

甲状腺乳头状癌*BRAF V600E*基因突变 及相关蛋白的表达

董丽儒¹, 杨虎², 李双¹, 宋旭东¹

1. 华北理工大学附属医院病理科, 河北唐山 063000;
2. 河北省武警总医院病理科, 河北石家庄 050081

[摘要] 背景与目的: *BRAF V600E*基因突变可作为甲状腺乳头状癌靶向治疗的靶点, 因此检测患者*BRAF*基因状态对于能否应用靶向药物治疗具有重要意义。观察*BRAF V600E*基因突变及突变蛋白VE1在甲状腺乳头状癌中的表达情况, 并分析其与甲状腺乳头状癌的临床病理特征及其预后的关系。方法: 采用DNA测序法及免疫组织化学法分别检测108例甲状腺乳头状癌、54例甲状腺腺瘤和54例结节性甲状腺肿标本中*BRAF*基因突变及其相关蛋白VE1的表达。结果: 108例甲状腺乳头状癌基因突变率为67.6%, VE1表达率为64.8%, 与甲状腺良性病变相比差异有统计学意义($P<0.05$), 与临床病理参数间无相关性。结论: 甲状腺乳头状癌*BRAF V600E*基因突变率和*BRAF V600E*蛋白表达水平增高, 可以作为鉴别甲状腺良、恶性肿瘤的有效指标。免疫组织化学法检测甲状腺乳头状癌*BRAF V600E*蛋白的表达与其基因突变的一致性高, 可间接有效地反映*BRAF V600E*基因突变的状态。*BRAF V600E*基因突变及突变蛋白的表达与甲状腺乳头状癌患者预后无关。

[关键词] *BRAF V600E*基因; VE1; 甲状腺乳头状癌

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2017.04.002

中图分类号: R736.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2017)04-0251-05

***BRAF V600E* mutation and expression of its protein in papillary thyroid carcinoma** DONG Liru¹, YANG Hu², LI Shuang¹, SONG Xudong¹ (1. Department of Pathology, Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, Hebei Province, China; 2. Department of Pathology, Hebei Provincial Corps Hospital of CAPF, Shijiazhuang 050081, Hebei Province, China)

Correspondence to: SONG Xudong E-mail: songxd2002@sina.com

[Abstract] **Background and purpose:** The *BRAF V600E* mutation is a highly attractive drug target. Therefore, determining the *BRAF* gene mutation status of patients is essential in order to assess patients' eligibility for targeted *BRAF* gene inhibitor therapy. The aim of this study was to validate the utility of immunohistochemistry to rapidly obtain the *BRAF* gene mutation status. This study aimed to analyze the correlation of the *BRAF V600E* gene mutation and VE1 protein expression with the clinical pathological characteristics in papillary thyroid carcinoma (PTC). **Methods:** The mutation status of *BRAF V600E* was detected by DNA sequencing. Immunohistochemistry was used to detect the expression of *BRAF V600E* protein in 108 cases of PTC, 54 cases of thyroid adenoma and 54 cases of normal thyroid tissue. **Results:** The gene mutation rate of *BRAF V600E* is 67.6%, and VE1 protein expression rate is 64.8% in 108 cases of PTC. The differences were statistically significant compared with thyroid adenoma and goiter ($P<0.05$), but have no correlation with the clinical pathological characteristics. **Conclusion:** *BRAF V600E* gene mutation and VE1 protein expression are useful biomarkers for the pathological diagnosis of PTC. High consistency was observed between the immunohistochemical staining results and the DNA sequencing results of *BRAF V600E* gene mutations. Immunohistochemical technique detecting the *BRAF V600E* protein expression can effectively reflect indirectly *BRAF V600E* gene mutation status in PTC. *BRAF V600E* gene mutation has no contribution to the development of papillary thyroid carcinoma.

[Key words] *BRAF V600E* gene; VE1; Papillary thyroid carcinoma

*BRAF*基因属于*RAF*基因家族, 位于染色体7q34, 与鸟类的*c-Rml*原癌基因同源, 编码丝/苏氨酸蛋白激酶, 已知的*RAF*家族有3个成员:*Raf-1*、*BRAF*和*ARAF*, 它们均存在于细胞质中, 是激活下游信号通路的丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)最强的激活剂^[1]。近年来随着基因检测技术的广泛开展, 在多种人类恶性肿瘤中均存在不同比例的*BRAF*突变。*BRAF V600E*基因突变可作为甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)靶向治疗的靶点, 因此检测患者*BRAF*基因状态对于能否应用靶向药物治疗具有重要意义。观察*BRAF V600E*基因突变及突变蛋白VE1在PTC中的表达情况, 并分析其与PTC的临床病理特征及其预后的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

收集华北理工大学附属医院2010年—2013年经病理证实的PTC石蜡包埋标本共计108例。另外收集甲状腺腺瘤54例、结节性甲状腺肿54例。病例资料包含性别、年龄、是否完整切除、肿瘤大小、有无局部浸润和远处转移等, 并参照标准对甲状腺癌病例进行MACIS评分^[2-3]。PTC中淋巴结转移阳性组19例, 淋巴结转移阴性组89例; 男性22例, 女性86例。所有标本均采用4%的甲醛溶液固定, 梯度酒精脱水, 浸蜡, 石蜡包埋, 4 μm切片, HE染色, 镜下观察。

1.2 主要试剂

DNA提取试剂盒和*BRAF*基因突变检测试剂盒(DNA测序法)均购自北京鑫诺美迪基因检测技术有限公司。主要设备有美国ABI7500荧光定量PCR仪和ABI3130DNA测序仪。鼠抗人单克隆抗体*BRAF V600E*(克隆号VE1)工作液购自上海罗氏制药有限公司, S-P试剂盒(过氧化物酶阻断剂、封闭用正常山羊血清、生物素标记二抗工作液、辣根酶标记链霉卵白素工作液)、PBS、柠檬酸盐缓冲液、苏木素及其他免疫组织化学试剂均由华北理工大学附属医院病理科提供。

1.3 方法

1.3.1 DNA测序法

镜下观察HE切片, 选取含有足够比例肿瘤成分的蜡块, 每例标本连续切取10 μm厚的蜡膜5张, 直接封存于EP管中, 二甲苯处理、蛋白酶K完全消化, 依照DNA抽提试剂盒说明书提取石蜡组织标本DNA, 应用聚合酶链反应对本DNA的*BRAF*基因第15外显子进行扩增, 而后在自动化基因分析仪上进行测序, 采用chromas软件对结果进行分析。*BRAF*基因的测序结果与*BRAF*基因组DNA序列进行比对以确定有无点突变。

1.3.2 免疫组织化学法染色

采用SP两步法, 4 μm厚切片, DAB显色, 苏木精复染, 中性树胶封固。PBS液代替一抗做阴性对照。

1.4 结果判定

免疫组织化学法染色结果由两名高年资病理医师分别观察每张免疫组织化学切片后作出判断。*BRAF V600E*蛋白阳性产物为棕黄色颗粒, 位于细胞质。高倍(×400)镜下对每张切片随机选取10个视野计算阳性细胞百分率, 未着色或阳性细胞数<5%为阴性(-), 阳性细胞数>5%为阳性(+)

1.5 统计学处理

采用SPSS 17.0统计学软件包对各数据进行统计学分析, 计数资料的阳性率比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *BRAF V600E*基因测序结果

*BRAF V600E*基因测序结果显示, 108例PTC中有73例第15外显子激活区第1799位点发生杂合突变, 即T突变为A(图1), 突变率为67.6%, 甲状腺良性病变组(甲状腺腺瘤组及结节性甲状腺肿组)未见突变, 两者相比差异有统计学意义($P<0.01$, 表1)。

2.2 *BRAF V600E*突变蛋白VE1在各组中的表达

VE1在PTC组的阳性率为64.8%(70/108),

显著高于甲状腺腺瘤组的16.7%(9/54)及结节性甲状腺肿组的12.3%(7/54), 差异有统计学意义($\chi^2=56.492, P=0.000$, 表1)。

2.3 BRAF V600E基因突变及其蛋白表达与PTC临床病理特征间的关系

统计结果分析显示, PTC组BRAF V600E基因突变及其相关蛋白的表达与年龄、性别及淋巴结转移情况无关($P>0.05$); 根据MACIS评分系统将PTC患者分为4组, 统计分析显示, 各组BRAF V600E基因突变率及其蛋白表达的阳性率

差异无统计学意义($P>0.05$, 表2)。

2.4 BRAF V600E基因突变与其相关蛋白表达的相关性

PTC组织中, 73例BRAF V600E基因突变者出现70例BRAF V600E蛋白阳性表达, BRAF V600E蛋白表达的灵敏度为95.9%(70/73), 特异度为100%(35/35), VE1蛋白阳性表达与BRAF V600E基因突变检测的一致率为97.2%, 阳性预测值为100%, 阴性预测值为92.1%。

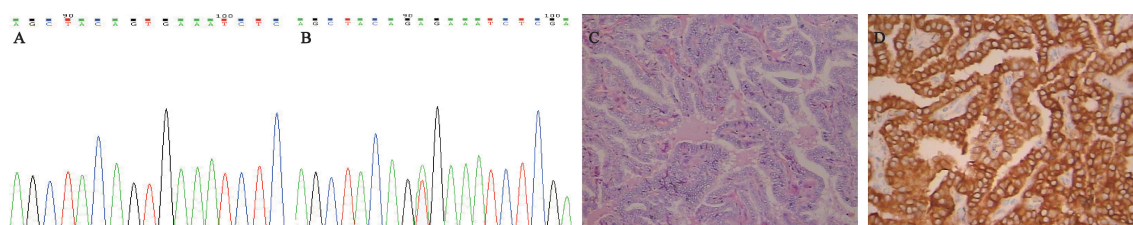


图1 BRAF V600E基因测序结果

Fig. 1 Gene sequencing results of BRAF V600E

A: Benign lesions indicate wild BRAF gene, no mutations; B: BRAF gene showed heterozygosity mutations in PTC; C: PTC (HE, $\times 400$); D: Immunoreactive staining of VE1 in PTC (SP, $\times 400$)

表1 PTC、甲状腺腺瘤及结节性甲状腺肿中BRAF V600E基因突变及其相关蛋白的表达

Tab. 1 The mutation of BRAF V600E and expression of related protein in each group

Group	BRAF V600E			VE1		
	+	-	Percentage/%	+	-	Percentage/%
PTC	73	35	67.6	70	38	64.8
Adenoma	0	54	0	9	45	16.7
Goiter	0	54	0	7	47	13.0

表2 BRAF V600E基因突变及VE1的表达与PTC临床病理特征的关系

Tab. 2 The relationship between the variation of BRAF V600E and VE1 and clinical pathological characteristics

Clinicopathological characteristic	n	BRAF V600E				VE1			
		+	-	Percentage/%	P value	+	-	Percentage/%	P value
Gender									
Male	22	11	11	50.0	0.557	13	9	59.1	0.529
Female	86	37	49	43.0		57	29	66.3	
Age/year									
< 40	24	8	16	33.3	0.214	15	9	62.5	0.788
≥ 40	84	40	44	47.6		55	29	65.5	
Lymph node metastasis									
Yes	19	8	11	42.1	0.821	12	7	63.2	0.868
No	89	40	49	44.9		58	31	65.2	
MACIS score									
<6	87	39	48	44.8	0.988	57	30	65.5	0.925
6-6.99	12	5	7	41.7		7	5	58.3	
7-7.99	5	2	3	40.0		3	2	60.0	
≥ 8	4	2	2	50.0		3	1	75.0	

3 讨 论

*BRAF*基因突变是PTC最常见的遗传学事件, 而甲状腺未分化癌检测到的均为野生型*BRAF*基因, 几乎检测不到*BRAF*基因突变^[4]。Quiros等^[5]研究显示, 合并PTC成分的未分化癌可检测到PTC突变, 但其中检测到的突变成分来自于PTC, 未分化癌更多的检测到*RAS*基因突变^[6]。90%以上的*BRAF*基因突变都是*BRAF*的T1799A错义点突变, 即15外显子第1799位点的T被A替代(T1799A), 导致该基因编码的蛋白产物中第600位的缬氨酸被谷氨酸替代, 致使其介导的信号转导通路发生了异常, 平均突变率为44%~49%^[7-8]。目前, 关于*BRAF*的研究大部分是基于基因水平上的聚合酶链反应和基因测序等技术研究*BRAF*基因突变位点(突变位点多见于T1799A)及突变率, 或使用免疫组织化学染色技术检测*BRAF V600E*突变蛋白VE1在PTC组织中的表达。有文献显示, 采用*BRAF V600E*(克隆号VE1)单克隆抗体能特异性识别*BRAF V600E*基因突变后相关蛋白的表达, *BRAF V600E*蛋白位于596~606位氨基酸序列, 免疫组织化学法检测结果与用聚合酶链反应和基因测序等技术检测具有较好的一致性^[9-11]。本研究中的108例PTC有73例检测到*BRAF*(T1799A)基因突变, 突变率为67.6%, 而甲状腺腺瘤组及结节性甲状腺肿组均未检测到*BRAF*(T1799A)基因突变, 提示*BRAF*基因突变是PTC发生的一项重要事件, 对其早期确诊可能具有重要价值。本研究还发现*BRAF V600E*基因突变的73个病例中有70例表达VE1, VE1表达的灵敏度为95.9%(70/73), 特异度为100%(35/35), VE1蛋白阳性表达与*BRAF V600E*基因突变检测的一致率为97.2%(105/108), 该结果提示使用免疫组织化学法检测*BRAF V600E*突变蛋白VE1在PTC中的表达具有较高的灵敏度及特异度, 能间接有效地反映*BRAF V600E*基因突变的状态, 且因免疫组织化学法操作简单、费用低廉, 可代替基因检测成为PTC病理诊断的一项实用观测指标。

然而新技术的出现总是有利有弊的, 包括免疫组织化学染色强度的判读存在一定程度的主观性及突变抗体选择方面存在人为因素的不确定性。此外, 免疫组织化学结果会出现一定比例的假阳性和假阴性, 本研究的73例免疫组织化学检测结果中有3例是假阴性即基因序列显示突变阳性而免疫组织化学法VE1不表达, 这种情况的出现可能是由于突变抗原表达缺失或组织固定不充分; 组织缺血及基因突变会引起*BRAF V600E*蛋白表达减少, 这可能是免疫组织化学法出现假阴性的原因。因此, 在应用免疫组织化学法检测*BRAF V600E*蛋白的过程中要做好质量控制, 在临床应用中对于突变结果的判定需要综合多方面因素以保证结果的准确性。

*BRAF*基因突变与临床病理参数间的关系目前尚存在争议^[10,12-13], 而本研究并未发现其与患者年龄、性别及淋巴结转移之间的相关性。PTC组根据MACIS评分系统再分为4个亚组, 本研究发现, 4个亚组间*BRAF V600E*突变及VE1的表达无明显差异, 该结果说明*BRAF V600E*突变及VE1的表达与患者预后无关。

总之, 采用免疫组织化学单克隆抗体*BRAF V600E*(克隆号VE1)代替DNA测序技术分析*BRAF V600E*基因的突变状态, 有助于PTC的病理诊断, 并有效地指导临床靶向治疗用药。

[参 考 文 献]

- [1] XING M Z, WESTRA W H, TUFANO R P, et al. *BRAF* mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(12): 6373-6379.
- [2] POWERS P A, DINAUER C A, TUTTLE R M. The MACIS score predicts the clinical course of papillary thyroid carcinoma in children and adolescents [J]. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2004, 17(3): 339-343.
- [3] KJELLMAN P. The MACIS prognostic system was efficacious in predicting outcome of papillary thyroid carcinoma [J]. *Eur J Surg oncol*, 2006, 32(3): 345-352.
- [4] PITA J M, FIGUEIREDO I F, MOURA M M, et al. Cell cycle deregulation and *TP53* and *RAS* mutations are major events in poorly differentiated and undifferentiated thyroid carcinomas [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014, 99(3): E497-E507.
- [5] QUIROS R M, DING H G, GATTUSO P, et al. Evidence that one subset of anaplastic thyroid carcinomas are derived from

- papillary carcinomas due to *BRAF* and *p53* mutations [J] . *Cancer*, 2005, 103(11): 2261–2268.
- [6] WANG H M, HUANG Y W, HUANG J S, et al. Anaplastic carcinoma of the thyroid arising more often from follicular carcinoma than papillary carcinoma [J] . *Ann Surg Oncol*, 2007, 14(10): 3011–3018.
- [7] XING M. *BRAF* mutation in thyroid cancer [J] . *Endocr Relat Cancer*, 2005, 12(2): 245–262.
- [8] LEE J H, LEE E S, KIM Y S, et al. Clinicopathologic significance of *BRAF V600E* mutation in papillary carcinomas of the thyroid: a meta-analysis [J] . *Cancer*, 2007, 110(1): 38–46.
- [9] PYO J S, SOHN J H, KANG G. BRAF immunohistochemistry using clone VE1 is strongly concordant with *BRAF V600E* mutation test in papillary thyroid carcinoma [J] . *Endocr Pathol*, 2015, 26(3): 211–217.
- [10] JUNG Y Y, YOO J H, PARK E S, et al. Clinicopathologic correlations of the *BRAF V600E* mutation, BRAF V600E immunohistochemistry, and BRAF RNA *in situ* hybridization in papillary thyroid carcinoma [J] . *Pathol Res Pract*, 2015, 211(2): 162–170.
- [11] CAPPER D, PREUSSER M, HABEL A, et al. Assessment of *BRAF V600E* mutation status by immunohistochemistry with a mutation-specific monoclonal antibody [J] . *Acta Neuropathol*, 2011, 122(1): 11–19.
- [12] LU J, GAO J, ZHANG J, et al. Association between *BRAF V600E* mutation and regional lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma [J] . *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(1): 793–799.
- [13] 侯卫东, 胡学信, 刘艳峰. 甲状腺乳头状癌中CyclinD1表达和*BRAF(V600E)*突变的相关性及意义 [J] . *临床与实验病理学杂志*, 2014, 30(12): 1386–1390.

(收稿日期: 2016-08-18 修回日期: 2016-11-15)