

甲状腺癌 BRAF 基因突变与 CK19 和 HBME-1 相关性研究

胥 柯,郝兰香,黄 飞,刘艳梅[△]

(江苏省盐城市第一人民医院内分泌科,江苏盐城 224000)

摘要:目的 探讨甲状腺癌发生过程中鼠类肉瘤滤过性毒菌致癌同源体 B1(BRAF)基因突变与细胞角蛋白 19(CK19)、人骨骼内皮细胞标志物(HBME-1)分子表达水平间的相关性。方法 采用免疫组织化学 Envision 两步法分别检测 62 例甲状腺癌患者组织和 62 例甲状腺良性病变组织(对照)的 CK19、HBME-1 蛋白表达水平;采用聚合酶链反应(PCR)分别检测 62 例甲状腺癌患者和 62 例甲状腺良性病变组织 BRAF 基因突变状况。使用 SPSS20.0 软件进行数据统计。结果 CK19 在甲状腺癌组织的阳性表达率为 100.00%,显著高于甲状腺良性病变组织的 19.35% ($\chi^2=16.534, P=0.001$)。HBME-1 在甲状腺癌组织的阳性表达率为 96.77%,显著高于甲状腺良性病变组织的 6.45% ($\chi^2=17.854, P=0.002$)。BRAF T1997A 在甲状腺癌组织的阳性表达率为 59.68%,而甲状腺良性病变组织中没有出现 BRAF T1977A 突变。甲状腺癌组患者组织中的 BRAF 基因突变阳性率与肿瘤直径、TNM 分期呈显著负相关(均 $P<0.05$),与 CK19 以及 HBME-1 阳性表达率呈显著正相关(均 $P<0.05$)。结论 蛋白标志物 CK19 以及 HBME-1 对甲状腺癌的病理诊断均具有较高的临床应用价值;BRAF 基因突变与甲状腺癌发生密切相关,有利于临床确诊甲状腺癌。

关键词:甲状腺癌; 肉瘤滤过性毒菌致癌同源体 B1; 细胞角蛋白 19; 人骨骼内皮细胞标志物

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.05.006

中图法分类号:R736.1;R446.1

文章编号:1673-4130(2019)05-0532-04

文献标识码:A

Clinical research on the relationship between BRAF gene mutation and CK19 and
HBME-1 in the development of thyroid cancer

XU Ke, HAO Lanxiang, HUANG Fei, LIU Yanmei[△]

(Department of Endocrinology, Yancheng First People's Hospital, Yancheng, Jiangsu 224000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the correlation between BRAF gene mutation and CK19 and HBME-1 expression in thyroid carcinoma (TC). **Methods** The expressions of CK19 and HBME-1 in 62 cases of TC and 62 cases of thyroid benign tumor were analyzed by immunohistochemical analysis (Envision two-step). Polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the mutation of BRAF gene in 62 cases of TC and 62 cases of thyroid benign lesion. SPSS20.0 was used as statistics analysis software. **Results** The positive expression rate of CK19 in TC was 100.0%, which was significantly higher than that in thyroid benign lesion ($\chi^2=16.534, P=0.001$). The positive expression rate of HBME-1 in TC was 96.77%, which was significantly higher than thyroid benign lesion 6.45% ($\chi^2=17.854, P=0.002$). The positive expression rate of BRAF T1997A in TC was 59.68%, while the mutation of BRAF T1977A was not observed in thyroid benign lesion. The tumor diameter and TNM staging was significantly negative correlated with the positive rate of BRAF gene ($P<0.05$), while the positive rate of CK19 and HBME-1 showed a significant positive correlation with it ($P<0.05$). **Conclusion** Protein markers CK19 and HBME-1 have high clinical value in pathological diagnosis of TC. BRAF gene mutation is closely related to the occurrence of TC, which is conducive to the clinical diagnosis of TC.

Key words: thyroid cancer; BRAF gene; CK19; HBME-1

甲状腺癌是临床常见的一种内分泌腺恶性肿瘤, 在我国甲状腺癌的发病率呈逐年上升趋势,但其具体 的发病机制尚不清楚^[1-2]。细针穿刺细胞学活检是临床诊断甲状腺癌的金标准,但只能确诊 70%~80%的

作者简介:胥柯,女,副主任医师,主要从事妊娠期甲状腺疾病及糖尿病的诊治研究。 [△] 通信作者, E-mail: lym_jsyc@sina.com。

本文引用格式:胥柯,郝兰香,黄飞,等. 甲状腺癌 BRAF 基因突变与 CK19 和 HBME-1 相关性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(5): 532-

甲状腺癌患者^[3]。目前尚无理想的蛋白标志物用于临床诊断甲状腺癌,因而探讨甲状腺癌的早期诊断标志物显得尤为必要^[4]。近年来,细胞角蛋白 19 (CK19)、人骨骼内皮细胞标志物(HBME-1)、鼠类肉瘤滤过性毒菌致癌同源体 B1(BRAF)基因等分子标志物或其组合已被建议用于临床诊断甲状腺癌,但这些标志物的可靠性还存在较大的争议^[5-7]。本研究通过两种不同的方法检测甲状腺癌患者的 CK19、HBME-1 表达水平以及 BRAF 基因突变情况,以期探讨这些分子标志物的可靠性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取本院 2016 年 4 月至 2017 年 4 月收治的甲状腺癌患者 62 例为研究对象,其中女 32 例,男 30 例;年龄 46~65 岁,平均(53.26±4.78)岁。选取同期收治的 62 例甲状腺良性病变患者为对照,其中男 29 例,女 33 例;年龄 48~64 岁,平均(54.13±3.26)岁,两组患者的年龄、性别比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。根据第 7 版美国癌症联合委员会(AJCC)癌症分期手册对甲状腺癌进行临床分期:I 期患者 26 例,II 期患者 20 例,III 期患者 16 例,肿瘤直径 0.82~1.54 cm,平均(1.13±0.32)cm。排除标准:(1)术前合并其他肿瘤,如髓样癌、滤泡状癌等;(2)免疫组织化学检测指标不完整。本研究经本院伦理委员会批准通过,所有研究对象均签署患者知情同意书。

1.2 主要试剂 所用鼠抗人 CK19、HBEM-1 单克隆抗体(即用型)以及 BRAF 基因突变检测试剂盒,均购自福州迈新生物技术有限公司。DNA 提取试剂盒和聚合酶链反应(PCR)所用试剂均购自上海生物工程有限公司。

1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学法检测 CK-19 以及 HBEM-1 蛋白表达所有标本均经 10% 福尔马林固定,石蜡包埋,连续切片(3 μ m)及常规的 HE 染色。采用 Envision 两步法对 CK19 和 HBEM-1 进行免疫标记,分别检测 62 例甲状腺癌患者组织和 62 例甲状腺良性病变组织(对照)的 CK19、HBME-1 蛋白表达水平。具体的实验步骤按照操作步骤说明书进行,经过一系列的抗原修复、显色、染色操作后,用中性树脂封片,在显微镜下观察。其中 PBS 代替一抗作为阴性对照,已知阳性切片作阳性参考来检测实验切片的染色情况。结果判定:采用双盲法阅片,由 2 名病理科医生评判计分。胞质内出现黄色颗粒状物质为阳性,依据阳性细胞着色数计分:阳性数 $\geq 71\%$,3 分;阳性数 36%~70%,2 分;阳性数 6%~35%,1 分;阳性数 $\leq 5\%$,0 分。依据着色强度计分:强着色(明显的棕黄色)2 分;弱着色(淡棕黄色)1 分;不着色 0 分。阳性分级:两项

指标分数相加分为 4 级,1~2 分(一),3 分(+),4 分(++),5~6 分(+++),其中-表示阴性,+表示弱阳性,++表示阳性,+++表示强阳性,阳性发生事件为+~+++之和,阳性率(%)=阳性事件数/总病例数 $\times 100\%$ 。

1.3.2 PCR 法及 DNA 测序法检测 BRAF 基因突变 电镜下观察甲状腺癌患者标本组织的 HE 切片,选取肿瘤成分丰富的蜡块,连续切 5 张 3 μ m 厚白片,封存于 EP 管,二甲苯处理,蛋白酶 K 完全消化,严格依照 DNA 提取试剂盒说明书提取石蜡组织标本 DNA,待测样品、BRAF 阴性以及阳性质控品分别加样并配置反应体系。应用 PCR 扩增组织标本 DNA 的 BRAF 基因第 15 外显子,而后在自动化基因分析仪(购自美国 ABI 公司)进行测序。采用 Chromas 软件分析测序结果,删除不稳定的测序区域后,将其后面的序列与野生型标准序列比对,标记处为 600 (T1799A)位密码子,AGC 可能会发生 A $\rightarrow$ C 突变,即密码子 600 的错义突变(V600E)。野生型核苷酸 AGC TAC AGT GAA ATC TCG A,野生型氨基酸 AGC KS;突变型核苷酸 CGC TAC AGT GAA ATC TCG A,突变型氨基酸 GCT KS。

1.4 统计学处理 研究所得数据均采用 SPSS20.0 进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,行两独立样本 t 检验;计数资料采用绝对值和率表示,采用 χ^2 检验。采用 Spearman 相关分析对 BRAF 基因突变、CK19 以及 HBME-1 与甲状腺癌行相关性分析,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 甲状腺癌与甲状腺良性病变组织 CK19、HBME-1 蛋白表达 CK19 阳性表达部位在细胞膜和细胞质,62 例甲状腺癌患者标本组织中 CK19 阳性事件数为 62 例,阳性表达率为 100.0%,见图 1A,60 例甲状腺癌患者组织标本中以阳性和强阳性为主。而甲状腺良性病变组织 CK19 阳性事件数为 12 例,其阳性表达率为 19.35%,主要以阴性和弱阳性分级较多见,见图 1B。CK19 在甲状腺癌与甲状腺良性病变组织中的表达,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。HBME-1 阳性表达部位多见于细胞膜,腺腔边缘也有部分着色。甲状腺良性病变组织中阳性事件仅有 4 例,占总样本的 6.45%,剩下 58 例均为阴性表达,见图 1C。而 62 例甲状腺癌患者标本组织,阳性事件数为 60 例,其阳性表达率为 96.77%,多数以阳性和强阳性分级表达为主,见图 1D。HBME-1 在甲状腺癌与甲状腺良性病变组织中 HBME-1 的表达,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

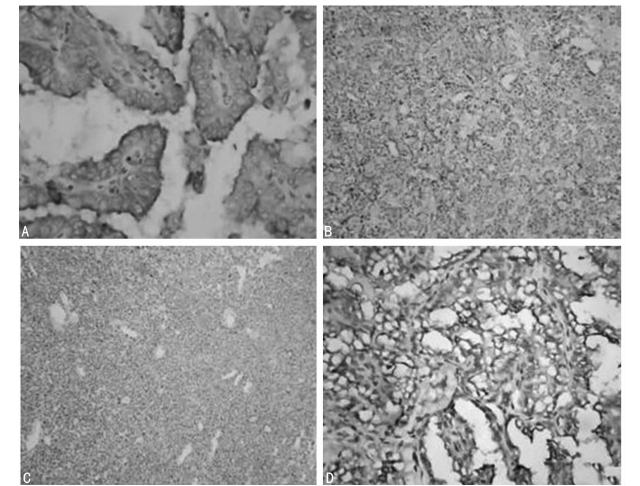
2.2 BRAF 突变情况的分析 通过 BRAF 基因检测发现,62 例甲状腺癌患者中有 37 例 BRAF 基因发生

突变,阳性率为 59.68%,BRAF 突变为点突变,具体表现为 15 号外显子 1799 位点,腺嘌呤替换为胞嘧啶(T1799A)。62 例甲状腺良性病变患者组织均没有发生 BRAF T1799A 基因突变,突变率为 0。在阳性分级较低的 I 和 II 级中,BRAF 的突变率分别为 46.15%(12/36)和 50.00%(10/20),在侵袭行为较高

的阳性分级到达 III 级的甲状腺癌组织中 BRAF 的突变率明显提高,达到 93.75(15/16)。当肿瘤直径≥1 cm 时,BRAF 的突变率达到 78.26%(36/46),直径<1 cm 时,BRAF 的突变率明显降低,突变率为 6.25%(1/16)。

表 1 两组患者组织 CK19、HBME-1 表达差异比较[n(%)]

组别	例数 (n)	CK19				阳性事件	HBME-1				阳性事件
		—	+	++	+++		—	+	++	+++	
甲状腺良性病变组	62	50(80.65)	12(19.35)	0(0.00)	0(0.00)	12(19.35)	58(93.55)	4(6.45)	0(0.00)	0(0.00)	4(6.45)
甲状腺癌组	62	0(0.00)	2(3.23)	8(12.90)	52(83.87)	62(100.00)	2(3.23)	10(16.13)	18(29.03)	32(51.61)	60(96.77)
χ ²				16.354					17.854		
P				0.001					0.002		



注:A 表示甲状腺癌组织 CK19 呈强阳性;B 表示甲状腺良性病变组织 CK19 呈弱阳性;C 表示甲状腺良性病变组织中 HBME-1 呈弱阳性;D 表示甲状腺癌组织 HBME-1 呈强阳性

图 1 甲状腺癌与甲状腺良性病变组织 CK19、HBME-1 免疫组织化学图

病理特征	BRAF[n(%)]		r	P
	+	—		
CK19	62(100.00)	0(0.00)	2.368	0.023
HBME-1	60(96.77)	2(3.23)	3.798	0.027
TMN 分期				
I	12(46.15)	14(53.85)	−3.264	0.025
II	10(60.00)	10(40.00)	−1.574	0.031
III	15(93.75)	1(6.25)	−2.123	0.032
肿瘤直径(cm)				
≥1	36(78.26)	10(21.74)	−3.385	0.012
<1	1(16.67)	15(83.33)	−5.687	0.035

2.3 Spearman 相关分析 将甲状腺癌患者 BRAF

基因突变与 CK19、HBME-1 表达、肿瘤分期以及肿瘤直径等进行 Spearman 相关性分析,结果显示,BRAF 基因突变阳性率与肿瘤直径、TNM 分期呈负相关(均 $P<0.05$),与 CK19 以及 HBME-1 阳性表达率呈显著正相关(均 $P<0.05$),数据见表 2。

3 讨论

CK19 是一类低分子量角蛋白,在多种上皮组织中均可表达^[8]。近年来,相关研究结果表明,甲状腺癌患者上皮组织中的 CK19 表达水平较高,阳性率为 70.00%~100.00%,而在甲状腺良性病变组织的阳性率不稳定,没有确切的阳性表达^[9]。这些研究结果显示,甲状腺癌患者组织中的 CK19 表达率远高于甲状腺良性病变患者组织,灵敏度高达 100.00%^[10]。本研究结果显示,甲状腺癌患者组织中的 CK19 阳性率达 100.00%,而甲状腺良性病变患者的 CK19 阳性率仅为 19.35%,与上述研究结果一致。然而最近研究表明,CK19 的特异性较低,导致临床诊断甲状腺癌使用 CK19 作为观察指标的作用受限,故而临床诊断过程不能单独依靠 CK19 阳性诊断甲状腺癌^[11]。同时,研究结果发现,中等以上强度的 CK19 阳性表达对甲状腺癌有较好的警惕性作用,说明 CK19 具有一定的作用。

HBME-1 是间皮细胞微绒毛表面特异性标志物。因其在肿瘤血管的形成、肿瘤的生长以及肿瘤的转移中发挥重要作用,并且高表达于甲状腺癌组织中,因此,可应用于临床诊断甲状腺癌良恶性肿瘤。相关研究报道,HBME-1 在甲状腺癌组织和甲状腺良性病变组织病变间的表达差异有统计学意义,特异度和灵敏度均较高^[12]。可见,HBME-1 在用于甲状腺癌的鉴别诊断时,是一项较为理想的标志物。有研究结果发现,若以特异性最高的 HBME-1 联合 CK-19 蛋白作为临床诊断甲状腺癌的依据,可使病理诊断结果更加

可靠。本研究结果中, HEME-1 在甲状腺癌组织中阳性检出率为 96.77%, 在甲状腺良性病变组织中的阳性检出率 6.45%, 也说明 HEME-1 在恶性肿瘤中检出的灵敏度较高。

BRAF 位于 7q34, 是 RAF 基因家族成员之一, 在 MAPK 信号通路中起重要作用。近年文献报道, BRAF 基因突变多发于甲状腺癌患者组织, 最多见的突变位点是 15 外显子 1799 位点, 该处的 T 被替代成 A(T1799A), 导致编码的蛋白产物发生改变, 第 600 位本应是缬氨酸结果变成了谷氨酸, 致使基因介导的信号通路发生了异常, 但该突变仅见于甲状腺癌和部分可能起源于甲状腺癌的未分化癌患者^[13]。国外相关研究报道表明, 甲状腺癌患者组织中的 BRAF 基因 15 外显子 1799 位点突变率多在 30%~45%, 而国内相关报道甚少^[14-15]。本研究结果显示, 甲状腺良性病变患者组织没有 1 例发生 BRAF 基因突变, 而甲状腺癌患者多达 37 例发生 BRAF T1799A 突变, 与国外报道相似, 表明 BRAF 基因突变可能是甲状腺癌发生的一项重要事件, 有利于临床早期诊断甲状腺癌。但与国外研究的结果有所不同, 本研究中的 BRAF T1799A 突变率略高于国外水平, 其可能原因是与环境因素有关。BRAF 基因突变与 CK19、HBME-1 表达水平存在显著正相关, 同时本研究发现 BRAF 基因突变与临床病理参数(TMN 分期、肿瘤直径)存在显著负相关, 再次表明 BRAF 基因突变以及 CK19、HBEM-1 可作为临床诊断甲状腺癌的指标。

4 结 论

本研究首次探讨了甲状腺癌发生过程中 BRAF 基因突变与 CK19 和 HBME-1 分子表达间的相关性, 结果表明将 BRAF 基因突变与 CK19 和 HBEM-1 进行联合检测对甲状腺癌发生的诊断具有较高的临床价值, 可作为临床诊断指标。

参考文献

- [1] 胡传祥, 赵静, 于洋, 等. 甲状腺乳头状癌碘摄入与 BRAFV600E 突变的相关性研究[J]. 中华普通外科杂志, 2015, 30(9): 687-691.
- [2] BRITO J P, CASTANEDA-GUARDERAS A, GIONFRIDO M R, et al. Development and pilot testing of an encounter tool for shared decision making about the treatment of Graves' disease[J]. *Thyroid*, 2015, 25(11): 1191.
- [3] BRITO J P, AI N A, MONTORI V M, et al. The impact of subclinical disease and mechanism of detection on the rise in thyroid cancer incidence: a population-based study in olmsted county, minnesota during 1935 through 2012

- [J]. *Thyroid*, 2015, 25(9): 999-1007.
- [4] 李仕亮, 孙纷纷, 邵国安, 等. 甲状腺癌中 PTEN 蛋白表达与 BRAFV600E 突变的相关性研究[J]. *现代肿瘤医学*, 2017, 25(6): 871-875.
- [5] COSTA H A, LEITNER M G, SOS M L, et al. Discovery and functional characterization of a neomorphic PTEN mutation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(45): 13976.
- [6] HUAN Q, WANG K, LOU F, et al. Epidemiological characteristics of thyroid nodules and risk factors for malignant nodules: a retrospective study from 6 304 surgical cases[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2014, 127(12): 2286.
- [7] LINNEKAMP J F, WANG X, MEDEMA J P, et al. Colorectal cancer heterogeneity and targeted therapy: a case for molecular disease subtypes [J]. *Cancer Research*, 2015, 75(2): 245.
- [8] PATEL D T, KITAHARA C M, PARK Y, et al. Thyroid cancer and nonsteroidal antiinflammatory drug use: a pooled analysis of patients over 40 years of age[J]. *Thyroid*, 2015, 25(12): 1355-1362.
- [9] XIE X, KOH J Y, PRICE S, et al. Atg7 overcomes senescence and promotes growth of brafv600e-driven melanoma [J]. *Cancer Discovery*, 2015, 5(4): 410-423.
- [10] SARIDAKI Z, SOUGLAKOS J. Genetic alterations in colorectal cancer in older patients[M]. London: Springer, 2013: 1-10.
- [11] 张永久, 陈琳, 郭红, 等. BRAF-V600E 基因突变与甲状腺乳头状癌相关性研究[J]. *西北国防医学杂志*, 2015, 37(4): 211-213.
- [12] ZHENG L, ZHAO M, HU X, et al. Clinical significance of HBME-1, Galectin-3, and CK19 expression and the status of BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma[J]. *Oncol Translat Med*, 2016, 2(4): 174-178.
- [13] ATIK E, GURAY M, GUNESACAR R, et al. Immunohistochemical analysis of thyroid follicular neoplasms and BRAF mutation correlation[J]. *Indian J Cancer*, 2014, 51(1): 63-68.
- [14] ZHU X, SUN T, LU H, et al. Diagnostic significance of CK19, RET, galectin-3 and HBME-1 expression for papillary thyroid carcinoma[J]. *J Clin Pathol*, 2010, 63(9): 786-789.
- [15] GUCER H, BAGCI P, BEDIR R, et al. The value of HBME-1 and Claudin-1 expression profile in the distinction of BRAF-like and RAS-like phenotypes in papillary thyroid carcinoma[J]. *Endocr Pathol*, 2016, 27(3): 1-9.

(收稿日期: 2018-09-22 修回日期: 2018-11-04)