

# BRAFV600E 在甲状腺乳头状癌与桥本甲状腺炎相关性中的研究

于亚静 杨彩哲 刘明 任力 王良宸 曹亚蕊

**【摘要】 目的** 研究 BRAFV600E 在甲状腺乳头状癌与桥本甲状腺炎中的表达,探讨甲状腺乳头状癌与桥本甲状腺炎的相关性。**方法** 北京空军总医院2012 年 1 月—2014 年 6 月经病理证实的甲状腺石蜡标本,甲状腺乳头状癌 40 例、桥本甲状腺炎 20 例、甲状腺乳头状癌伴桥本甲状腺炎 20 例、甲状腺腺瘤 20 例,采用免疫组化(Envision 法)检测 BRAFV600E 的表达并进行半定量分析,比较其在各组中的表达差异。**结果** 甲状腺乳头状癌 BRAFV600E 阳性率为 77.5% (31/40),桥本甲状腺炎 BRAFV600E 阳性率为 45.0% (9/20,  $P = 0.012$ )。甲状腺乳头状癌伴桥本甲状腺炎的肿瘤组织区域 BRAFV600E 阳性率为 70.0% (14/20),与单纯甲状腺乳头状癌的阳性率差异无统计学意义 ( $P = 0.156$ );而桥本甲状腺炎区域 BRAFV600E 阳性率为 55% (11/20,  $P = 0.527$ ),与单纯桥本甲状腺炎 BRAFV600E 的阳性率差异亦无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。甲状腺乳头状癌有转移者 BRAFV600E 阳性率 (88.2%, 15/17) 高于甲状腺乳头状癌未转移者 (69.5%, 16/23,  $P = 0.030$ )。甲状腺腺瘤中未检测到 BRAFV600E。**结论** 甲状腺乳头状癌和桥本甲状腺炎均呈现较高的 BRAFV600E 突变率。

**【关键词】** 甲状腺乳头状癌;桥本甲状腺炎;BRAFV600E

**Study of BRAFV600E in the correlation between papillary thyroid carcinoma and Hashimoto's thyroiditis** Yu Yajing, Yang Caizhe, Liu ming, Ren Li, Wang Liangchen, Cao Yaru. Department of Endocrinology, Air Force General Hospital, Beijing 100142, China

Corresponding author: Yang Caizhe, Email: yangcaizhe2008@163.com

**【Abstract】 Objective** To explore the expression of BRAFV600E in papillary thyroid carcinoma and Hashimoto's thyroiditis, and investigate the correlation between papillary thyroid carcinoma and Hashimoto's thyroiditis. **Methods** The paraffin embedded tissue specimens of pathologically confirmed thyroid disease during 2012.1-2014.6 in the Air Force General Hospital were collected, including 40 cases of papillary thyroid carcinoma, 20 cases of Hashimoto's thyroiditis, 20 cases of papillary thyroid carcinoma with Hashimoto's thyroiditis and 20 cases of thyroid adenoma. Immunohistochemistry (Envision method) was used to detect the expression of BRAFV600E and semi quantitative analysis was used to compare the difference of different thyroid diseases. **Results** The positive rate of BRAFV600E was 77.5% (31/40) in papillary thyroid carcinoma and 45% (9/20) in Hashimoto's thyroiditis ( $P = 0.012$ ). In papillary thyroid carcinoma with Hashimoto's thyroiditis, the positive rate of BRAFV600E in thyroid papillary carcinoma tissue was 70.0% (14/20), which was not different from thyroid papillary carcinoma ( $P = 0.156$ ); and the positive rate of BRAFV600E in Hashimoto's thyroiditis tissue was 55.0% (11/20), which was not different from Hashimoto's thyroiditis ( $P = 0.527$ ). The positive rate of BRAFV600E in metastatic papillary thyroid carcinoma was 88.2% (15/17), which was higher than that in papillary thyroid carcinoma without metastasis (69.5%, 16/23,  $P = 0.030$ ). There was no expression of BRAFV600E in thyroid adenoma. **Conclusion** Papillary thyroid carcinoma and Hashimoto's thyroiditis have a higher BRAFV600E mutation rate.

**【Key words】** Thyroid papillary carcinoma; Hashimoto's thyroiditis; BRAFV600E

(Int J Endocrinol Metab, 2014, 34; 375-378)

甲状腺癌是内分泌系统最常见的恶性肿瘤,主要有甲状腺乳头状癌、甲状腺滤泡状癌、甲状腺髓样癌、甲状腺未分化癌,其中甲状腺乳头状癌占60%~80%<sup>[1]</sup>。2003年北京甲状腺癌患病率为3.19/10万,2012年为15.74/10万,患病率持续上升,其机制可能与电离辐射、环境因素、免疫紊乱、内分泌失调、基因突变等多种因素相关。桥本甲状腺炎是最常见的自身免疫性甲状腺疾病,是原发性甲状腺功能减退症的最常见原因。近年来发现甲状腺乳头状癌合并桥本甲状腺炎的患病率逐年上升。多数学者认为甲状腺乳头状癌与桥本甲状腺炎具有相关性,桥本甲状腺炎是甲状腺乳头状癌的危险因素<sup>[2]</sup>。随着对肿瘤分子水平研究的深入,现已发现多种基因突变与甲状腺乳头状癌的发生、发展、转归有关。BRAF基因是原癌基因,是经典丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路的关键分子,BRAFV600E是BRAF基因突变蛋白质。研究认为BRAFFV600E与甲状腺乳头状癌的侵袭性、转移及复发高风险相关<sup>[3]</sup>。BRAFFV600E是否存在于桥本甲状腺炎患者,是否是桥本甲状腺炎发生癌变的原因,目前国内外尚无报道。为此本研究采用免疫组化方法检测BRAFFV600E在不同甲状腺疾病中的表达差异,探讨BRAFFV600E是否是桥本甲状腺炎癌变的分子基础。

## 1 材料与方法

1.1 一般材料 收集2012年1月—2014年6月在北京空军总医院因甲状腺结节手术患者石蜡标本100例,男16例,女84例,年龄25~78岁,平均年龄(47.38±11.60)岁。其中,甲状腺乳头状癌40例,甲状腺乳头状癌合并桥本甲状腺炎20例,桥本甲状腺炎20例,甲状腺腺瘤20例。所有蜡块3μm切片,每例4张,1张HE染色重新确诊,实验组3张切片,结果取平均值。

### 1.2 方法

1.2.1 主要试剂 鼠抗人BRAFFV600E单克隆抗体(产品编号E19290,克隆号VE1,抗体稀释浓度为1:70)、Dako REALTM EnVisionTM Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse(Dako公司免疫组化的一个系统的试剂,包括二抗、修复液、染色等试剂)。

1.2.2 免疫组化 采用Envision法,蜡块3μm切片,烤片仪70℃烤片3h(B04083001烤片仪),二甲苯I、II、III脱蜡各10min,乙醇100%、95%、80%、70%各5min脱二甲苯,自来水冲洗,95℃高温TM-

Flex修复20min,pH值9.0(全自动免疫组化预处理系统PTlink),水洗,蒸馏水配置新鲜3%过氧化氢封闭10min以消除过氧化物酶,水洗、蒸馏水、PBS冲洗3min×3次,滴加一抗,4℃过夜,水洗,PBS冲洗3min×3次,滴加二抗,37℃孵育30min,水洗,PBS冲洗3min×3次,新鲜配置DAB显色3~5min,自来水冲洗,苏木精复染,盐酸酒精分化,自来水返蓝,脱水,透明,中性树胶封片,显微镜下观察结果。

1.3 结果判断及标准 由两位病理专家阅片,每例3张切片,细胞质中出现棕黄色颗粒为阳性,每张切片阅读时避开坏死及边缘区,随机选取5个高倍视野(×400),采用半定量积分法对每张切片的阳性细胞率及阳性细胞着色强度分别进行分记分,取3张切片平均值为该病例染色结果。切片阳性细胞的染色强度按无着色0分,浅黄色1分,棕黄2分,棕褐色3分;按阳性细胞染色百分率分别积分<5%为0分,5%~25%为1分,26%~50%为2分,51%~75%为3分,>75%为4分,根据2项乘积法确定阳性程度,两者相乘,1~4分为弱阳性(+),5~8分为中度阳性(++),9~12分为强阳性(+++)<sup>[4]</sup>。

1.4 统计学处理 采用SPSS17.0统计软件进行数据分析,计数资料用率(%)表示,组间比较采用 $\chi^2$ 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 甲状腺标本BRAFFV600E阳性比较 甲状腺乳头状癌BRAFFV600E阳性率(77.5%,31/40)高于桥本甲状腺炎(45.0%,9/20),差异有统计学意义( $P=0.012$ )。甲状腺乳头状癌伴桥本甲状腺炎中,甲状腺乳头状癌区BRAFFV600E阳性率为70%(14/20),低于单纯甲状腺乳头状癌,差异无统计学意义( $P=0.156$ )。桥本甲状腺炎区BRAFFV600E阳性率为55.0%(11/20),高于单纯桥本甲状腺炎,差异无统计学意义( $P=0.527$ )。甲状腺乳头状癌BRAFFV600E强阳性率高于其余3种病变。甲状腺腺瘤阴性。见表1,图1(封3)。

2.2 BRAFFV600E与甲状腺乳头状癌及桥本甲状腺炎临床病理特征的关系 BRAFFV600E蛋白表达与甲状腺乳头状癌和桥本甲状腺炎各临床病理参数的关系见表2,表3。甲状腺乳头状癌转移者BRAFFV600阳性率88.2%(15/17)高于甲状腺乳头状癌未转移者69.5%(16/23),差异有统计学意义。

表 1 BRAFV600E 在患者中的表达

病变	区域	例数 (n)	-	+	++	+++	总阳性率	$\chi^2$ 值	P 值
桥本甲状腺炎		20	11	6	3	0	45.0%	6.338	0.012 <sup>a</sup>
甲状腺乳头状癌		40	9	17	7	7	77.5%		
甲状腺乳头状癌伴桥本甲状腺炎	甲状腺乳头状癌区域	20	6	9	4	1	70.0%	1.200	0.156 <sup>b</sup>
	桥本甲状腺炎区域	20	9	7	3	1	55.0%	0.400	0.527 <sup>c</sup>
甲状腺腺瘤		20	20	0	0	0	0%		

注:a:甲状腺乳头状癌与桥本甲状腺炎 BRAFV600E 阳性率比较,b:甲状腺乳头状癌伴桥本甲状腺炎中甲状腺乳头状癌区和单纯甲状腺乳头状癌 BRAFV600E 阳性率比较,c:甲状腺乳头状癌伴桥本甲状腺炎中桥本甲状腺炎区和单纯桥本甲状腺炎 BRAFV600E 阳性率比较

表 2 BRAFV600E 与甲状腺乳头状癌临床主要病理参数的关系

甲状腺乳头状癌患者		例数 (n)	-	+	++	+++	总阳性率	$\chi^2$ 值	P 值
性别	男	8	2	4	0	2	75.0%	0.036	0.850
	女	32	7	13	7	5	78.1%		
年龄	<45 岁	16	2	8	3	3	87.5%	1.529	0.216
	≥45 岁	24	7	9	4	4	70.8%		
结节直径	<1 cm	19	3	13	2	1	84.2%	0.935	0.334
	≥1 cm	21	6	4	5	6	71.4%		
是否转移	是	17	2	5	5	5	88.2%	0.044	0.030
	否	23	7	12	2	2	69.5%		
病灶数	单发	10	2	2	2	4	80.0%	0.048	0.827
	多发	30	7	15	5	3	76.6%		

表 3 BRAFV600E 与桥本甲状腺炎临床主要病理参数的关系

桥本甲状腺炎患者		例数 (n)	-	+	++	+++	阳性率	$\chi^2$ 值	P 值
性别	男	0	0	0	0	0	0	0.020	0.888
	女	20	11	6	3	0	45.0%		
年龄	<45 岁	7	4	2	1	0	42.8%		
	≥45 岁	13	7	4	2	0	46.1%		
结节直径	<1 cm	5	2	1	2	0	60.0%	0.606	0.436
	≥1 cm	15	9	5	1	0	40.0%		
病灶数	单发	1	0	1	0	0	100%	1.287	0.257
	多发	19	11	7	1	0	42.1%		

3 讨论

BRAF 基因又名鼠类肉瘤滤过性毒菌 (V-Raf) 致癌同源体 B1,为原癌基因,是经典 MAPK 信号通路的关键分子,BRAF 基因第 15 外显子第1 799位核苷酸中胸腺嘧啶被腺嘌呤替代 (T1799A),导致翻译蛋白质 600 位密码子对应的缬氨酸被谷氨酸替代即 BRAFV600E,向 MAPK 信号通路下游受体酪氨酸激酶和胞浆蛋白激酶级联反应传递有丝分裂信号,促进肿瘤的持续生长、浸润和转移。研究表明,BRAFV600E 与结肠癌、非小细胞肺癌、甲状腺乳头

状癌等多种肿瘤相关<sup>[3,5-6]</sup>。甲状腺乳头状癌发病是多基因、多步骤的过程,80% 的基因突变发生在 RET/PTC-RAS-RAF-MAPK 信号通路中,而 braf 基因突变率最高<sup>[7]</sup>。

BRAFV600E 突变参与肿瘤发生的机制为:(1) 活化 MAPK 通路,直接促进肿瘤细胞生长。(2) 导致甲状腺内碘代谢相关基因的表达缺失,并影响碘转运蛋白错误地定位于细胞质内,引起甲状腺乳头状癌患者对放射性碘摄取降低,进而导致放射性碘治疗失败和疾病复发。(3) 促进肿瘤血管形成和侵

侵袭性增强。(4)与某些肿瘤抑制基因和 DNA 修复基因的异常甲基化和表达减少有关<sup>[8]</sup>。(5) BRAF 基因突变能增加抑制素 (prohibitin) 释放素的活性, 导致抑制素分泌增多, 而抑制素有促甲状腺乳头状癌形成的作用<sup>[9]</sup>。(6) BRAF 基因参与甲状腺乳头状癌进展的机制与细胞外基质微环境、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号转导通路的过度活化等有关<sup>[10]</sup>。

本研究中甲状腺乳头状癌 BRAFV600E 阳性率 77.5% (31/40), 桥本甲状腺炎 BRAFV600E 阳性率为 45.0% (9/20), 首次发现 BRAFV600E 在桥本甲状腺炎表达阳性。甲状腺乳头状癌桥本甲状腺炎区 BRAFV600E 突变率高于单纯桥本甲状腺炎, 差异无统计学意义, 考虑与样本量较少等因素相关。甲状腺乳头状癌 BRAFV600E 表达强阳性率多于桥本甲状腺炎, 而桥本甲状腺炎中无强阳性表达, 提示 BRAFV600E 可能是甲状腺乳头状癌与桥本甲状腺炎相关性机制之一。与前期回顾性临床资料研究结果及相关临床研究一致, 甲状腺乳头状癌与桥本甲状腺炎存在相关性, 桥本甲状腺炎是甲状腺乳头状癌的危险因素<sup>[11]</sup>。

另外, 本研究中, 甲状腺乳头状癌伴桥本甲状腺炎的甲状腺乳头状癌组织 BRAFV600E 阳性率较单纯甲状腺乳头状癌 BRAFV600E 表达率低, 差异无统计学意义。Marotta 等<sup>[12]</sup>发现伴有桥本甲状腺炎的甲状腺癌 BRAF 基因突变率较单纯甲状腺乳头状癌低, 本研究中未发现二者存在差异, 可能与样本数量较少有关。伴桥本甲状腺炎的甲状腺乳头状癌 BRAF 基因突变率低, 这可能是 Jeong 等<sup>[13]</sup>认为的伴有桥本甲状腺炎的甲状腺乳头状癌预后较好的机制之一, 认为桥本甲状腺炎合并甲状腺癌特点为年龄较小、女性、多病灶、癌灶较小、包膜外侵犯、淋巴转移及远处转移较少, 伴有桥本甲状腺炎的甲状腺癌预后较好。

本研究中, 甲状腺乳头状癌中, 有转移者 BRAFV600E 阳性率高于无转移者。Kim 等<sup>[14]</sup>研究认为甲状腺乳头状癌 BRAF 基因 V600E 突变率为 28%~83%。He 等<sup>[3]</sup>认为 BRAFV600E 与甲状腺乳头状癌的侵袭性、转移及复发高风险相关。但是本研究中结节大小及年龄等临床参数与 BRAFV600E 蛋白表达无关, 考虑可能与样本量较小及免疫组化受复杂因素影响有关。

本研究尚存在不足之处, 如样本量较小, 可能会影响统计结果及阳性率, 选择手术患者多为临床参考指标倾向于恶性者, 实验结果可能存在偏倚。免

疫组化的方法也存在着一定的误差, 还需要进一步前瞻性、多中心、大样本的临床研究及基础研究, 探索 BRAFV600E 在甲状腺乳头状癌与桥本甲状腺炎相关性中的作用。

## 参 考 文 献

- [1] Enewold L, Zhu K, Ron E, et al. Rising thyroid cancer incidence in the United States by demographic and tumor characteristics, 1980-2005 [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009, 18 (3): 784-791.
- [2] Paulson LM, Shindo ML, Schuff KG. Role of chronic lymphocytic thyroiditis in central node metastasis of papillary thyroid carcinoma [J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2012, 147 (3): 444-449.
- [3] He C, Zhao B, Zhang X, et al. Prognostic value of the BRAF V600E mutation in papillary thyroid carcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2014, 7 (2): 439-443.
- [4] 江晓棠, 解乃昌. 甲状腺乳头状癌 BRAFV600E 突变蛋白质的表达及意义 [J]. *广东医学*, 2013, 34 (6): 931-933.
- [5] Sclafani F, Gonzalez D, Cunningham D, et al. RAS mutations and cetuximab in locally advanced rectal Cancer: results of the EXPERT-C trial [J]. *Eur J Cancer*, 2014, 50 (8): 1430-1436.
- [6] Gibault L, Cazes A, Narjoz C, et al. Molecular profiling of non-small cell lung cancer [J]. *Rev Pneumol Clin*, 2014, 70 (1-2): 47-62.
- [7] 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; discussion 470-471.
- [8] Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications [J]. *Endocr Rev*, 2007, 28 (7): 742-762.
- [9] Franzoni A, Dima M, D'agostino M, et al. Prohibitin is overexpressed in papillary thyroid carcinomas bearing the BRAF (V600E) mutation [J]. *Thyroid*, 2009, 19 (3): 247-255.
- [10] Faustino A, Couto JP, Pópulo H, et al. mTOR pathway overactivation in BRAF mutated papillary thyroid carcinoma [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97 (7): E1139-E1149.
- [11] 闫慧娴, 谷伟军, 杨国庆, 等. 桥本甲状腺炎与甲状腺乳头状癌关系的临床研究 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2014, 30 (4): 302-306.
- [12] Marotta V, Guerra A, Zatelli MC, et al. BRAF mutation positive papillary thyroid carcinoma is less advanced when Hashimoto's thyroiditis lymphocytic infiltration is present [J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2013, 79 (5): 733-738.
- [13] Jeong JS, Kim HK, Lee CR, et al. Coexistence of chronic lymphocytic thyroiditis with papillary thyroid carcinoma: clinical manifestation and prognostic outcome [J]. *J Korean Med Sci*, 2012, 27 (8): 883-889.
- [14] 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.

(收稿日期: 2014-08-25)