

应用二代测序技术对甲状腺乳头状癌突变基因谱及临床特征相关性的研究

孟甦¹ 陈萍² 杨志学¹ 魏金荣¹ 陈楠² 伍燕琳¹ 赵生斌² 周素娟³ 蒋国勤¹

¹苏州大学第二附属医院甲乳外科 215004; ²苏州精准医疗科技有限公司 215124; ³苏州大学医学部 215006

通信作者: 蒋国勤, Email: jiang_guoqin@163.com

【摘要】 目的 分析甲状腺乳头状癌组织标本的分子特征, 探究其基因突变谱与其临床特征的相关性。**方法** 收集 2020 年 7 月至 2021 年 5 月于苏州大学附属第二医院手术且病理确认为甲状腺乳头状癌的 71 例患者(共 79 份)新鲜肿瘤组织标本, 并统计其临床及病理学资料。应用二代测序技术对肿瘤组织标本进行检测, 研究其病理性突变基因特征, 并使用 Fisher 精确概率检验方法分析其与临床病理特征之间的相关性。**结果** 95% 的新鲜肿瘤组织标本被检测到不同的病理性突变或融合, 15% 的新鲜肿瘤组织标本存在至少 2 种不同的病理性基因突变或融合; 甲状腺乳头状癌患者中, 有病理性突变或融合组的中央组淋巴结转移率明显高于无病理性突变或融合组(62.7% 比 0, $P < 0.05$)。**结论** 具有病理性基因突变或融合的患者更容易出现中央组淋巴结转移, 据此我们认为术前对肿瘤组织进行二代测序分析其分子特征有利于准确判断中央组淋巴结转移情况、方便制定精准的手术方案。

【关键词】 甲状腺癌; 基因突变; 基因融合; 二代测序; 临床特征

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81873730); 苏州市“科教兴卫”青年科技项目(KJXW2021017); 苏州大学第二附属医院优势临床学科群项目(XKTJ-XK202009)

DOI: 10.3760/cma.j.cn421213-20220418-00290

Mutation gene profiling and its correlation with clinical characteristics of thyroid papillary carcinoma by next-generation sequencing technology

Meng Su¹, Chen Ping², Yang Zhixue¹, Wei Jinrong¹, Chen Nan², Wu Yanlin¹, Zhao Shengbin², Zhou Sujuan³, Jiang Guoqin¹

¹Department of Thyroid and Breast, the Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215004, China; ²Suzhou Sano Precision Medicine Ltd, Suzhou 215124, China; ³Soochow University Medical College, Suzhou 215006, China

Corresponding author: Jiang Guoqin, Email: jiang_guoqin@163.com

【Abstract】 Objective To analyze the molecular characteristics of papillary thyroid carcinoma tissue samples and explore the correlation between gene mutation spectrum and clinical features. **Methods** A total of 79 fresh tumor tissue samples were collected from 71 patients with thyroid papillary carcinoma who underwent surgery in the Second Affiliated Hospital of Soochow University from July 2020 to May 2021. Fisher's precision probability test was used to analyze its correlation with clinicopathological features. **Results** Different pathological mutations or fusions were detected in 95% of fresh tumor tissue samples, and at least two different pathological gene co-mutations or fusions were found in 15% of fresh tumor tissue samples. Among patients with papillary thyroid carcinoma, the rate of central lymph node metastasis in patients with pathological mutation or fusion was significantly higher than that in patients without pathological mutation or fusion (62.7% to 0, $P < 0.05$). **Conclusion** Thyroid papillary carcinoma patients with pathological gene mutation or fusion are more prone to the central lymph node metastasis, hereby we think preoperative tumor tissues for next-generation sequencing analysis is helpful to accurately judge the central lymph node metastasis and convenient making precise surgical plan.

【Key words】 Thyroid carcinoma; Gene mutation; Gene fusion; Next-generation sequencing; Clinical characteristics

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81873730); Suzhou "Science and Education and Health" Youth Science and Technology Project (KJXW2021017); Preponderant Clinic Discipline Group Project of the Second Affiliated Hospital of Soochow University (XKTJ-XK202009)

DOI: 10.3760/cma.j.cn421213-20220418-00290

甲状腺癌是全球范围最常见的内分泌系统恶性肿瘤^[1]。因此,仅细胞学诊断的预测价值已不能满足精准诊断甲状腺癌的要求,需要更深入了解甲状腺癌分子特征。二代测序(next-generation sequencing, NGS)技术仅需要少量 DNA 或 RNA 就能同时并行检测几十到几百的基因变异,为肿瘤生物学研究带来了巨大的变革^[2]。本研究通过对甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)新鲜组织标本的二代测序分析,探讨其分子特征与临床特征的相关性。

资料与方法

1. 一般资料:收集 2020 年 7 月至 2021 年 5 月在苏州大学第二附属医院接受手术的 PTC 患者 79 份新鲜肿瘤组织标本(共 71 例患者,其中 63 例单侧,8 例双侧)。统计患者性别、年龄、肿瘤大小、淋巴结转移情况、肿瘤多灶/单灶等临床资料。对 79 份肿瘤样本进行了 DNA 和 RNA NGS 分子检测。所有患者在检测前均提供书面知情同意书。本研究的所有参与者、样本和数据均按照《赫尔辛基宣言》执行,并经苏州大学第二附属医院伦理委员会批准(伦理审批文书批号为 JD-HG-2017-27)。

2. 靶向 DNA 二代测序:甲状腺 34 基因 DNA NGS 方法采用 IDT 靶向捕获探针(购自美国 IDT 公司)并借助分子条形码(UMI)技术来检测基因组 DNA 点突变和插入/缺失和相关基因的拷贝数改变。从新鲜组织样本中提取基因组 DNA (gDNA) (试剂盒 QIAamp DNA Micro Kit 购自德国凯杰公司),之后进行文库构建、杂交捕获和上机测序。生信分析采用参考基因组(hg19),利用 BWA-MEM, GATK, Bamdst, VarDict 及 Annovar 等软件进行分析和注释。

3. 靶向 RNA 二代测序:使用 RNA simple Total RNA Kit (试剂盒 DP419 购自中国天根公司)从肿瘤组织中提取总 RNA。采用实体瘤 56 基因 panel,巢氏聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)以及 NGS 技术,对 100ng 总 RNA 进行文库构建(First Strand Synthesis Module RK20353 ABclona, Second Strand Synthesis Module Module RK20346 试剂盒购自中国爱博泰克公司),最终的 PCR 产物上机测序。测序结果采用 SeqNext 软件(购自德国 JSI GmbH 公司)、STARfusion 和 FusionCatcher 软件同时进行分析。

4. 统计学方法:应用 R version4.1.1 统计软件分析,计量资料间两两比较使用 Fisher 精确检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1. 临床特征:患者平均年龄 45.2 岁;性别比

(男/女)为 1.0/2.2。所有患者中 50 例伴有中央组淋巴结转移;42 例肿瘤为单灶,29 例为多灶。

2. 基因谱:71 例 PTC 患者中 61 例出现不同 I 类病理性基因突变,7 例出现不同病理性基因融合;其中 7 例出现两种不同的共突变,3 例出现 3 种不同的共突变;1 例同时具有病理性突变及融合(表 1);在这些患者中检测到的 I 类病理性突变包括:BRAFV600E 突变(60/71)、TERTp 突变(5/71)、TP53 突变(1/71)、CHEK2 突变(3/71)等;I 类病理性移码突变包括 APC 突变(1/71);I 类病理性无义突变包括 CHEK2 突变(1/71);I 类病理性基因融合:RET 融合(5/71), BRAF 融合(1/71)、NTRK3 融合(1/71);19 例患者检测到具有潜在临床意义的 II 类突变如 ATM_Un 等基因突变;5 例存在 TERTp 与 BRAFV600E 共突变;其中 1 例检出 BRAFV600E 突变、PIK3CA 突变、TERTp 共突变;2 例具有 BRAFV600E、RAS 共突变。我们检测到 4 例 CCDC6:RET 融合,1 例 NCOA4:RET 融合,1 例 ETV6:NTRK3 融合以及 1 例 MACF1:BRAF 融合;其中 1 例同时具有 CHEK2 的突变及 MACF1:BRAF 的融合。

3. 相关性研究结果:采用费希尔精确检验分别分析了患者单灶与多灶结节、中央组淋巴结转移有无与病理性基因突变或融合有无的相关性(患者淋巴结转移情况与病理性基因突变类型统计详见表 2)。结果表明:甲状腺乳头状癌患者中,有病理性突变或融合组的中央组淋巴结转移率明显高于无病理性突变或融合组(62.7% 比 0, $P < 0.05$);有病理性突变或融合组患者的多病灶率与无病理性突变或融合组无明显统计学差异(49.3% 比 0, $P < 0.05$);因此存在病理性基因突变或融合的患者更容易出现中央组淋巴结转移。

讨论

本研究中,PTC 患者中 BRAFV600E 突变发生率高达 85%,远高于癌症基因组图谱(the cancer genome atlas, TCGA)数据库中 BRAFV600E 61.7% 的发生率^[3]。我们还发现一例患者存在 BRAFV600E、PIK3CA 和 TERTp 共突变。本研究中,BRAFV600E 和 TERTp 共突变发生率达到 7%,其中 4 例为单灶并伴有淋巴结转移。

RET 基因常以本身断裂再与另一基因融合而重组为新的基因,具备自我磷酸化且持续激活,CCDC6:RET、NCOA4:RET 已被报道出现于 PTC 及低分化甲状腺癌中,可能具有肿瘤去分化潜能^[4]。在本研究 5 例出现 RET 融合基因的患者中,3 例出现中央组淋巴结转移及颈部转移癌结节,其中 1 例出现颈侧区淋

表 1 存在共突变患者病理类型及突变基因与位点信息

患者编号	共突变基因名称及基因内位点		
4	BRAF (p. Val600Glu)	CHEK2 (p. His371Tyr)	
7	BRAF (p. Val600Glu)	CHEK2 (p. His371Tyr)	
10	BRAF (p. Val600Glu)	PIK3CA (p. His1047Leu)	TERTp (c. -124C>T)
12(肿物 1)	BRAF (p. Val600Glu)	EIF1AX (p. GLY9Val)	
(肿物 2)	KRAS (p. Gln61Arg)	EIF1AX (p. GLY9Val)	
13	BRAF (p. Val600Glu)	NRAS (p. Gln61Arg)	
24	BRAF (p. Val600Glu)	CHEK2 (p. His371Tyr)	APC (p. Ser1465Trpfs*3)
26	CHEK2 (p. His371Tyr)	MACF1; BRAF	
40	BRAF (p. Val600Glu)	TERTp (c. -124C>T)	
59	BRAF (p. Val600Glu)	TERTp (c. -124C>T)	
65	BRAF (p. Val600Glu)	TERTp (c. -124C>T)	
71	BRAF (p. Val600Glu)	TERTp (c. -124C>T)	

表 2 71 例 PTC 患者中央组淋巴结转移有无与病理性基因突变类型(例)

突变类型	淋巴结无转移	淋巴结有转移
BRAFV600E	26	34
CHEK2	1	3
PIK3CA	1	0
TERTp	1	4
NRAS	0	1
KRAS	0	1
EIF1AX	0	1
APC	0	1
RET 融合	2	3
BRAF 融合	0	1
NTRK3 融合	0	1
无突变	4	0

注:PTC 示甲状腺乳头状癌

巴结转移,这可能与 RET 基因融合对肿瘤增殖、侵袭和迁移有关。

研究结果显示 33% 的患者术前超声检查未发现颈淋巴结转移^[5]。《2021 分化型甲状腺癌诊疗指南》指出:对于术前或术中证实颈淋巴结转移的 PTC 行中央组淋巴结清扫(Ⅰ级推荐),而临床上未发现颈淋巴结转移(cN0)的 PTC 是否行预防性中央组淋巴结清扫存在争议,需要在决策时平衡手术获益和风险^[6]。因此在手术时需更精准的评估方法来诊断中央组淋巴

状态以避免盲目扩大手术范围。本研究通过 Fisher 精确检验发现存在病理性基因突变或融合的患者更容易出现中央组淋巴结转移,这些病理性突变可能是淋巴结转移的关键驱动因素,增加淋巴结转移的风险。因此术前通过 NGS 明确甲状腺肿瘤的分子特征,可能为中央组淋巴结转移风险状态评估提供证据,对于患者术前精准评估、治疗方案的选择具有重要意义。

本研究结果表明,病理性基因突变或融合在 PTC 中普遍存在,存在病理性基因突变或融合的患者更容易出现中央组淋巴结转移,这些病理性突变可能是淋巴结转移的关键驱动因素。因此术前通过 NGS 对 PTC 分子特征进行分析可能为评估中央组淋巴结转移风险提供证据,有利于对甲状腺中央组淋巴结转移状况的精准评估,从而在术前制订精准的手术方案。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

志谢 本研究得到了美国哈佛大学医学院的肖晨的协助

作者贡献声明 孟魁:酝酿和设计实验、实施研究、采集数据、分析/解释数据、文章撰写;陈萍:实施研究、分析/解释数据、对文章的知识性内容作批评性审阅、统计分析、行政、技术或材料支持;杨志学:酝酿和设计实验、采集数据、对文章的知识性内容作批评性审阅;魏金荣:分析/解释数据、对文章的知识性内容作批评性审阅;陈楠、赵生斌、周素娟:统计分析;伍燕琳:实施研究、采集数据

参 考 文 献

[1] Seib CD, Sosa JA. Evolving understanding of the epidemiology of thyroid Cancer[J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 2019, 48(1): 23-35.
DOI: 10.1016/j.ecl.2018.10.002.

[2] Wensel CR, Pluznick JL, Salzberg SL, et al. Next-generation sequencing: insights to advance clinical investigations of the microbiome[J]. J Clin Invest, 2022, 132(7): e154944.
DOI: 10.1172/JCI154944.

[3] Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma[J]. Cell, 2014, 159(3): 676-690.
DOI: 10.1016/j.cell.2014.09.050

[4] Chu YH, Wirth LJ, Farahani AA, et al. Clinicopathologic features of kinase fusion-related thyroid carcinomas: an integrative analysis with molecular characterization[J]. Mod Pathol, 2020, 33(12): 2458-2472.
DOI: 10.1038/s41379-020-0638-5.

[5] Moo TA, McGill J, Allendorf J, et al. Impact of prophylactic central neck lymph node dissection on early recurrence in papillary thyroid carcinoma[J]. World J Surg, 2010, 34(6): 1187-91.
DOI: 10.1007/s00268-010-0418-3.

[6] 中国临床肿瘤学会指南工作委员会. 中国临床肿瘤学会(CSCO)分化型甲状腺癌诊疗指南 2021[J]. 肿瘤预防与治疗, 2021, 34(12): 1164-1200.
Guidelines working committee of Chinese Society of Clinical Oncology. Guidelines of Chinese Society of Clinical Oncology (CSCO) differentiated thyroid cancer[J]. J Cancer Control Treat, 2021, 34(12): 1164-1200.
DOI: 10.3969/j.issn.1674-0904.2021.12.013.

(收稿日期:2022-04-18)