

网络出版时间: 2018-6-27 14:14 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1073.R.20180627.1413.021.html>

BRAF V600E 和 TERT 启动子突变与甲状腺乳头状癌临床病理特征的关系

代丽丽¹, 张国安², 韩莎³, 吕晨曦⁴, 王业全⁴, 侯森⁴, 崔文⁴

摘要: 目的 探讨鼠类肉瘤滤过性病毒致癌同源体 B1 (BRAF) V600E 基因突变和端粒酶逆转录酶 (TERT) 启动子突变在甲状腺乳头状癌 (papillary thyroid carcinoma, PTC) 中的发生率及其与临床病理特征的关系。方法 收集 62 例 PTC 患者新鲜冷冻组织进行显微切割, 收集癌细胞并提取 DNA, PCR 扩增后利用测序法对 PTC 患者 BRAF V600E 和 TERT 启动子突变进行检测, 并收集 62 例患者的临床病理资料进行统计学分析。结果 62 例 PTC 中 58 例 (94%) 在 BRAF T1799A 处发生突变。有 13 例 (21%) 在 TERT 启动子 C228T 处发生突变。PTC 患者中, BRAF V600E 基因突变仅与肿瘤大小有关 ($P < 0.05$), TERT 启动子突变与 PTC 患者年龄、肿瘤大小有关 ($P < 0.05$)。结论 BRAF 和 TERT 启动子突变对 PTC 患者的临床病理表现产生一定影响, 对患者的预后评估具有指导意义。

关键词: 甲状腺肿瘤; 乳头状癌; BRAF V600E 突变; TERT 启动子突变; 临床病理特征

中图分类号: R 736.1 **文献标志码:** A

文章编号: 1001-7399(2018)06-0673-04

doi: 10.13315/j.cnki.cjcep.2018.06.021

甲状腺癌是内分泌系统中最常见的恶性肿瘤, 在全球范围内发病率呈快速上升趋势^[1], 近几年中国甲状腺癌的发病率也持续升高^[2]。甲状腺乳头状癌 (papillary thyroid cancer,

PTC) 是其最常见的病理类型。随着对甲状腺癌发病机制的不断深入研究, 发现 PTC 是一个多基因驱动的恶性肿瘤, 端粒酶逆转录酶 (TERT) 和鼠类肉瘤滤过性病毒致癌同源体 B1 (BRAF) 基因在 PTC 的发生与发展中发挥重要作用^[3]。BRAF V600E 基因突变是 PTC 发生及发展中比较重要的遗传学改变, BRAF T1799A 单个碱基的错义突变, 导致翻译蛋白质 600 位密码子对应的缬氨酸被谷氨酸替代 (V600E), 成为活化蛋白激酶, 级联式激活信号传导通路引起细胞的异常增殖和肿瘤的发生^[4]。TERT 是端粒酶的催化亚基, TERT 启动子区最常见的两个突变分别是 1295 228 C > T 和 1295 250 C > T (分别称为 C228T 和 C250T), 这两个突变能够增强 TERT 启动子的转录活性, 促进甲状腺癌的发生^[5]。多数报道均使用未经加工的 PTC 组织作为检测 DNA 的来源^[6], 即其提取的 DNA 是 PTC 肿瘤细胞和正常甲状腺细胞、间质细胞的混合 DNA。如果后者所占比例过大, 可能影响突变的检出率。为避免这个问题, 本实验使用显微切割精确分离出 PTC 肿瘤细胞, 然后进行 DNA 提取和突变检测, 以期提高检测的准确性。

1 材料与方法

1.1 材料 收集济宁医学院附属医院未经放、化疗且经 3 名以上病理医师诊断为 PTC 的 62 例患者术中病理组织, 并制作成冷冻切片。其中女性 44 例, 男性 18 例, 年龄 7 ~ 79 岁。收集患者的临床病理资料 (姓名、性别、年龄、肿瘤大小、有无甲状腺腺外侵犯、有无淋巴结转移等)。所有病例均经 HE 染色并由高年资病理医师确认诊断。所有患者均签知情同意书, 并获得医院伦理委员会批准。

1.2 显微切割技术 将 62 例 PTC 新鲜病变组织制作成冷冻切片并进行 HE 染色, 将 MMI 显微切割用膜片框架反转, 置于载玻片上, 得到三明治样结构的样本即可用于显微切割。设置玻片类型, 安装好收集管, 进行扫描, 选取视野后, 进行显微切割, 分离出 PTC 组织的肿瘤细胞, 置于收集管中并做好标记, 分别于显微切割前后拍摄照片 (图 1)。

接受日期: 2018-03-27

基金项目: 济宁医学院大学生创新训练计划项目 (cx2016034)、济宁医学院青年教师科研扶持基金 (JY2017FY001)

作者单位: ¹ 济南大学山东省医学科学院医学与生命科学学院, 济南 250062

² 济宁医学院司法鉴定中心, 济宁 272067

³ 济宁医学院中心实验室、⁴ 法医学与医学检验学院, 济宁 272067

作者简介: 代丽丽, 女, 硕士研究生。E-mail: ml8463728330@163.com

崔文, 男, 教授, 硕士生导师, 通讯作者。E-mail: cuiwenmd@163.com

[1] National Lung Screening Trial Research Team, Aberle D R, Adams A M, et al. Reduced lung-cancer mortality with low dose computed tomographic screening [J]. N Engl J Med, 2011, 365(5): 395-409.

[2] 么鸿雁, 施侣元. 中国人群肺癌发病危险因素的 Meta 分析 [J]. 中华流行病学杂志, 2003, 24(1): 46-49.

[3] 陈仁杰, 张金良, 阚海东. 中国大气污染与肺癌关系的流行病学研究回顾 [J]. 卫生研究, 2011, 40(2): 243-245.

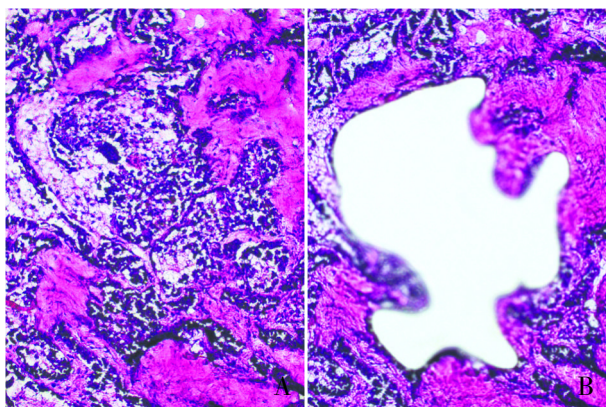


图1 激光显微切割 PTC 肿瘤细胞: A. 显微切割前; B. 显微切割后

1.3 肿瘤细胞 DNA 提取 采用 Chelex-400 法提取 PTC 的肿瘤细胞 DNA。分别向每个样本的收集管中加入 200 μ L 5% Chelex-400 溶液, 然后加入 4 μ L PK (5 mg/mL) 溶液和 2 μ L DTT (1 mol/mL) 溶液, 在振荡器上反复震荡后, 放于恒温振荡器 56 $^{\circ}$ C 过夜然后 100 $^{\circ}$ C 保温 8 ~ 10 min, 充分振荡, 将液体移入普通 EP 管, 13 000 r/min 离心 3 min。取上清, 测定浓度后置于 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4 PCR 及测序 根据 NCBI 提供的 BRAF 和 TERT 基因序列, 由上海生物公司进行引物设计并合成, BRAF 基因上游引物序列 5'-GCATCTCACCTCATCCTAACACA-3', 下游引物序列 5'-AGCCTCAATTCTTACCATCCACAA-3'; TERT 基因上游引物序列 5'-CGGGCTCCCACTGGATTG-3', 下游引物序列 5'-GCCACTACCGCGAGGTG-3', 设置 PCR 反应体系, BRAF 基因使用普通 PCR 试剂盒 (康为试剂 CW0690S), TERT 基因使用 2 $\times$ Phanta Turbo Master Mix (Vazyme P518-01) 试剂盒。将扩增的 PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖电泳, 确定 PCR 产物质量 (图 2)。将扩增成功样本的 PCR 产物送上海生物公司进行测序, 获取测序峰图和序列, 将其与正常基因组 DNA 序列对比以确定是否发生突变, 如发现存在突变, 则更换反向引物进行测序, 以再次确认突变的发生。

1.5 统计学分析 应用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析, 用四格表资料 χ^2 检验或者 Fisher 确切概率法进行率的比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BRAF V600E 对 PTC 临床病理特征的影响 在 62 例 PTC 患者中 BRAF V600E 基因突变为 58 例, 突变率为 94%, 突变位点为第 15 外显子第 1 799 位点的点突变 (T1799A), 且所有的突变均为杂合性突变 (图 3)。其余 4 例 PTC 患者均未发现突变 (图 4)。女性 PTC 患者 BRAF V600E 基因突变 41 例, 男性 PTC 患者 BRAF V600E 基因突变 17 例, 提示 PTC 中 BRAF V600E 基因突变与性别无关 ($P > 0.05$)。同样, BRAF 基因在发生甲状腺腺外侵犯的患者中突变率 100%, 与未发生甲状腺腺外侵犯的患者相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。此外, 在 25 例肿瘤直径 ≤ 1 cm 的 PTC 患者

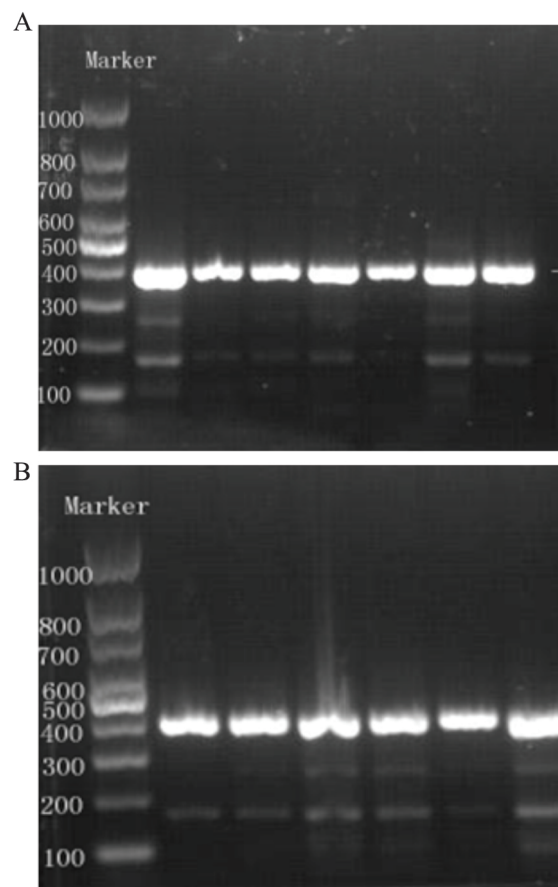


图2 PCR 产物琼脂糖电泳图

A. BRAF 基因片段 389 bp; B. TERT 基因片段 400 bp

中, 发生 BRAF V600E 基因突变的有 21 例, 在肿瘤直径 > 1 cm 的 37 例 PTC 患者中均发生 BRAF V600E 基因突变, 两组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。在颈部淋巴结发生转移患者中均发生 BRAF V600E 基因突变, 但与无颈部淋巴结转移者相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 1)。

2.2 TERT 启动子突变对 PTC 临床病理特征的影响 在 62 例 PTC 中, TERT 启动子突变 13 例, 突变率 21%, 突变位点均为 C228T (图 5), 其余 49 例 PTC 患者未检测到突变 (图 6)。其中年龄 ≤ 45 岁和 > 45 岁的 PTC 患者中 TERT 启动子突变率分别为 9% 和 37%, 两者差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。PTC 患者中 TERT 启动子突变与性别无关 ($P > 0.05$)。然而, TERT 启动子突变在肿瘤直径 ≤ 1 cm 的患者中突变率为 0, 明显低于直径 > 1 cm 者 (35%) ($P < 0.05$)。另外, TERT 启动子突变组与 TERT 野生组相比, 两者在是否侵犯甲状腺包膜、是否腺外转移、是否发生淋巴结转移差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 2)。

2.3 BRAF V600E 和 TERT 启动子共突变对 PTC 临床病理特征的影响 62 例 PTC 中 BRAF V600E 和 TERT 启动子共突变患者合计 13 例, 将 BRAF V600E 和 TERT 启动子共突变和均未突变的患者相比, 在肿瘤直径方面差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。但两组患者在性别、年龄、淋巴结转移、腺外侵犯方法差异均无统计学意义 (表 3)。

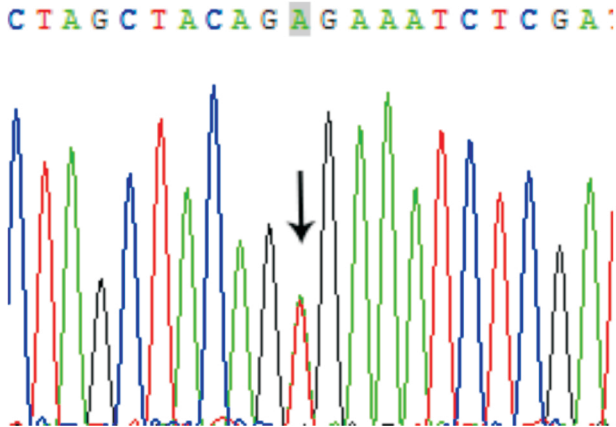


图3 BRAF V600E(T1799A) 基因杂合性突变(箭头所示)

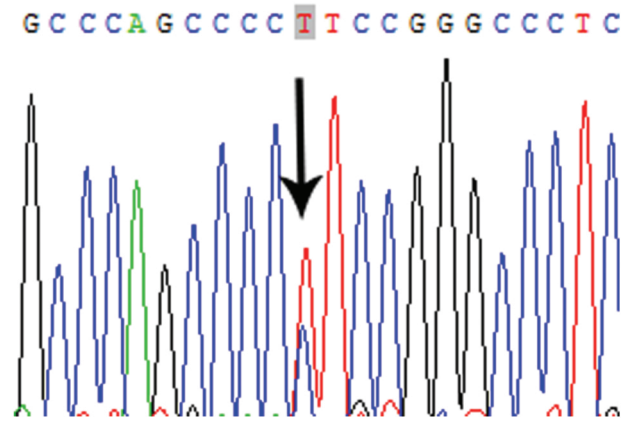


图5 TERT C228T 突变(箭头所示)

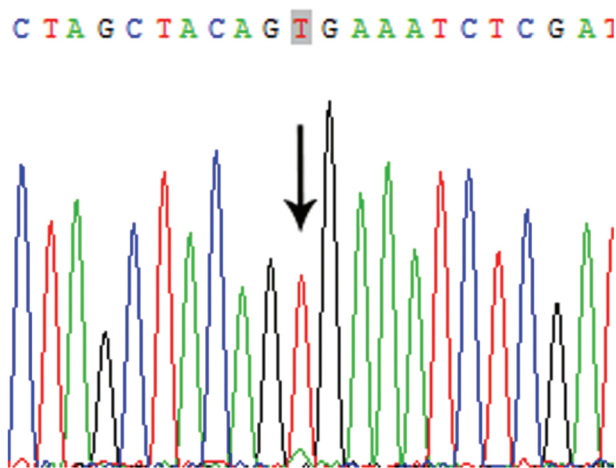


图4 未发生 BRAF V600E 基因突变(箭头所示)

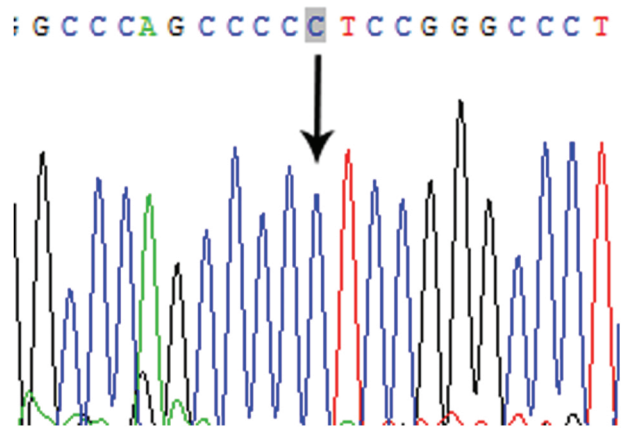


图6 未发生 TERT C228T 突变(箭头所示)

表1 BRAF V600E 突变与 PTC 临床病理特征的关系

临床病理参数	n	BRAF V600E 基因突变率		χ^2 值	P 值
		突变(%)	未突变(%)		
性别					
女	44	41(93.18)	3(6.82)	0.340	0.671
男	18	17(94.44)	1(5.56)		
年龄(岁)					
≤45	35	33(94.29)	2(5.71)	0.720	0.587
>45	27	25(92.59)	2(7.41)		
肿瘤直径(cm)					
≤1	25	21(84.00)	4(16.00)	6.328	0.023 [#]
>1	37	37(100.00)	0(0.00)		
侵犯甲状腺包膜					
有	12	12(100.00)	0(0.00)	1.026	0.413
无	50	46(92.00)	4(8.00)		
甲状腺腺外侵犯					
有	3	3(100.00)	0(0.00)	0.217	0.816
无	59	55(93.22)	4(6.78)		
发生淋巴结转移					
有	9	9(100.00)	0(0.00)	0.726	0.525
无	53	49(92.45)	4(7.55)		

[#]P < 0.05

表2 TERT C228T 突变与 PTC 临床病理特征的关系

临床病理参数	n	TERT 启动子突变		χ^2 值	P 值
		突变(%)	未突变(%)		
性别					
女	44	8(18.18)	36(81.82)	0.710	0.302
男	18	5(27.78)	13(72.22)		
年龄(岁)					
≤45	35	3(8.57)	32(91.43)	7.453	0.008 [#]
>45	27	10(37.04)	17(62.96)		
肿瘤直径(cm)					
≤1	25	0(0.00)	25(100.00)	11.114	0.000 [#]
>1	37	13(35.14)	24(64.86)		
侵犯甲状腺包膜					
有	12	2(16.67)	10(83.33)	0.166	0.515
无	50	11(22.00)	39(88.00)		
甲状腺腺外侵犯					
有	4	1(25.00)	3(75.00)	0.42	0.62
无	58	12(20.69)	46(79.31)		
发生淋巴结转移					
有	7	1(14.29)	6(85.71)	0.213	0.544
无	55	12(21.82)	43(78.18)		

[#]P < 0.05

表3 BRAF V600E 和 TERT 启动子联合突变与临床病理特征的关系

临床病理参数	n	BRAF V600E + TERT 启动子突变		χ^2 值	P 值
		共突变(%)	都未突变(%)		
性别					
女	11	8(72.73)	3(27.27)	0.243	0.555
男	6	5(83.33)	1(16.67)		
年龄(岁)					
≤45	5	3(60.00)	2(40.00)	1.068	0.330
>45	12	10(83.33)	2(16.67)		
肿瘤直径(cm)					
≤1	4	0(0.00)	4(100.00)	8.029	0.012 [#]
>1	13	13(100.00)	0(0.00)		
侵犯甲状腺包膜					
有	2	2(100.00)	0(0.00)	0.697	0.574
无	15	11(73.33)	4(26.67)		
甲状腺腺外侵犯					
有	1	1(100.00)	0(0.00)	0.327	0.765
无	16	12(75.00)	4(25.00)		
发生淋巴结转移					
有	1	1(100.00)	0(0.00)	0.327	0.765
无	16	12(75.00)	4(25.00)		

[#]P<0.05

3 讨论

关于 BRAF V600E 基因突变在 PTC 中的研究国内外有大量报道,各研究显示 BRAF 突变率在 27%~83% 不等,平均为 45%~50%^[3]。本实验中,BRAF V600E 突变率为 94%,明显高于平均水平,可能与材料的收集采用显微切割技术有关,显微切割镜下收集单纯的 PTC 癌细胞,提高了实验的准确性。文献报道关于 BRAF 基因突变与 PTC 临床病理特征的关系尚无一致的结论,虽然一些关于 BRAF 基因突变的 Meta 分析得出结论^[6-9],认为 BRAF 基因突变与 PTC 患者较差的临床病理特征有关,例如复发率、生存率、临床分期等,但是 Meta 分析具有一定局限性,PTC 患者的生活环境、人种、地区方面存在差异。在本实验中,采用单个地区的样本研究发现,BRAF 基因突变仅与 PTC 肿瘤大小显著相关,与 Jin 等^[3]的研究结果一致。有些研究中 BRAF 基因突变与 PTC 患者年龄显著相关^[10],但在本实验中 BRAF 基因突变与 PTC 患者年龄无相关性,与赖烨铃^[11]的研究结果相似。

在 PTC 患者中,TERT 启动子突变的位点主要是 C228T、C250T,有研究表明 C228T 突变更常见^[12]。PTC 中 TERT 启动子突变率 7.5%~27%^[13-14],其突变情况与 PTC 临床病理特征可能存在相关性。在本实验中 TERT 启动子突变率为 21%,仅与 PTC 患者年龄和肿瘤大小存在显著相关,与 Sun 等^[13,15]的报道一致。也有研究表明 TERT 启动子突变仅与甲状腺腺外侵犯和甲状腺包膜转移有关^[3],而本实验中未发现与这两个指标具有明显相关性。

总之,本实验利用显微切割获得无其他种类细胞污染的

PTC 肿瘤细胞,经 PCR 扩增后得到其 BRAF V600E 和 TERT 的突变,并分析这 2 个突变与临床病理特征的关系。由于样本量较小,研究结论还需大样本的进一步证实。

参考文献:

- [1] 侯森,崔文,张国安,等. 甲状腺乳头状癌中瘦素及其受体表达与临床特征的相关性 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2013,29(3):284-286.
- [2] Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016,66(2):115-132.
- [3] 杨旭辉. 甲状腺癌分子标记物的研究进展 [J]. 临床与病理杂志, 2015,36(6):1148-1156.
- [4] De La Chapelle A, Jazdzewski K. MicroRNAs in thyroid cancer [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2011,96(11):3326-3336.
- [5] Horn S, Figl A, Rachakonda P S, et al. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma [J]. Science, 2013,339(6122):959-961.
- [6] Moon S, Song Y S, Kim Y A, et al. Effects of coexistent BRAF V600E and TERT promoter mutations on poor clinical outcomes in papillary thyroid cancer: a meta-analysis [J]. Thyroid, 2017,27(5):651-660.
- [7] Jin L, Chen E, Dong S, et al. BRAF and TERT promoter mutations in the aggressiveness of papillary thyroid carcinoma: a study of 653 patients [J]. Oncotarget, 2016,7(14):18346-18355.
- [8] Zhang Q, Liu S Z, Zhang Q, et al. Meta-analyses of association between BRAF (V600E) mutation and clinicopathological features of papillary thyroid carcinoma [J]. Cell Physiol Biochem, 2016,38(2):763-776.
- [9] Li J, Zhang S, Zheng S, et al. The BRAF V600E mutation predicts poor survival outcome in patients with papillary thyroid carcinoma: a meta analysis [J]. Int J Clin Exp Med, 2015,8(12):22246-22253.
- [10] George J R, Henderson Y C, Williams M D, et al. Association of TERT promoter mutation, but not BRAF mutation, with increased mortality in PTC [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2015,100(12):E1550-E1559.
- [11] 赖烨铃. 甲状腺乳头状癌 BRAF V600E 基因突变探究 [J]. 中国现代药物应用, 2017,11(10):31-33.
- [12] Nasirden A, Saito T, Fukumura Y, et al. In Japanese patients with papillary thyroid carcinoma, TERT promoter mutation is associated with poor prognosis, in contrast to BRAF V600E mutation [J]. Virchows Arch, 2016,469(6):687-696.
- [13] Sun J, Zhang J, Lu J, et al. BRAF V600E and TERT promoter mutations in papillary thyroid carcinoma in chinese patients [J]. PLoS One, 2016,11(4):e0153319.
- [14] Xing M, Liu R, Liu X, et al. BRAF V600E and TERT promoter mutations cooperatively identify the most aggressive papillary thyroid cancer with highest recurrence [J]. J Clin Oncol, 2014,32(25):2718-2726.
- [15] Melo M, Gaspar Da Rocha A, Batista R, et al. TERT, BRAF and NRAS in primary thyroid cancer and metastatic disease [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2017,102(6):1898-1907.