

安徽省皖南地区甲状腺乳头状癌患者 BRAF 和 K-ras 基因突变的调查

沈丽娟¹, 吴平平², 钟芳芳¹, 倪 勇³, 王朝圣⁴, 孙雪松³

[摘要] **目的:** 调查安徽省皖南地区甲状腺乳头状癌(PTC)的主要基因突变。**方法:** 收集 PTC 石蜡包埋组织 33 例, 进行 DNA 提取, 聚合酶链反应法扩增和基因测序检测鼠类肉瘤滤过性毒菌致癌同源体 B1 基因(BRAF)中的缬氨酸(V)被谷氨酸(E)替代(V600E)和 K-ras 基因的 12 和 13 密码子基因突变。所有患者术前均采用发光免疫法检测血清总三碘甲状腺原氨酸、游离三碘甲状腺原氨酸、总四碘甲状腺原氨酸、游离四碘甲状腺原氨酸和促甲状腺激素。**结果:** 33 例样本中有 13 例检测出 BRAF 基因 V600E 突变, 突变率 39.4%; 而 K-ras 基因的 12 和 13 密码子没有发现突变; BRAF 基因 V600E 突变与患者性别、年龄和肿瘤直径无关; BRAF 基因突变患者血清总三碘甲状腺原氨酸、游离三碘甲状腺原氨酸和促甲状腺激素水平均低于基因非突变患者($P < 0.05 \sim P < 0.01$), 基因突变患者血清游离四碘甲状腺原氨酸水平明显高于非突变患者($P < 0.01$), 而两者总四碘甲状腺原氨酸水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论:** BRAF 基因 V600E 突变是皖南地区 PTC 患者的高发基因突变。

[关键词] 甲状腺乳头状癌; 基因突变; 鼠类肉瘤滤过性毒菌致癌同源体 B1 基因; K-ras 基因

[中国图书资料分类法分类号] R 736.1

[文献标志码] A

Investigation of BRAF and K-ras gene mutations in patients with papillary thyroid carcinoma at Wannan region of Anhui province

SHEN Li-juan¹, WU Ping-ping², ZHONG Fang-fang¹, NI Yong³, WANG Chao-sheng⁴, SUN Xue-song³

(1. Department of Pathology Laboratory of Molecular Diagnosis, 3. Department of Clinical Laboratory, 4. Department of Surgery, The Hospital of Traditional Chinese Medicine of Wuhu in Anhui Province, Wuhu Anhui 241000; 2. Department of Pathology, The Second People's Hospital of Wuhu in Anhui Province, Wuhu Anhui 241000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the major mutations in patients with papillary thyroid carcinoma at Wannan region of Anhui.

Methods: Thirty-three paraffin-embedded samples were collected. After extraction of DNA, the glutamate replaced valine(V600E) of v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1(BRAF) gene, and the mutations in 12 and 13 codon of K-ras gene were detected using polymerase chain reaction and gene sequencing. Serum total triiodothyronine, free triiodothyronine, total tetraiodothyronine, free tetraiodothyronine and thyroid stimulating hormone of all the cases were measured by luminescent immunoassay before operation.

Results: V600E mutation of BRAF was detected in 13 of the 33 cases(39.4%); Meanwhile, no mutation in 12 and 13 codon of K-ras gene was detected. There was no significant association between V600E mutations of BRAF and the gender, age or diameter of the tumor. The levels of serum triiodothyronine, free triiodothyronine and thyroid stimulating hormone in patients with V600E mutation of BRAF were significantly lower than those in patients without V600E mutation of BRAF($P < 0.05$ to $P < 0.01$). The levels of serum free tetraiodothyronine in patients with V600E mutation of BRAF were significantly higher than those in patients without V600E mutation of BRAF($P < 0.01$); the level of serum total tetraiodothyronine had no significant difference between the two groups($P > 0.05$).

Conclusions: V600E mutation of BRAF gene is the major mutation in papillary thyroid carcinoma patients at Wannan region of Anhui

[Key words] papillary thyroid carcinoma; mutation; v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1; K-ras gene

甲状腺癌是最常见的内分泌系统恶性肿瘤, 占头颈部肿瘤的首位, 其中甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)最为常见, 约占 80%^[1]。PTC 患者的 5 年生存率较高, 但临床研究^[2]表明

10 年后的复发率约为 15%, 是 PTC 患者死亡的主要原因。有研究^[3]认为, PTC 的发生、发展、肿瘤转移以及复发与相关基因突变存在密切的关联。因此相关肿瘤基因突变的研究已经成为目前 PTC 研究的热点。相关研究^[4-6]已经初步揭示了 PTC 患者可能发生的基因突变, 例如鼠类肉瘤滤过性毒菌致癌同源体 B1(BRAF)基因点突变、RET 原癌基因重排、PAX8/PPAP 重排和 K-ras(KRAS)基因点突变等。其中, BRAF 基因中的缬氨酸(V)被谷氨酸(E)

[收稿日期] 2013-08-31

[作者单位] 1. 安徽省芜湖市中医院 病理科分子诊断实验室, 3. 检验科, 4. 外科, 241000; 2. 安徽省芜湖市第二人民医院 病理科, 241000

[作者简介] 沈丽娟(1965-), 女, 副主任医师。

替代(V600E)突变最为常见, KRAS 的 12、13 和 61 密码子的突变频率也较高^[7]。本次研究旨在调查安徽省皖南地区的病例, 积累当地 PTC 的基因突变记录, 同时探讨 PTC 患者临床指标与基因突变之间可能的相关性。

1 材料与方法

1.1 标本来源 收集 2012 年安徽省芜湖市中医院, 芜湖市第二人民医院 PTC 石蜡包埋组织 33 例, 其中男 5 例, 女 28 例, 年龄 26 ~ 81 岁。

1.2 主要仪器和试剂

1.2.1 试剂 引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成, DreamTaq Master Mix 购自 Fermentas, DNA marker 购自南京金斯瑞生物科技有限公司。其它试剂和溶剂均为分析纯。

1.2.2 仪器 ABI7500 型聚合酶链反应(PCR)仪; 净化工作台(苏州净化设备有限公司); 高速冷冻离心机(Sigma 1 ~ 14K); 三恒电泳仪(上海博彩生物)。

1.3 引物设计 BRAF 基因引物根据序列 NG_007873.2(GenBank ID)设计, KRAS 基因引物根据序列 NG_007524.1 设计, 设计时以 Primer Premier 5 软件评估引物的解链温度等参数。引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

引物名称	序列	长度/ bp	Tm 值/ ℃	目的 片段/bp
BDCDBR-F	CTC TTC ATA ATG CTT GCT CTG ATA GGA	27	63.0	167
BDCDBR-R	GAC AAC TGT TCA AAC TGA TGG GAC C	25	63.8	
BDCDKR-F	AGG TAC TGG TGG AGT ATT TGA TAG TGT	27	59.4	209
BDCDKR-R	CCT CTA TTG TTG GAT CAT ATT CCT C	25	59.3	

1.4 基因突变检测

1.4.1 石蜡组织 DNA 提取 取石蜡组织切片 15 张, 加 1 ml 二甲苯, 37 ℃ 作用 3 h, 10 000 r/min 离心 3 min, 倾去二甲苯。重复 3 次。梯度乙醇水化, 先 100% 乙醇 1 ml, 室温 30 min, 10 000 r/min 离心 3 min, 去上清液; 再依次使用 95%、75%、50% 乙醇水化。用 1 × SSC 500 μl 洗涤沉淀, 12 000 r/min 离心 3 min。干燥沉淀后加石蜡消化液 400 μl, 20 mg/ml 的 Proteinase K 20 μl, 混匀, 55 ℃ 消化 120 h。98 ℃ 煮沸 10 min, 灭活 Proteinase K, 置冰上迅速冷却, 10 000 r/min 离心 5 min。取上清液加等量的酚 - 氯仿, 颠倒混匀成乳白色, 14 000 r/min 离

心 10 min。取上清液, 加 2 倍体积冰无水乙醇及 1/10 的乙酸钠(pH 5.2), 颠倒混匀。置 -20 ℃ 30 min, 14 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液。沉淀用 1 ml 70% 的乙醇洗涤, 14 000 r/min 离心 5 min, 自然干燥沉淀, 最后加 20 μl TE 溶解 DNA。

1.4.2 PCR 检测 PCR 反应体系如下: DreamTaq Master Mix(2 ×) 25 μl, Primer(F + R, 10 μmol) 1 μl, DNA 模板 1 μl, 加水补足 50 μl。反应条件: 预变性 95 ℃ 3 min; 变性 95 ℃ 15 s, 退火 55 ℃ 30 s, 延伸 72 ℃ 31 s, 35 个循环; 最后 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 完成后取 2 μl 产物于 2% 的琼脂糖凝胶电泳, 90 V 30 min, 观察并记录结果。

1.4.3 测序 PCR 产物由南京金斯瑞生物科技有限公司进行纯化和测序, 测序引物分别为 BDCDBR-F 和 BDCDKR-F。

1.5 观察指标 观察 PTC 患者 PCR 扩增情况, 基因突变检测结果和 BRAF 基因突变与血清总三碘甲状腺原氨酸(TT3)、总四碘甲状腺原氨酸(TT4)、游离三碘甲状腺原氨酸(FT3)、游离四碘甲状腺原氨酸(FT4)和促甲状腺激素(TSH)水平的关系。

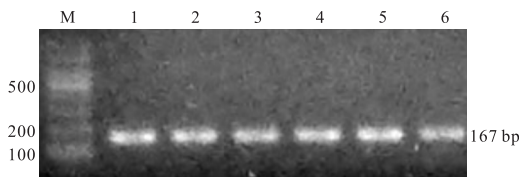
1.6 统计学方法 采用 *t*(或 *t'*) 检验和四格表确切概率法。

2 结果

2.1 PCR 扩增结果 BRAF 和 KRAS 的 PCR 扩增结果见图 1、2, 获得靶片段。

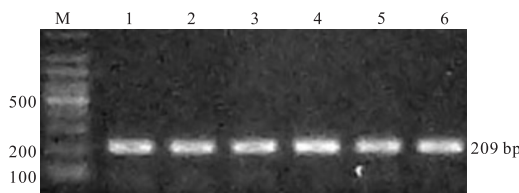
2.2 基因突变检测结果 33 例 PTC 患者样本中检出 13 例 BRAF 的 1799T > A, 即 V600E, 突变频率为 39.4%, 其中 5 例男性患者 2 例突变, 女性患者突变率为 39.3%, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。BRAF 基因在肿瘤直径 ≤ 1 cm 的 PTC 患者中突变率为 20.0%, 直径 > 1 cm 者为 47.8%。年龄 ≤ 45 岁的 PTC 患者中 BRAF 基因突变率为 42.1%, > 45 岁患者为 35.7%, 差异均无统计学意义($P > 0.05$) (见表 2)。突变的测序图谱见图 3。33 例样本中未检测到 KRAS 基因 12 和 13 密码子突变。

2.3 PTC 患者 BRAF 基因突变与血清 TT3、TT4、FT3、FT4 和 TSH 水平的关系 在 33 例 PTC 患者中, BRAF 基因突变患者血清 TT3、FT3 和 TSH 水平均低于基因非突变患者($P < 0.05 \sim P < 0.01$), 基因突变患者血清 FT4 水平明显高于非突变患者($P < 0.01$), 而两者 TT4 水平差异无统计学意义($P > 0.05$) (见表 3)。



M:marker;1~6:样本

图1 BRAF的PCR扩增结果



M:marker;1~6:样本

图2 KRAS的PCR扩增结果

0 80 90 10
 T T G G T C T A G C T A C A G A G A A A T C T C G A T G G A

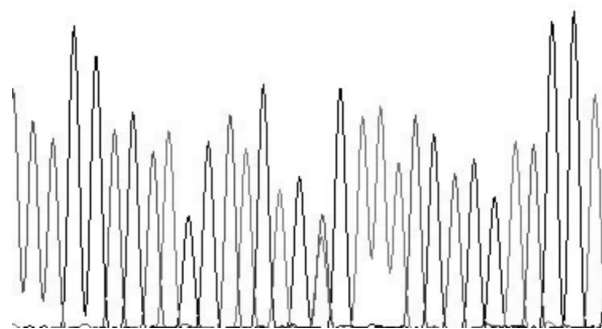


图3 突变的测序图谱BRAF 1799T>A V600E

表2 PTC 患者临床指标与 BRAF 基因突变的关系(n)

临床指标	n	BRAF V600E	突变率/%	P
性别				
男	5	2	2/5	1.000
女	28	11	39.3	
年龄/岁				
≤45	19	8	42.1	0.736
>45	14	5	35.7	
肿瘤直径/cm				
≤1	10	2	20.0	0.246
>1	23	11	47.8	

表3 PTC 患者中 BRAF 基因突变与血清 TT3、TT4 和 FT3、FT4、TSH 的关系($\bar{x} \pm s$)

BRAF 基因	n	TT3/ (ng/ml)	TT4/ (ng/ml)	FT3/ (pg/ml)	FT4/ (pg/ml)	TSH/ (mIU/ml)
突变	13	1.73 ± 0.16	105.87 ± 6.11	4.58 ± 0.18	12.46 ± 0.47	2.11 ± 0.12
未突变	20	1.91 ± 0.07	103.65 ± 4.18	4.72 ± 0.16	11.71 ± 0.67	3.36 ± 0.46
t	—	3.83 *	1.24	2.34	3.51	11.56 *
P	—	<0.01	>0.05	<0.05	<0.01	<0.01

* 示 t' 值

3 讨论

甲状腺癌起源于滤泡细胞,PTC 是其最常见的类型,PTC 的发生与丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路密切相关。MAPK 信号通路包括 ERK(p42/p44 MAPK)、SAPK/JNK、p38 MAPK 及 ERK5。上述通路可通过调节多种不同的基因和其他辅助调节基因启动子的主要调节元件,调控细胞生长、发育和细胞间的功能同步等多种生理及病理过程,在通路异常激活时可致肿瘤发生。

近年研究^[10]发现,甲状腺癌的发生包含了一系列高发的遗传学事件:RET 基因重排与 PTC 密切相关;抑癌基因 p53 的失活与甲状腺癌有关;原癌基因 erbB-2 基因突变也可在甲状腺癌组织中检测到。BRAF 基因为 RAF 家族成员,位于 7 号染色体,含 18 个外显子,是 RET 和 RAS 的下游信号分子,是编码 B 型有丝分裂原激活的蛋白激酶依赖性激酶的激酶。有研究^[8]证明,BRAF 基因第 15 位外显子上的 1799T>A 突变导致 BRAF 中的 V600E,进而持续激活 BRAF 激酶,造成 MAPK 通路持续活化,细胞无限制分裂、增殖,进而形成肿瘤。

本研究对 33 例 PTC 患者的癌组织进行了基因突变检测,其中 13 例发现了 BRAF 的 V600E,突变率为 39.4%,与文献^[3]报道较为一致。我们发现 BRAF V600E 在 PTC 患者的性别、年龄、肿瘤的大小间差异均无统计学意义($P > 0.05$)。有学者^[9]分析,PTC 肿瘤的大小可能与 BRAF 的 V600E 有关,肿瘤体积大的患者预后较差。我们认为本研究中患者样本数量相对不充分可能是造成上述研究结果差异的主要原因。本研究还发现 BRAF V600E 突变 PTC 患者血清 TT3、FT3、FT4 和 TSH 水平与未突变者差异均有统计学意义($P < 0.05 \sim P < 0.01$),而两者血清 TT4 水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。我们认为 BRAF V600E 突变可能是引起滤泡细胞分泌改变的原因之一。高水平 TSH 的长期刺激是 PTC 的诱因之一,但是 BRAF 突变阳性患者的血清 TSH 水平显著低于未突变的患者,提示 BRAF 突变是比 TSH 更强的 PTC 诱发因素。

KRAS 基因突变在 PTC 中也较为常见,主要集中于 12、13 和 61 密码子,但是不同学者的研究结果差异较大,Goutas 等^[10]分析了希腊人群 PTC 的基因突变,证明 KRAS 的 12 密码子突变率为 54.5%,而 Fukushima 等^[11]仅在滤泡状甲状腺癌组织中发现 KRAS 存在 Q61R 突变,在 PTC 中未发现 KRAS 突

变。在我们研究中也未发现 KRAS 的 12、13 密码子突变,与 Fukushima 等^[11]研究结果近似,提示 PTC 中 KRAS 的突变在不同人种或者地域间存在差异,需要更多的研究来证明。

PTC 的 BRAF 基因突变与甲状腺过氧化酶和 Na⁺/I⁻同向转运体基因的低表达有关,对 BRAF 突变基因型的 PTC 患者术后行¹³¹I 放射性辅助治疗可能无效。因此,检测 BRAF 基因突变对于 PTC 患者的治疗具有重要的指导意义。

[参 考 文 献]

- [1] Choi YM, Kim TY, Song DE, *et al.* Papillary thyroid carcinoma arising from a thyroglossal duct cyst: a single institution experience [J]. *Endocr J*, 2013, 60(5): 665 - 670.
- [2] 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.
- [3] Park WS, Chung KW, Young MS, *et al.* Differential protein expression of lymph node metastases of papillary thyroid carcinoma harboring the BRAF mutation [J]. *Anticancer Res*, 2013, 33(10): 4357 - 4364.
- [4] Mordalska A, Latek J, Ferenc T, *et al.* Evaluation of NDRG2 gene expression in primary papillary thyroid carcinoma and in metastases of this neoplasm to regional lymph nodes [J]. *Thyroid Res*, 2010, 3(1): 6.
- [5] Wojciechowska-Durczynska K, Krawczyk-Rusiecka K, Cyniak-Magierska A, *et al.* Relative quantification of PIK3CA gene

expression level in fine-needle aspiration biopsy thyroid specimens collected from patients with papillary thyroid carcinoma and non toxic goitre by real-time RT-PCR [J]. *Thyroid Res*, 2010, 3(1): 5.

- [6] Schmitt AC, Cohen C, Siddiqui MT. Paired box gene 8, HBME-1, and cytokeratin 19 expression in preoperative fine-needle aspiration of papillary thyroid carcinoma: diagnostic utility [J]. *Cancer Cytopathol*, 2010, 118(4): 196 - 202.
- [7] Gong RX, Gong YP, Yang J, *et al.* Efficient detection of the V600E mutation of the BRAF gene in papillary thyroid carcinoma using multiplex allele-specific polymerase chain reaction combined with denaturing high-performance liquid chromatography [J]. *Genet Mol Res*, 2013, 12(4): 4990 - 4997.
- [8] Lee EK, Chung KW, Yang SK, *et al.* DNA Methylation of MAPK Signal-inhibiting Genes in Papillary Thyroid Carcinoma [J]. *Anticancer Res*, 2013, 33(11): 4833 - 4839.
- [9] Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications [J]. *Endocr Rev*, 2007, 28(7): 742 - 762.
- [10] Goutas N, Vlachodimitropoulos D, Bouka M, *et al.* BRAF and K-RAS mutation in a Greek papillary and medullary thyroid carcinoma cohort [J]. *Anticancer Res*, 2008, 28(1A): 305 - 308.
- [11] Fukushima T, Takenoshita S. Roles of RAS and BRAF mutations in thyroid carcinogenesis [J]. *Fukushima J Med Sci*, 2005, 51(2): 67 - 75.

(本文编辑 马启)

(上接第 892 页)

治疗,从而找到一种有效的预防和治疗某些恶性肿瘤的方法。

[参 考 文 献]

- [1] 李平,钟雪云,秦艳芳,等. PTEN 在人脑胶质瘤细胞中的表达及其对细胞增殖的影响[J]. *癌症*, 2007, 26(3): 247 - 251.
- [2] De Graeff P, Crijns AP, Ten Hoor KA, *et al.* The ErbB signaling pathway: protein expression and prognostic value in epithelial ovarian cancer[J]. *Br J Cancer*, 2008, 99(2): 341 - 3491.
- [3] 王玲玲,席玉玲,凌斌,等. 凋亡抑制基因 Livin 在卵巢上皮性癌组织中的表达及其与 PTEN 的相关性研究[J]. *蚌埠医学院学报*, 2011, 36(3): 223 - 226.
- [4] 李英红,徐春林,李慧慧. PTEN 在非小细胞肺癌中表达及其临床意义[J]. *哈尔滨医科大学学报*, 2006, 40(5): 394 - 397.
- [5] Guo CY, Xu XF, Wu JY, *et al.* PCR-SSCP-DNA sequencing method in detect-ing PTEN gene mutation and its significance in human gastric cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(24): 3804 - 3811.

- [6] Jang KS, Song YS, Jang SH, *et al.* Clinicopathological significance of nuclear PTEN expression in colorectal adenocarcinoma [J]. *Histopathology*, 2010, 56(2): 229 - 239.
- [7] Zhang Y, Li B, Ji ZZ, *et al.* Notch1 regulates the growth of human colon cancers [J]. *Cancer*, 2010, 116(22): 5207 - 5218.
- [8] Chu D, Wang W, Xie H, *et al.* Notch1 expression in colorectal carcinoma determines tumor differentiation status [J]. *Gastrointest Surg*, 2009, 13(2): 253 - 260.
- [9] Vikhanskaya F, Lee MK, Mazzeo M. Cancer-derived p53 mutants suppress p53-target gene expression-potential mechanism for gain of function of mutant p53 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(6): 2093 - 2104.
- [10] Mungamuri SK, Yang X, Thor AD. Survival signaling by Notch1: mammalian target of rapamycin (mTOR)-dependent inhibition of p53 [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(9): 4715 - 4724.
- [11] Waite K A, Eng C. Protean PTEN: form and function [J]. *Am J Hum Genet*, 2002, 70(4): 829 - 844.

(本文编辑 姚仁斌)