



· 论 著 ·

甲状腺结节穿刺标本中*BRAF* V600E突变检测的临床意义

张 玲¹, 周晓燕¹, 陈 颖¹, 张 皓¹, 高丽丽¹, 王 宇², 稽庆海², 平 波¹, 朱晓丽¹

1. 复旦大学附属肿瘤医院病理科, 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 上海 200032 ;
2. 复旦大学附属肿瘤医院头颈外科, 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 上海 200032

[摘要] 背景与目的: 在甲状腺乳头状癌 (papillary thyroid carcinoma, PTC) 中, *BRAF* V600E突变是迄今报道最多的基因突变。检测甲状腺穿刺细胞中的*BRAF* V600E突变有助于提高细针抽吸细胞学检查 (fine-needle aspiration cytology, FNAC) 诊断的准确性。本研究对甲状腺穿刺细胞液进行*BRAF* V600E突变检测, 与术后组织病理学诊断结果进行比较, 评估*BRAF* V600E突变的术前诊断价值。方法: 回顾性分析2016年6月—2017年4月在复旦大学附属肿瘤医院就诊的563例甲状腺结节患者的B超引导下FNAC标本中的*BRAF* V600E突变结果, 所有病例用QIAamp DNA Mini Kit提取DNA, 并用突变特异性扩增系统 (amplification refractory mutation system, ARMS) 方法检测*BRAF* V600E突变。结果: 563例患者的FNAC标本中, ARMS方法检测成功率为99.3%, 男女比例为1.0 : 3.7, 平均年龄 (45.0±0.9) 岁。以组织病理学诊断作为金标准对209例接受手术治疗的患者进行诊断, 细胞学诊断PTC的灵敏度为86.6%, 特异度为100.0%; 细胞学联合*BRAF* V600E诊断PTC的灵敏度为92.1%, 特异度为100.0%。FNAC联合*BRAF* V600E检测的诊断准确率高于细胞学诊断。组织病理学诊断为PTC的患者中, 有11例患者细胞学诊断未见肿瘤细胞, 但*BRAF* V600E检测有突变, 其中9例为微小PTC。结论: 用ARMS方法检测FNAC标本中*BRAF* V600E基因突变, 检测成功率高, 是临床易于开展的术前辅助诊断方法。将细胞学诊断与*BRAF* V600E检测结果相结合, 可提高PTC的检出率, 提高术前诊断的准确率。

[关键词] 甲状腺乳头状癌; 细针抽吸细胞学检测; *BRAF* V600E突变检测

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2019.03.004

中图分类号: R736.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2019)03-0178-05

Clinical significance of *BRAF* V600E detection in fine-needle aspiration samples of thyroid nodule ZHANG Ling¹, ZHOU Xiaoyan¹, CHEN Ying¹, ZHANG Hao¹, GAO Lili¹, WANG Yu², JI Qinghai², PING Bo¹, ZHU Xiaoli¹ (1. Department of Pathology, Fudan University Shanghai Cancer Center, Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China; 2. Department of Head and Neck Surgery, Fudan University Shanghai Cancer Center, Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Correspondence to: ZHU Xiaoli E-mail: shhxl22@126.com

[Abstract] **Background and purpose:** In papillary thyroid carcinoma (PTC), the *BRAF* V600E mutations are reported so far to have the most important diagnostic value among genetic mutations. Detection of *BRAF* V600E mutation in thyroid puncture cells can improve the diagnostic accuracy of fine-needle aspiration cytology (FNAC). In this study, *BRAF* V600E mutation detection was performed on thyroid puncture cell fluid, compared with postoperative histopathologic diagnosis, and the preoperative diagnostic value of this mutation was evaluated according to the coincidence rate with histopathologic diagnosis. **Methods:** A total of 563 patients with thyroid nodules were enrolled following ultrasound-guided aspiration in Fudan University Shanghai Cancer Center from Jun. 2016 to Apr. 2017. DNA QIAamp Mini Kit was used to extract the DNA in thyroid puncture cell fluid, and amplification refractory mutation system (ARMS) method was used to detect *BRAF* V600E mutation. **Results:** Among the 563 patients who were tested for *BRAF* V600E, 209 cases had surgical treatment. The overall ratio of men to women was 1.0 : 3.7, aged 1 to 79 years, with

通信作者: 朱晓丽 E-mail: shhxl22@126.com

an average age of (45.0±0.9) years. The success rate of *BRAF* V600E detection was 99.3%. Histopathological diagnosis was taken as the gold standard. The sensitivity and specificity of cytology diagnosis of papillary thyroid carcinoma were 86.6% and 100.0%, respectively. The sensitivity and specificity of cytology combined with *BRAF* V600E test for the diagnosis of PTC were 92.1% and 100.0%, respectively. FNAC combined with *BRAF* V600E detection method had a higher positive detection rate than cytological diagnosis. Among the patients diagnosed by histopathology as having PTC, 11 cases had negative cytological diagnosis but positive results of *BRAF* V600E test. **Conclusion:** As to ultrasound-guided thyroid FNAC tissue, the ARMS method for *BRAF* V600E mutation test has a high success rate of detection, and can aid preoperative diagnosis. The combination of cytological diagnosis and *BRAF* V600E detection results can improve the detection rate of malignancy and the accuracy of preoperative diagnosis, and protect the patients from the delay of treatment and the progression of the disease caused by missed cytological diagnosis.

[Key words] Papillary thyroid carcinoma; Fine-needle aspiration cytology; *BRAF* V600E mutation test

甲状腺癌是最常见的内分泌系统恶性肿瘤，其发病率近年来快速上升^[1]。目前，甲状腺细针抽吸细胞学检查（fine-needle aspiration cytology, FNAC）以其微创、易行及准确率高的特点，成为临床上诊断甲状腺结节良恶性最常用的方法，但仍有20%的病例无法明确诊断^[2]。在甲状腺乳头状癌（papillary thyroid carcinoma, PTC）中，*BRAF* V600E突变是迄今报道最多的突变类型^[3-5]。检测B超引导下甲状腺结节穿刺细胞中的*BRAF* V600E突变可辅助细胞学诊断，提高诊断的灵敏度和准确率。突变特异性扩增系统（amplification refractory mutation system, ARMS）方法利用特异性引物和双环探针技术，将*BRAF* V600E检测灵敏度提高到1%的突变比例，大幅提高了检出率。本研究使用该方法对甲状腺穿刺细胞液进行*BRAF* V600E突变检测，以组织病理学诊断为金标准，评估*BRAF* V600E检测与细胞学诊断的灵敏度和特异度。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象

2016年6月—2017年4月在复旦大学附属肿瘤医院接受B超引导下甲状腺结节FNAC患者共563例，穿刺细胞液同时行细胞学诊断及*BRAF* V600E突变检测。

1.1.2 主要试剂与设备

QIAamp DNA Mini Kit试剂盒购自德国QIAGEN公司，人类*BRAF* V600E突变检测试剂盒购自厦门艾德生物医药科技股份有限公司。

Eppendorf 5810R低速离心机购自德国Eppendorf AG公司，Thermo-Shaker恒温金属浴购自美国Thermo Fisher Scientific公司，QIAcube核酸提取仪购自德国QIAGEN公司，Thermo NANOdrops 2000核酸浓度测定仪购自美国Thermo Fisher Scientific公司，ABI7500实时荧光定量聚合酶链反应（real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR）仪购自美国Life Technologies公司。

1.2 方法

1.2.1 DNA提取

穿刺细胞液用Eppendorf 5810R低速离心机4 000 r/min离心30 min，去上清液，吸取沉淀加入裂解液放入Thermo-Shaker恒温金属浴56 ℃消化过夜。用QIAcube核酸提取仪提取DNA，用Thermo NanoDrop 2000核酸浓度测定仪进行定量，并将浓度统一稀释至2 ng/μL。

1.2.2 RTFQ-PCR检测

按上机样本数量配制RTFQ-PCR混合液，混匀后以每管35 μL分装到8联管中，将稀释好的DNA每个样本取5 μL加入反应管。混匀后以4 000 r/min离心15~20 s后放入ABI7500 RTFQ-PCR仪进行RTFQ-PCR并采集荧光信号，生成荧光信号值。RTFQ-PCR程序为：95 ℃ 5 min，1个循环（第一阶段）；95 ℃ 25 s，64 ℃ 20 s，72 ℃ 20 s，15个循环（第二阶段）；93 ℃ 25 s，60 ℃ 35 s，72 ℃ 20 s，31个循环（第三阶段）。信号收集：第三阶段60 ℃时收集突变FAM和内控HEX（或VIC）信号，执行RTFQ-PCR，保存文件。

1.2.3 *BRAF* V600E突变结果判读

按管号顺序依次选择单一突变检测反应管进行检测分析。需要同时选择阳性质控品反应孔、阴性对照孔和样品反应孔,可根据实际情况调节Threshold至扩增曲线升起的拐点处,得到突变FAM信号或内控HEX(或VIC)信号的Ct值。确定试验是否成功可信:待测样品的内控HEX(或VIC)信号应有明显扩增曲线,且Ct值应在13~21之间。若内控Ct值>21或HEX信号无明显扩增,说明加入的DNA含有RTFQ-PCR抑制剂或DNA加入数量不够,需要重新提取DNA或增加DNA用量后再进行试验;但若FAM信号有明显的扩增曲线,且Ct值<28,该样本无需重复检测,检测结果为*BRAF* V600E突变阳性。若内控Ct值<13,说明加入的DNA过量,应减少DNA加入量再进行试验;但若FAM信号无明显扩增曲线或Ct值>28,该样本无需重复检测,检测结果为*BRAF* V600E突变阴性。质控品的FAM信号Ct值一般<20,但可能会由于不同仪器的不同阈值设置而发生波

动。若样本的FAM信号Ct值 ≥ 28 ,则样本为阴性(或低于试剂盒的检测下限);若样本的FAM信号Ct值<28,则样本为阳性。

1.3 统计学处理

采用SPSS 19.0统计学软件对数据进行分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

在563例进行*BRAF* V600E突变检测的患者中,男女比例为1.0 : 3.7(120 : 443),年龄1~79岁,平均年龄(45.0 \pm 0.9)岁(表1)。*BRAF* V600E检测成功率为99.3%(559/563),4例检测失败,无法判断结果(ARMS方法检测无HEX峰升起,提示扩增失败),*BRAF* V600E的总体突变率为50%。将标本按细胞学诊断分为6级,其中良性32例,未见肿瘤细胞182例,非典型病变42例,个别异型细胞9例,疑滤泡性肿瘤6例,PTC及疑PTC 292例。

表1 甲状腺结节FNAC标本中*BRAF* V600E突变检出率、细胞量及DNA浓度

Tab. 1 *BRAF* V600E mutation, cell number and DNA concentration in the FNAC samples of thyroid nodule

Cytological diagnosis	N	Gender (male : female)	Age/year	Cell number>60	DNA concentration ρ_B (ng· μ L ⁻¹)	<i>BRAF</i> V600E mutation
Benign	32	6 : 26	23-61 (mean 46.0 \pm 3.1)	71.4% (15/21)	1.5-21.9 (mean 7.3 \pm 1.9)	3.2% (1/31)
Tumor cells undetermined	182	31 : 151	19-80 (mean 48.0 \pm 1.6)	28.3% (34/120)	1.2-115.3 (mean 7.0 \pm 1.6)	7.7% (14/181)
Atypical lesions	42	10 : 32	27-67 (mean 46.0 \pm 3.1)	50.0% (16/32)	1.1-25.8 (mean 6.2 \pm 1.7)	33.3% (14/42)
Individual atypical cell	9	0 : 9	26-52 (mean 39.0 \pm 6.2)	40.0% (2/5)	2.4-10.2 (mean 5.2 \pm 2.4)	66.7% (6/9)
Suspicious for a follicular neoplasm	6	1 : 5	31-46 (mean 38.0 \pm 9.8)	50.0% (3/6)	1.6-17.4 (mean 9.1 \pm 6.9)	40.0% (2/5)
PTC/suspicious for PTC	292	72 : 220	16-79 (mean 43.0 \pm 1.3)	85.3% (174/204)	1.1-85.7 (mean 9.0 \pm 1.1)	82.1% (239/291)
Total	563	120 : 443	16-79 (mean 45.0 \pm 0.9)	62.9% (244/388)	1.1-115.3 (mean 7.3 \pm 0.8)	50.0% (280/559)

388例FNAC标本做细胞量评估,样本总体均数可信区间为95%,细胞量评估>60个细胞的样本提取的DNA浓度均值为(9.0 \pm 1.2) ng/ μ L,细胞量评估<60个细胞的样本提取的DNA浓度均值为(6.0 \pm 1.7) ng/ μ L,两组平均浓度均小于10 ng/ μ L。成组设计的t检验进行两样本均数比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

209例患者接受手术并有组织病理学诊断结果,将组织病理学诊断作为金标准,评估细胞学及*BRAF* V600E检测的准确率。细胞学诊断PTC

的灵敏度为86.6%,特异度为100%,阳性预测值为100%,阴性预测值为20.6%。*BRAF* V600E单独诊断甲状腺恶性肿瘤的灵敏度为78.2%,特异度为100.0%,阳性预测值为100.0%,阴性预测值为13.7%。FNAC联合*BRAF* V600E诊断PTC的灵敏度为92.1%,特异度为100.0%,阳性预测值为100.0%,阴性预测值为30.4%(表2)。FNAC联合*BRAF* V600E检测的阳性检出率高于单独FNAC及单独*BRAF* V600E检测,差异有统计学意义($P < 0.005$)。

组织病理学诊断为PTC的患者中,有11例患者细胞学诊断未见肿瘤细胞,但*BRAF* V600E检

测阳性,其中9例为微小PTC,2例为PTC,4例细胞量评估>60,4例细胞量评估<60,3例不满意。

表2 细胞学诊断和*BRAF* V600E诊断与组织病理学诊断金标准的比对

Tab. 2 Comparison of cytological diagnosis and *BRAF* V600E diagnosis with histopathologic diagnosis

Item	Histopathologic diagnosis		Sensitivity/%	Specificity/%
	Malignancy	Benign		
FNAC				
+	175	0	86.6	100.0
-	27	7		
<i>BRAF</i> V600E				
+	158	0	78.2	100.0
-	44	7		
FNAC+ <i>BRAF</i> V600E				
+	186	0	92.1	100.0
-	16	7		

3 讨 论

PTC是最常见的内分泌系统恶性肿瘤,约占甲状腺恶性肿瘤的80%^[6],近年来发病率明显增高。目前研究发现,在PTC中*BRAF* V600E突变是最常见的基因异常,突变率为45%~80%^[7-8]。*BRAF* V600E突变后可持续性激活*Ras*基因/丝苏氨酸蛋白激酶/丝裂原活化蛋白激酶激酶/丝裂原活化蛋白激酶(*Ras*/serine/threonine-protein kinase/mitogen-activated protein kinase kinase/mitogen-activated protein kinase, *Ras*/Raf/MAPKK/MAPK)信号通路促使甲状腺细胞增殖,使滤泡上皮细胞发生恶变,并可促进高分化乳头状癌细胞发展为低分化和未分化癌细胞^[9]。

目前甲状腺结节穿刺的细胞学诊断是术前良恶性诊断的重要手段,但是约20%的甲状腺FNAC标本细胞学无法明确诊断^[10-13],其恶性风险度为1.7%~6.6%^[14],该组患者常需要再次穿刺或易漏检。因此,有学者开始将分子检测应用于FNAC标本,期望提高FNAC术前诊断的准确率。本研究用ARMS方法检测B超引导下甲状腺FNAC组织中的*BRAF* V600E突变,检测成功率高达99.3%,方法简便快速,适用于临床术前辅助诊断。本研究中,评估比较细胞量>60和<60

个细胞的两组FNAC标本的DNA提取浓度,均低于10 ng/ μ L,差异无统计学意义,细胞量的多少未影响DNA提取的浓度,可能由于细胞学评估并不能完全反映穿刺液中的实际细胞量。分析4例*BRAF* V600E突变检测失败的病例,细胞量的多少和DNA浓度的高低与检测是否成功并不相关,推测导致ARMS方法检测失败的因素可能有DNA质量差和残留的荧光抑制剂等。本研究中,甲状腺结节细胞学诊断的灵敏度为86.6%,将细胞学诊断与*BRAF* V600E检测结果相结合,灵敏度提高到92.1%,说明细胞学诊断联合*BRAF* V600E检测的准确率优于单独细胞学诊断或单独*BRAF* V600E检测。分析11例组织病理学诊断及*BRAF* V600E检测阳性、细胞学诊断阴性的病例,其中9例术后诊断为微小PTC,说明在微小PTC中,可能穿刺所得肿瘤细胞量较少,导致细胞学诊断时易发生漏检,而分子检测*BRAF* V600E突变是将DNA呈指数级放大,检测灵敏度更高,因此对于微小PTC,*BRAF* V600E突变与细胞学检测二者结合可明显提高诊断准确率,降低漏检率。

综上所述,术前甲状腺结节FNAC标本中用ARMS方法检测*BRAF* V600E成功率高,是临床上简单易行的方法,细胞学诊断与*BRAF* V600E同时检测,可提高甲状腺结节FNAC的术前诊断准确率。

[参 考 文 献]

- [1] ELISEI R, MOLINARO E, AGATE L, et al. Are the clinical and pathological features of differentiated thyroid carcinoma really changed over the last 35 years? Study on 4187 patients from a single Italian institution to answer this question [J] . J Clin Endocrinol Metab, 2010, 95(4): 1516–1527.
- [2] 张博茗, 林元强, 隋国庆, 等. 细针穿刺细胞学联合 *BRAF* V600E 基因突变检测在甲状腺结节诊断中的价值 [J] . 肿瘤影像学, 2015, 24(4): 259–263.
- [3] PARK K S, OH Y L, KI C S, et al. Evaluation of the real-Q *BRAF* V600E detection assay in fine-needle aspiration samples of thyroid nodules [J] . J Mol Diagn, 2015, 17(4): 431–437.
- [4] GUERRA A, DI C V, GARZI A, et al. Diagnostic utility of *BRAF* V600E mutation testing in thyroid nodules in elderly patients [J] . BMC Surg, 2013, 13(Suppl 2): S37.
- [5] ZHU X, LUO Y, BAI Q, et al. Specific immunohistochemical detection of the *BRAF* V600E mutation in primary and metastatic papillary thyroid carcinoma [J] . J Exp Mol Pathol, 2016, 100(1): 236–241.
- [6] DAVIS L, WELCH H G. Current thyroid cancer trends in the United States [J] . JAMA Otolaryngol Head Neck Surg, 2014, 140(4): 317–322.
- [7] 汉 锋, 张 彬. 基因突变与甲状腺癌诊断及预后 [J] . 国际耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2013, 37(4): 234–236.
- [8] 朱晓丽, 周晓燕, 朱雄增. 甲状腺乳头状癌中 *BRAF* V599E 点突变与 RET/PTC 融合基因的检测 [J] . 中华病理学杂志, 2005, 34(5): 270–274.
- [9] 罗书画, 周 扬, 龚日祥. *BRAF* 基因与甲状腺癌 [J] . 现代预防医学, 2007, 34(1): 64–66.
- [10] CIBAS E S, ALI S Z. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology [J] . Am J Clin Pathol, 2009, 132(5): 658–665.
- [11] YASSA L, CIBAS E S, BENSON C B, et al. Long-term assessment of a multidisciplinary approach to thyroid nodule diagnostic evaluation [J] . Cancer, 2007, 111(6): 508–516.
- [12] NAVAR R, IVANOVIC M. The indeterminate thyroid fine-needle aspiration: experience from an academic center using terminology similar to that proposed in the 2007 National Cancer Institute Thyroid Fine Needle Aspiration State of the Science Conference [J] . Cancer, 2009, 117(3): 195–202.
- [13] BONGIOVANNI M, SPITALE A, FAQUIN W C, et al. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology: a meta-analysis [J] . Acta Cytol, 2012, 56(4): 333–339.
- [14] AI MAQBALI T, TEDLA M, WEICKERT M O, et al. Malignancy risk analysis in patients with inadequate fine needle aspiration cytology (FNAC) of the thyroid [J] . PLoS One, 2012, 7(11): e49078.

(收稿日期: 2018-09-10 修回日期: 2019-01-12)