 (3.6~237.7)	0.001	44.1 (3.9~497.7)	0.002
BRAF ^{V600E} 突变 (是/否)	5.0 (1.8~14.1)	0.002	3.9 (1.1~14.0)	0.040

表 4 中央区淋巴结转移与肿瘤大小和 BRAF^{V600E} 突变的关系Table 4 Relations among central compartment lymph node metastases, tumor size and BRAF^{V600E} mutation

肿瘤大小 (mm)	中央区淋巴结转移		P
	是	否	
≤ 5			
BRAF ^{V600E} 突变阳性	3 (18.8)	13 (81.2)	0.238
BRAF ^{V600E} 突变阴性	0 (0.0)	12 (100.0)	
>5~10			
BRAF ^{V600E} 突变阳性	14 (35.9)	25 (64.1)	0.302
BRAF ^{V600E} 突变阴性	4 (22.2)	14 (77.8)	
>10			
BRAF ^{V600E} 突变阳性	20 (62.5)	12 (37.5)	0.009
BRAF ^{V600E} 突变阴性	1 (11.1)	8 (88.9)	

3 讨论

目前, 研究发现人类恶性肿瘤的 BRAF 基因包含 40 余种突变类型^[8-9], 超过 50% 的甲状腺恶性肿瘤的遗传学变化都位于 BRAF^{V600E} 点突变^[10-11]。研究显示, BRAF^{V600E} 突变在 MAPK 通路中对 ERK 磷酸化有重要的作用并能导致肿瘤细胞的增殖与分化^[12], 是甲状腺癌中最常见的遗传学事件, 且在 PTC 中发生率最高, 达 29%~83%^[4-6]。同时, PTC 是甲状腺癌中最常见的病理类型, 约占 80%~90%^[1-3]。因此, 研究 BRAF^{V600E} 突变与 PTC 相关的临床病理因素间的关系有助于揭示甲状腺肿瘤细胞的发生、发展机制并帮助临床医生更好的治疗疾病及评价患者的预后。然而, BRAF 突变与 PTC 的某些临床病理特征的联系仍然存在争论。

本研究发现 BRAF^{V600E} 突变的发生率为 69.0%, 高于近期国内报道的研究结果^[13]。Mathur 等^[14] 新近在一个长达 15 年的研究样本中发现 BRAF^{V600E} 突变率可高达 88%, 并指出 BRAF 基因的高突变率能够增加甲状腺癌的患病率。研究^[15-16]

发现, BRAF 基因突变与甲状腺癌较差的临床病理结果密切相关, 是一个新的评估甲状腺癌预后风险的独立的分子标记物。本研究的突变基因均来自于肿瘤组织, 而 Davies 等^[8] 认为突变还可以发生在肿瘤周围的正常组织中, 这需要进行进一步研究进行验证。

传统的影响甲状腺癌恶性度的高危因素包括高龄、男性、较大肿瘤直径、腺外侵及、局部淋巴结转移、远处转移和高级别的病理分期。多项研究^[15-18] 证明 BRAF 基因突变能够显著的增加肿瘤的腺外侵及、淋巴结转移和 TNM 分期。本研究没有发现 BRAF^{V600E} 突变与患者的性别、年龄、多发病灶、腺外侵及、桥本氏病和肿瘤分期有关。这种结果可能与研究样本例数、统计标准和肿瘤临床病理分级不同有关, 有待进一步将研究。本研究还发现 BRAF^{V600E} 突变与肿瘤大小及和淋巴结转移有关, 这与 Frasca 等^[19] 的研究结果相同。结果证明 BRAF 基因突变与肿瘤的侵袭性行为关系密切。在多因素分析中, BRAF^{V600E} 突变只与淋巴结转移有关 ($P < 0.05$), 可以认为 BRAF^{V600E} 突变是中央区淋巴结转移的独立预测因子。这与 Lupi 等^[17] 在对一项多达 500 例的大宗样本的研究结果一致, 但认为高级别的肿瘤分期和 PTC 病灶的腺外侵及同样也是中央区淋巴结转移的独立预测因子。本研究结果提示对于术前检测 BRAF^{V600E} 突变阳性的 PTC 患者应该重视中央区淋巴结清扫的重要性且应该常规清扫该区淋巴脂肪组织。然而, Chakraborty^[6] 和 Cheng 等^[20] 的研究显示 BRAF^{V600E} 突变不能作为 PTC 淋巴结转移的独立的风险预测因子。这也是目前争论的焦点之一, 相信随着研究样本的增多、数据不断的补充、随访情况进一步完善及对于肿瘤分期的进一步认识一定会使该争论更明晰。

本研究对中央区淋巴结转移与 PTC 临床病理特点的关系进行了分析。单因素分析显示, 中央区

淋巴结转移与年龄、肿瘤大小、肿瘤分期和 BRAF 突变有关 ($P < 0.05$)。在多因素分析中, 肿瘤大小、肿瘤分期和 BRAF 突变与淋巴结转移有关 ($P < 0.05$), 是评价 PTC 中央区淋巴结转移风险的独立预测因子。这也证明了 BRAF 基因突变对 PTC 患者中央区淋巴结转移的预测作用, 且随着肿瘤直径的增大, 中央区淋巴结清扫的重要性就越大。当肿瘤当肿瘤直径 > 10 mm 时, BRAF^{V600E} 突变阳性患者的淋巴结转移率显著高于突变阴性者。本研究并未对 PTC 的不同分子亚型及 PTC 发生、发展中的其它遗传学事件进行研究, 需要完善。

综上所述, 本研究发现 PTC 的 BRAF^{V600E} 突变率为 69.0%, 符合国际上的 29%~88% 的研究结果, 并发现它的存在与肿瘤的高侵袭性的生物学行为有关, 是 PTC 中央区淋巴结转移风险的独立预测因子。对于术前检测 BRAF^{V600E} 突变阳性的 PTC 患者, 肿瘤直径越大越应该重视中央区淋巴结清扫的重要性且应该常规清扫该区域淋巴脂肪组织。

参考文献

- [1] Montero PH, Ibrahimasic T, Nixon IJ, et al. Thyroid metastasectomy[J]. J Surg Oncol, 2014, 109(1):36-41.
- [2] 石臣磊, 石铁锋, 吴佳奇, 等. 桥本甲状腺炎对乳头状甲状腺癌颈淋巴结转移的影响 [J]. 中国普通外科杂志, 2013, 22(5):580-584.
- [3] 吴恢升, 何劲松, 陈伟财, 等. 选择性颈淋巴结清除术在乳头状甲状腺癌手术治疗的临床应用 [J]. 中国普通外科杂志, 2012, 21(5):532-535.
- [4] Moo TA, McGill J, Allendorf J, et al. Impact of prophylactic central neck lymph node dissection on early recurrence in papillary thyroid carcinoma[J]. World J Surg, 2010, 34(6):1187-1191.
- [5] Kim KH, Kang DW, Kim SH, et al. Mutations of the BRAF gene in papillary thyroid carcinoma in a Korean population[J]. Yonsei Med J, 2004, 45(5):818-821.
- [6] Chakraborty A, Narkar A, Mukhopadhyaya R, et al. BRAF V600E mutation in papillary thyroid carcinoma: significant association with node metastases and extra thyroidal invasion[J]. Endocr Pathol, 2012, 23(2):83-93.
- [7] Stratmann M, Sekulla C, Dralle H, et al. Current TNM system of the UICC/AJCC: the prognostic significance for differentiated thyroid carcinoma[J]. Chirurg, 2012, 83(7):646-651.
- [8] Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer[J]. Nature, 2002, 417(6892):949-954.
- [9] Tadmor T, Tiacchi E, Falini B, et al. The BRAF-V600E mutation in hematological malignancies: a new player in hairy cell leukemia and Langerhans cell histiocytosis[J]. Leuk Lymphoma, 2012, 53(12):2339-2340.
- [10] Garnett MJ, Marais R. Guilty as charged: B-Raf is a human oncogene[J]. Cancer Cell, 2004, 6(4):313-319.
- [11] Ahn HY, Chung YJ, Kim BS, et al. Clinical significance of the BRAF V600E mutation in multifocal papillary thyroid carcinoma in Korea[J]. Surgery, 2014, 155(4):689-695.
- [12] Kondo T, Ezzat S, Asa SL. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia[J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(4):292-306.
- [13] 李小强, 张惠箴, 蒋智铭, 等. 甲状腺乳头状癌中 BRAF 基因的表达及意义 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2012, 28(9):991-995.
- [14] Mathur A, Moses W, Rahbari R, et al. Higher rate of BRAF mutation in papillary thyroid cancer over time: a single-institution study[J]. Cancer, 2011, 117(19):4390-4395.
- [15] Xing M, Westra WH, Tufano RP, et al. BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90(12):6373-6379.
- [16] 黄伟, 吴高松. 甲状腺癌相关 BRAF 基因研究的新进展 [J]. 中国普通外科杂志, 2010, 19(5):559-563.
- [17] Lupi C, Giannini R, Ugolini C, et al. Association of BRAF V600E mutation with poor clinicopathological outcomes in 500 consecutive cases of papillary thyroid carcinoma[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2007, 92(11):4085-4090.
- [18] Kim SJ, Lee KE, Myong JP, et al. BRAF V600E mutation is associated with tumor aggressiveness in papillary thyroid cancer[J]. World J Surg, 2012, 36(2):310-317.
- [19] Frasca F, Nucera C, Pellegriti G, et al. BRAF(V600E) mutation and the biology of papillary thyroid cancer[J]. Endocr Relat Cancer, 2008, 15(1):191-205.
- [20] Cheng S, Serra S, Mercado M, et al. A high-throughput proteomic approach provides distinct signatures for thyroid cancer behavior[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(8):2385-2394.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 石臣磊, 丁超, 秦华东, 等. BRAF^{V600E} 突变与乳头状甲状腺癌中央区淋巴结转移的关系 [J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(11):1522-1526. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.11.013
 Cite this article as: SHI CL, DING C, QIN HD, et al. Association of BRAF^{V600E} mutation with central compartment lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma [J]. Chin J Gen Surg, 2014, 23(11):1522-1526. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.11.013