

Galectin-3、CK-19、*MiRNA221* 对细针穿刺标本中 *BRAF*^{V600E} 阴性及细胞病理不确定甲状腺结节的诊断价值

阮义生¹ 朱梅¹ 郭亮¹ 唐勇²

¹合肥市第八人民医院内分泌科,合肥 238000; ²合肥市第八人民医院病理科,合肥 238000

通信作者:阮义生,Email:chinafeng24@126.com

【摘要】 目的 探讨半乳糖凝集素-3(Gal-3)、细胞角蛋白 19 片段(CK-19)及微小 *RNA221*(*MiR221*)对 *BRAF*^{V600E} 阴性、细胞病理(TBSRTC)Ⅲ~V 类甲状腺结节的诊断价值。方法 回顾我院甲状腺结节手术治疗的患者的资料。以术后组织病理为金标准,建立基于二分类变量的决策树模型。分析模型、3 种标记物单独或组合后的受试者工作特征曲线(ROC),比较曲线下面积(ROC_{AUC})的差异。结果 纳入甲状腺结节 115 例,恶性 46 例,良性 69 例。Gal-3、CK-19 和 *MiR221* 的 ROC_{AUC} 分别为 0.808、0.848、0.669;两个标记物阳性(组合 1)和 3 个均阳性(组合 2)的 ROC_{AUC} 分别为 0.873、0.812;CK-19、Gal-3 和 TBSRTC 进入决策树模型,模型 ROC_{AUC} = 0.942。两两比较后,决策树模型、*MiR221* ROC_{AUC} 与其他 ROC_{AUC} 差异均有统计学意义($P \leq 0.05$);CK-19、Gal-3、组合 1 及组合 2 之间的 ROC_{AUC} 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结论 CK-19、Gal-3 和 TBSRTC 对 *BRAF*^{V600E} 阴性及细胞病理不确定恶性甲状腺结节具有较高的诊断价值。

【关键词】 甲状腺结节;细胞角蛋白 19 片段;半乳糖凝集素-3;微小 *RNA221*

DOI:10.3760/cma.j.cn121383-20220611-06025

Diagnostic value of Galectin-3、CK-19 and *MiRNA221* in thyroid nodule with indeterminate FNAC and negative *BRAF*^{V600E}

Ruan Yisheng¹, Zhu Mei¹, Guo Liang¹, Tang Yong². ¹Department of Endocrinology, Hefei Eighth People's Hospital, Hefei 238000, China; ²Department of Pathology, Hefei Eighth People's Hospital, Hefei 238000, China

Corresponding author: Ruan Yisheng, Email: chinafeng24@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the diagnostic value of Galectin-3 (Gal-3), Cytokeratin 19 (CK-19) and MicroRNA221 (*MiR221*) in TBSRTC Ⅲ-V thyroid nodule with negative *BRAF*^{V600E}. **Methods** Data of patients who undergoing thyroid nodule surgery in our hospital were retrospectively analyzed. Taking postoperative histopathology as the diagnostic standard, a dichotomous decision tree model was established. Receiver operating characteristic curves (ROC) of the model and the markers alone or combination were analyzed, and the area under the ROC (ROC_{AUC}) was compared in pairs. **Results** Among 115 cases, 46 were malignant and 69 were benign. ROC_{AUC} of Gal-3, CK-19 and *MiR221* was 0.808, 0.848 and 0.669, respectively. ROC_{AUC} of two positive markers (combination 1) and three positive (combination 2) was 0.873, 0.812, respectively. CK-19, Gal-3 and TBSRTC entered the model, and the ROC_{AUC} was 0.942. After paired comparison of ROC_{AUC}, the model and *MiR221* was significantly different ($P \leq 0.05$) from others, respectively; the difference, between CK-19, Gal-3, combination 1 and combination 2, was not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusion** CK-19, Gal-3 and TBSRTC Combination has a high diagnostic value in TBSRTC Ⅲ-IV thyroid nodule with negative *BRAF*^{V600E}.

【Keywords】 Thyroid nodule; Cytokeratin 19; Galectin-3; MicroRNA221

DOI:10.3760/cma.j.cn121383-20220611-06025

细针穿刺细胞学病理(FNAC)是术前区分甲状腺结节良恶性的首选方法。甲状腺细胞病理报告系统(TBSRTC)中有 15%~30%为不确定结节(Ⅲ~Ⅴ类)。多国指南均推荐行 *BRAF*^{V600E} 基因检测来提高Ⅲ~Ⅴ类结节中甲状腺癌的检出率。

BRAF^{V600E} 是甲状腺癌中最常见的突变基因,诊断特异性可高达 100%,但近 40%的恶性结节为野生型,敏感性低^[1]。在 TBSRTC Ⅲ-Ⅴ类结节中恶性率为 10%~75%^[2],其中仅 36%~63%存在 *BRAF*^{V600E} 突变,如何鉴别这类结节的良恶性是临床工作中一项挑战。

微小 *RNA221*(*MiR221*)生物学稳定,常用于甲状腺癌的筛查。细胞角蛋白 19(CK-19)是一种来源于上皮细胞的肿瘤标志物,可表达于甲状腺癌中。*Galectin-3*(Gal-3)是一种半乳糖结合蛋白,与多种恶性肿瘤有关,在甲状腺癌中显著升高。

本研究旨在探讨免疫标记物 Gal-3、CK-19 和分子标记物 *MiR221* 在 *BRAF*^{V600E} 阴性、TBSRTC Ⅲ~Ⅴ类结节中的诊断价值。本研究遵循《赫尔辛基宣言》,并获得医院伦理委员会批准。

1 资料与方法

1.1 临床资料 回顾 2017 年 1 月至 2022 年 1 月在合肥市第八人民医院行甲状腺结节手术患者的资料,选取术前 *BRAF*^{V600E} 基因检测阴性且 FNAC 不确定的患者。排除:(1)术后组织病理不确定患者。(2)留存的细胞涂片不足 6 张的患者。

1.2 方法 对收集的细胞涂片标本进行 CK-19、Gal-3 免疫染色和 *MiR221* 分子测定。

1.2.1 细胞涂片准备 将细胞涂片标本去固定胶、去杂质、再水化和脱色后,用 3% H₂O₂ 淬灭内源性过氧化酶,5% 酪蛋白溶液封闭非特异性抗体后待用。

1.2.2 CK-19 免疫染色 采用 En Vision 二步法手工染色,严格按照产品说明书(北京中杉金桥生物科技有限公司)操作。结果判定:胞质内出现黄色颗粒状物质为阳性着色。依据着色比例计分:比例 ≥71%计 3 分,36%~70%计 2 分,6%~35%计 1 分,≤5%计 0 分;依据着色强度计分:棕黄色 2 分,淡黄色 1 分,无着色 0 分。两项计分总和 ≥3 分判定为阳性。

1.2.3 Gal-3 免疫染色 按产品说明书操作,标本经 Gal-3 抗体(北京中杉金桥生物科技有限公司)孵育过夜后行免疫组化染色,观察 6 个视野,超过 10% 细胞被染色,则判定为阳性。

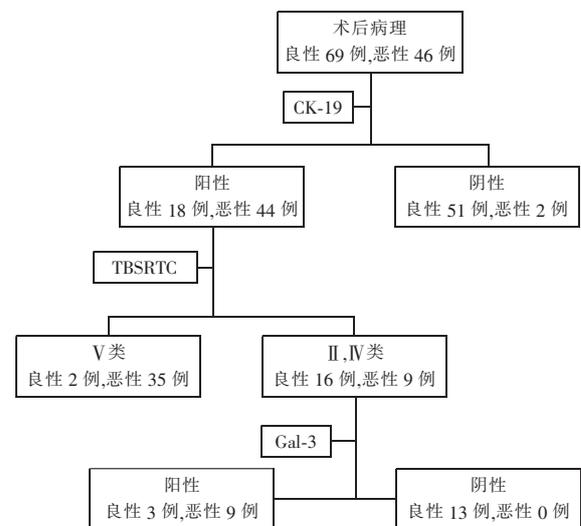
1.2.4 *MiR221* 分子测定 利用试剂盒提取甲状腺细胞 *MiRNA*,采用加 A 法进行反转录,用荧光探针检测 *MiRNA221* 的表达量。严格按试剂盒(新海基因生物科技有限公司)说明书操作。内参基因选择 U6,引物序列(F: TGCGGAGCTACATTGTCTGCTGG; R: CCAGTGCAGGG-TCCGAGGT)由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3 建立决策树模型 应用 IBM SPSS Modeler C5.0 软件,以组织病理为输出变量,纳入所有分类变量建立决策树模型。训练数据为 70%,测试数据为 30%;对全局进行修剪,修剪严重性赋值为 75%;叶最小记录数为 2。记录每个叶中的结果,见图 1。

1.4 统计学处理 定性资料以例或率(%)表示,采用 χ^2 检验。定量资料正态分布以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验;非正态分布以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,采用 *Mann-Whitney U* 检验。以组织病理为金标准,分析决策树模型、单个标记物及标记物组合(组合 1:两种标志物阳性集合;组合 2:3 种标志物均阳性)的敏感性(Sen)、特异性(Spec)、阳性预测值(PPV)、阴性预测值(NPV);用受试者工作特征曲线下面积(ROC_{AUC})描述诊断价值,采用 DeLong 比较 ROC_{AUC}。所有数据均经 MedCalc20 软件进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 纳入患者 115 例,术后病理良性 69 例,恶性 46 例。性别、TBSRTC 差异具有统计学意义,男性高于女性,Ⅴ类结节高于Ⅲ、Ⅳ类结节;年龄、结节直径、家族史等差异无统计学意义(表 1)。



注:Gal-3: 半乳糖凝集素-3;CK-19: 细胞角蛋白 19 片段; TBSRTC: 甲状腺细胞病理学 Bethesda 报告系统

图 1 基于 CK-19、TBSRTC 和 Gal-3 甲状腺结节决策树模型

表 1 115 例患者的一般临床资料情况表 [n, ($\bar{x} \pm s$)]

术后组织病理	良性	恶性	$\chi^2/t(Z)$ 值	P 值
性别(例)				
男(20)	7	13	6.250	0.012
女(95)	62	33		
平均年龄(岁)	41.77±14.31	39.04±12.27	1.040(<i>t</i>)	0.301
结节直径(cm)	2.40(21.78,3.05)	2.05(1.40,2.90)	1.959(<i>Z</i>)	0.0501
TI-RADS(例)				
3级(10)	8	2	4.553	0.208
4a级(55)	36	19		
4b级(39)	20	19		
4c级(11)	5	6		
TBSRTC(例)				
III(32)	28	4	20.194	0.000
IV(20)	13	7		
V(63)	28	35		
甲状腺癌家族史(例)				
无(113)	69	44	3.027	0.082
有(2)	0	2		
局部放疗史(例)				
无(114)	69	45	1.500	0.221
有(1)	0	1(鼻咽癌)		
TSH(例)				
正常(94)	58	36		
升高(21)	11	10	0.616	0.433
降低(0)	0	0		
TPO-Ab(例)				
阴性(45)	24	21	1.357	0.250
阳性(70)	45	25		
TG-Ab(例)				
阴性(56)	30	26	1.863	0.187
阳性(59)	39	20		
淋巴结浸润(例)	0	2		
结外转移(例)	0	0		

注:TBSRTC:甲状腺细胞病理学 Bethesda 报告系统;TSH:促甲状腺激素;TPO-Ab:甲状腺过氧化物酶抗体;TG-Ab:甲状腺球蛋白抗体

2.2 CK-19 阴性样本中良性 51 例,恶性 2 例。阳性样本中恶性 44 例,良性 18 例。按组织病理将结节分为良性和恶性组,两组间差异存在统计学意义(表 2)。其 Sen、Spec、PPV、NPV、ROC_{AUC} 及 95% 的可信区间(95% CI)见表 3。

2.3 Gal-3 阴性样本中良性 56 例,恶性 9 例。阳性样本中恶性 37 例,良性 13 例。良恶性结节差异具有统计学意义(表 2)。其 Sen、Spec、PPV、NPV、

ROC_{AUC} 及 95% CI 见表 3。

2.4 MiR221 由于 MiR221 表达的高度可变性,良性组和恶性组的平均值差异无统计学意义。鉴于其 ROC_{AUC} 大于 0.5,我们定义约登指数(3.63)为临界点,高于此值为高表达组,低于此值为低表达组。MiR221 在恶性结节中呈高表达,良性结节中呈低表达,差异有统计学意义(表 2)。其 Sen、Spec、PPV、NPV、ROC_{AUC} 及 95% CI 见表 3。

表 2 CK-19、Gal-3 免疫组化和 MiR221 分子检测结果

组织病理	CK-19		CK-19		MiR221	
	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性
良性(例)	51	18	56	13	41	28
恶性(例)	2	44	9	37	9	37
χ^2 值	53.288		42.238		17.685	
P 值	0.000		0.000		0.000	

注:Gal-3:半乳糖凝集素-3;CK-19:细胞角蛋白 19 片段;MiR221:微小 RNA221

表 3 免疫组化和分子标记物单一或组合、决策树模型诊断参数

项目	Sen (%)	Spec (%)	PPV (%)	NPV (%)	+LR	-LR	ROC _{AUC}	SE 值	95% CI
单项标记物									
CK-19	95.72	73.90	70.96	96.23	3.67	0.06	0.848	0.031	0.796, 0.908
Gal-3	80.40	81.20	74.00	86.15	4.27	0.24	0.808	0.038	0.724, 0.875
MiR221	80.41	59.41	56.92	82.00	1.98	0.33	0.699	0.042	0.607, 0.781
标记物组合									
组合 1	93.48	81.16	76.80	94.90	4.96	0.08	0.873	0.030	0.798, 0.928
组合 2	65.22	97.10	93.71	80.7	22.5	0.36	0.812	0.037	0.728, 0.878
决策树	95.65	92.75	89.80	96.97	13.2	0.04	0.942	0.022	0.882, 0.977

注:Gal-3:半乳糖凝集素-3;CK-19:细胞角蛋白 19 片段;MiR221:微小 RNA221;Sen:敏感性;Spec:特异性;PPV:阳性预测值;NPV:阴性预测值;组合 1:3 种标记物中任意两种阳性集合;组合 2:3 种标记物均为阳性集合

2.5 决策树模型 模型仅纳入 CK-19、Gal-3 和 TBSRTC3 个变量(图 1),其训练、测试的正确率分别为 96.34%和 87.88%。笔者规定模型中二分类的规则如下,恶性预测:CK19 阳性时,若为 V 类结节,则归类为恶性,若为 III~IV 类结节,Gal-3 阳性则归类恶性;否则归类良性。按上述规则,模型将 66 例结节归为良性,49 例归为恶性,假阴性 2 例,假阳性 5 例。其 Sen, Spec, ROC_{AUC}, PPV, NPV 见表 3。

2.6 诊断效能评价 ROC_{AUC} 两两比较结果见图 2 和表 4。CK-19、Gal-3 的 ROC_{AUC} 差异无统计学意义,均高于 MiR221 ROC_{AUC}(差异具有统计学意义)。

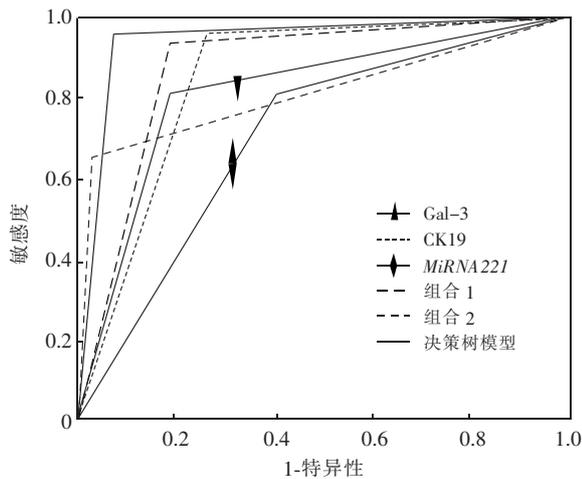


图 2 CK-19、Gal-3、MiR221 单一或组合、决策树模型的 ROC

组合 1 敏感性、特异性均有所提升;组合 2 敏感性最低(65.22%),特异性最高(97.10%);两种组合 ROC_{AUC} 差异无统计学意义。所有组合 ROC_{AUC} 与 CK19、Gal-3 ROC_{AUC} 差异均无统计学意义,但均高于 MiR221。上述结果提示,3 种标记物中 MiR221 诊断效能最低;3 种标记物无论如何组合,诊断效能均不优于单一免疫标记物。决策树模型 ROC_{AUC} 与 CK-19、Gal-3、MiR221、组合 1 及组合 2 的 ROC_{AUC} 差异均有统计学意义,提示该模型显著提高

免疫组化标记物对甲状腺结节诊断价值。

表 4 免疫组化、分子标记物、决策树模型的

ROC _{AUC} 两两比较结果			
ROC _{AUC} 1	ROC _{AUC} 2	Z 值	P 值
CK-19	Gal-3	0.857	0.392
CK-19	MiR221	2.983	0.003
CK-19	组合 1	0.833	0.405
CK-19	组合 2	0.847	0.397
Gal-3	MiR221	2.009	0.045
Gal-3	组合 1	1.830	0.067
Gal-3	组合 2	0.104	0.917
Mi221	组合 1	4.538	<0.001
M221	组合 2	2.826	0.005
组合 1	组合 2	1.531	0.126
决策树模型	CK-19	3.973	<0.001
决策树模型	Gal-3	3.531	<0.001
决策树模型	MiR221	5.304	<0.001
决策树模型	组合 1	2.371	0.018
决策树模型	组合 2	3.587	<0.001

注:Gal-3:半乳糖凝集素-3;CK-19:细胞角蛋白 19 片段;MiR221:微小 RNA221;ROC_{AUC}:受试者工作特征曲线下面积;组合 1:3 种标记物中任意两种阳性集合;组合 2:3 种标记物均为阳性集合

3 讨论

甲状腺结节中为 7%~15%为恶性,鉴别结节良恶性是临床医生一项重要的公共卫生和个体化管理的挑战^[3]。TBSRTC III~V 类(占 15%~30%)结节恶性率为 10%~75%^[2]。多国指南推荐如 BRAF^{V600E}、RET、RAS 等基因检测以提高 FNAC 诊断准确率。BRAF^{V600E} 突变在细胞学不确定的结节中其特异性仍高达 100%,但较低的敏感性使其阴性预测率下降^[4]。本研究中经过 BRAF^{V600E} 基因筛选,恶性结节仍占有所有结节的 40%。其可能原因有:(1)研究人群中 43.48%的患者 TI-RADS 4b 级及以上,提示研究对象中结节恶性概率高达 50%以上^[5],属高危人群。(2)临床实践中 V 类结节多数选择手术治疗,使纳入的 V 类标本比例明显过高(54.78%)。因此,BRAF^{V600E} 阴性的 III~V 类甲状腺结节仍是临床医生鉴别的重点。

研究报道 CK-19 对甲状腺癌诊断敏感性可高

达 100%，特异性相对较低，单独应用时价值有限^[6]。本研究显示 CK-19 阳性结节中良性结节约占 1/3，特异性仅为 73.90%，敏感性高达 95.72%，与报道结果一致。决策树模型显示，将 CK-19 阴性结节归类为良性时仅有 2 例假阴性，可 100% 排除上皮细胞来源的甲状腺癌。作者认为利用 CK19 高达 96.23% 的阴性预测率，可筛检出良性结节。CK-19 阳性时，需要结合特异性高的标记物来提升诊断的准确率。

一项前瞻性多中心研究显示，Gal-3 对甲状腺癌诊断的特异性为 93%，敏感性为 78%^[7]。本研究显示 Gal-3 敏感性与报道一致，特异性仅为 81.2%，引入 Gal-3 指标旨在利用其高特异性联合 CK-19 的高敏感性提高甲状腺癌的诊断效能。结果显示，联合后的特异性高达 94.20%，但敏感性明显降低，虽然 ROC_{UAC} 增至 0.868，与单一免疫标记物的差异无统计学意义，提示两者联合诊断效能并不优于单一指标。Gal-3 不仅在甲状腺增生结节中表达，在甲状腺非上皮细胞组织中也有表达。因此，Ramkumar 等^[8]认为单一 Gal-3 诊断恶性结节不存在优势，需要在特定情况下联合其他指标。决策树模型显示，经过 CK-19 阴性选择后，再进行 Gal-3 阳性选择，假阳性结节降至 3 例，显著提高甲状腺癌诊断的准确率，与 Ramkumar 等推论一致。

MiR221 抑制细胞周期依赖性蛋白 p27kip1 的表达，常用于甲状腺癌的诊断，表达的量与肿瘤 TNM 分期关系密切^[9]。林在楷等^[10]认为 *MiR221* 诊断的敏感性为 80.7%，特异性为 74.8%，局部或淋巴结转移的患者表达更高。本研究中良恶性结节 *MiR221* 平均值差异无统计学意义，引入截止值后，诊断敏感性为 80.41%，与上述研究一致，特异性仅为 59.41%，低于相关报道。这种差异可能与纳入的患者均无结外转移（仅 2 例淋巴结浸润）有关。

本研究发现，*MiR221* 诊断效能不及 CK-19 和 Gal-3。标记物组合后特异性有所提高（组合 2 特异性高达 97.10%），但敏感性均明显降低，诊断效能并不优于单一的免疫标记物。*MiR221* 并未被纳入决策树模型，提示该指标对 *BRAF*^{V600E} 阴性、Ⅲ~Ⅴ类的结节判定价值有限。

有趣的是，TBSRTC 进入决策树模型。经过 CK-19 阴性排除后，阳性结节中，将Ⅴ类结节判为恶性时，37 例患者中仅 2 例术后病理为良性；Ⅲ、Ⅳ类结节再经 Gal-3 阳性判别后，术后病理恶性 9 例、良性 3 例，阴性判别后，术后病理均为良性。由图 1

和表 4 可知，模型判别后最终假阴性 2 例（NPV=96.97%），显著降低恶性病变漏诊风险；假阳性 5 例（PPV=89.80%），显著减少良性结节非必要的手术。

4 结论

对于 *BRAF*^{V600E} 阴性、TBSRTC Ⅲ~Ⅴ类的结节，免疫组化标记物 CK-19、Gal-3 有一定的诊断价值；分子标记物 *MiR221* 诊断价值有限。3 种标记物无论是两种或 3 种组合，诊断价值均不优于单一免疫标记物。利用 CK-19 高阴性预测值和 Gal-3 高阳性预测值，结合 TBSRTC 分类，按模型分步进行判别，可显著提高免疫标记物的诊断效能。

本研究纳入的研究对象相对特殊，所获得的模型是否广泛适合甲状腺结节的判别诊断，有待在临床实践中进一步验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Attia AS, Hussein M, Issa PP, et al. Association of *BRAF*^{V600E} mutation with the aggressive behavior of papillary thyroid microcarcinoma: a meta-analysis of 33 studies [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23 (24): 15626. DOI: 10.3390/ijms232415626.
- [2] Cibas ES, Ali SZ. The 2017 Bethesda system for reporting thyroid cytopathology [J]. Thyroid, 2017, 27 (11): 1341-1346. DOI: 10.1089/thy.2017.0500.
- [3] 田勃, 洪天配. 甲状腺结节诊治过程中的难点与应对 [J]. 国际内分泌代谢杂志, 2021, 41 (6): 557-561. DOI: 10.3760/cma.j.cn121383-20210727-07074.
- [4] 王欢, 陈昶, 姜勇, 等. 免疫标记和 *BRAF* V600E 突变联合检测在细胞学诊断不确定甲状腺结节中的应用 [J]. 成都医学院学报, 2022, 17 (1): 52-57. DOI: 10.3969/j.issn.1674-2257.2022.01.012.
- [5] 中华医学会超声医学分会浅表器官和血管学组, 中国甲状腺与乳腺超声人工智能联盟. 2020 甲状腺结节超声恶性危险分层中国指南: C-TIRADS [J]. 中华超声影像学杂志, 2021, 30 (3): 185-200. DOI: 10.3760/cma.j.cn131148-20210205-00092.
- [6] Prasad PA, Raju K. Diagnostic utility of CK19 and galectin-3 in differentiating papillary thyroid carcinoma from nonneoplastic lesions of thyroid [J]. J Cancer Res Ther, 2022, 18 (3): 644-649. DOI: 10.4103/jcrt.jcrt_563_21.
- [7] Bartolazzi A, Orlandi F, Saggiorato E, et al. Galectin-3-expression analysis in the surgical selection of follicular thyroid nodules with indeterminate fine-needle aspiration cytology: a prospective multi-centre study [J]. Lancet Oncol, 2008, 9 (6): 543-549. DOI: 10.1016/S1470-2045(08)70132-3.
- [8] Ramkumar S, Sivanandham S. The Combined Utility of HBME-1 and Galectin-3 Immunohistochemistry and *BRAF* V600E Mutations in the Diagnosis of Papillary Thyroid Carcinoma [J]. Cureus, 2021, 13 (12): e20339. DOI: 10.7759/cureus.20339.
- [9] 张霖雷, 付延英, 申伟, 等. 微小 RNA-221 对甲状腺癌侵袭能力的影响及其机制 [J]. 中华实验外科杂志, 2021, 38 (5): 829-831. DOI: 10.3760/cma.j.cn421213-20200608-01193.
- [10] 林在楷, 周琨, 陆霁, 等. ROC 曲线分析 miRNA-221/222 作为侵袭性甲状腺乳头状癌诊断标志物的临床价值 [J]. 癌症进展, 2018, 16 (1): 49-52. DOI: 10.11877/j.issn.1672-1535.2018.16.01.14.

(收稿日期: 2022-06-11)