

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.16.007

BRAF^{T1799A}突变、*RET/PTC*重排对术前诊断甲状腺乳头状癌的作用*

王文兰¹ 王萍¹ 赵世华¹ 林东亮² 赵诚³ 王颜刚¹ 王斐^{1△}

(1 青岛大学附属医院内分泌科 山东 青岛 266000;

2 青岛大学附属医院病理科 山东 青岛 266000; 3 青岛大学附属医院超声科 山东 青岛 266000)

摘要 目的:探讨术前超声引导下细针抽吸细胞学检查(US-FNAB)联合 *BRAF*^{T1799A}突变、*RET/PTC1*及*RET/PTC3*重排对诊断甲状腺乳头状癌(PTC)的特异性及敏感性,为临床术前准确诊断 PTC 选择适用的分子标记物。**方法:**收集 346 个超声怀疑为甲状腺恶性结节的 US-FNAB 细胞标本及对应结节(152 个)的术后新鲜组织,采用 PCR 分别扩增 *BRAF*^{T1799A}、*RET/PTC1*及*RET/PTC3*基因,产物经基因测序证实。**结果:**346 个甲状腺术前穿刺的结节中,选择观察而未手术的结节 192 个,手术治疗 152 个,未接受手术建议的结节 2 个。术前 US-FNAB 的细胞标本中共检测到 51 个结节发生 *BRAF*^{T1799A}突变,其细胞学分类为 36 个恶性,11 个可疑恶性,4 个良性。该 51 个结节术后病理证实均为 PTC。20 个发生 *RET/PTC1*重排,其术前细胞学结果为 17 个恶性,2 个可疑恶性,1 个滤泡性肿瘤或可疑滤泡性肿瘤,术后病理证实均为 PTC。3 个结节发生 *RET/PTC3*重排,其术前细胞学结果为恶性,术后病理证实均为 PTC。对 45 个术前 US-FNAB 标本检测 *BRAF*^{T1799A}突变阴性而术后病理证实为 PTC 的结节,将其对应结节的术中组织行该基因的检测,仅有 1 个结节的术后组织中检测到该突变。本研究中,术前 US-FNAB 联合多分子标志物的检测,将细胞学诊断 PTC 的敏感度由 73.96 % 提高到 92.71 %。**结论:**术前 US-FNAB 联合多分子标志物的检测可提高其诊断 PTC 的敏感性 & 特异性,并有助于患者的个体化诊治。

关键词:甲状腺乳头状癌;超声引导下细针抽吸细胞学检查;分子标志物;分子诊断

中图分类号:R736.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)16-3028-06

Detection of *BRAF*^{T1799A} and *RET/PTC* Rearrangements in Preoperative Diagnosis of Papillary Thyroid Carcinoma*

WANG Wen-lan¹, WANG Ping¹, ZHAO Shi-hua¹, LIN Dong-liang², ZHAO Cheng³, WANG Yan-gang¹, WANG Fei^{1△}

(1 Department of Endocrinology, Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao, Shandong, 266000, China;

2 Department of Pathology, Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao, Shandong, 266000, China;

3 Department of Ultrasound, Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao, Shandong, 266000, China)

ABSTRACT Objective: To study the sensitivity and specificity of US-FNAB's (Ultrasound-fine needle aspiration biopsy, US-FNAB) combined with the analysis of *BRAF*^{T1799A}, *RET/PTC* rearrangements in preoperative diagnosis of papillary thyroid carcinoma (PTC) diagnosis in order to provide useful molecular biomarkers for preoperative precise diagnosis of PTC. **Methods:** Thyroid US-FNAB specimens from 346 nodules with suspicious malignancy risk of US features and 152 corresponding surgical samples were examined for the presence of *BRAF*^{T1799A}, *RET/PTC* rearrangements by PCR. DNA sequencing and analysis were performed. **Results:** Of the 346 nodules, 192 nodules were clinically observed, 152 nodules underwent surgery, and 2 nodules refused suggestions of surgery. 51 *BRAF*^{T1799A} mutations were found in FNAB specimens, of which 36 nodules were cytologically diagnosed carcinoma and 11 were indeterminate and 4 were benign. 20 *RET/PTC1* rearrangements were found in FNAB specimens, of which 17 nodules were cytologically diagnosed carcinoma and 2 were indeterminate and 1 follicular adenomas. 3 *RET/PTC3* rearrangements were found in FNAB specimens which were cytologically diagnosed carcinoma. All nodules with the above molecular biomarkers were confirmed PTC after thyroidectomy. *BRAF*^{T1799A} mutation analysis was performed on the surgical specimens from the 45 histologically diagnosed PTC that were negative in US-FNAB samplings. Only one case was negative. Molecular biomarkers analysis significantly enhanced the diagnostic value of cytology for PTC from 73.96 % to 92.71 % . **Conclusions:** Molecular biomarkers analysis can significantly enhance the diagnostic value of cytology for PTC and is also helpful for personal diagnosis and treatment.

Key words: Papillary thyroid carcinoma; US-FNAB; Molecular biomarkers; Molecular diagnosis

Chinese Library Classification(CLC): R736.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)16-3028-06

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81170812);青岛市民生科技计划项目(13-1-3-58-nsh)

作者简介:王文兰(1987-),女,医师,硕士研究生,主要从事内分泌代谢疾病诊治及甲状腺癌发病机制的研究,

电话:18353224989, E-mail:wangwenlan2013@126.com

△通讯作者:王斐,男,主任医师,博士,硕士生导师,主要从事内分泌代谢疾病的诊治及甲状腺癌发病机制的研究

(收稿日期:2015-01-13 接受日期:2015-01-30)

前言

甲状腺癌是内分泌系统最常见的一类恶性肿瘤,其发病率呈逐渐上升趋势^[1-2]。该发病率的增加主要归因于甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)的增加,尤其是高分辨超声的引进,使得甲状腺乳头状微小癌的诊断率显著上升^[1-3]。我院分析统计了近 14 年来我院就诊的 690 例甲状腺癌的患病趋势,其中 PTC 占 81.74%,呈逐年上升趋势,其它甲状腺癌递增不明显^[4]。US-FNAB 是目前术前鉴别甲状腺结节良恶性最可靠的诊断工具,但受一些因素的影响,如穿刺样本不足(10%-21%)或缺乏特征的细胞形态学表现(10%-30%)以及细胞学本身的局限性等,仍有 10%-40%的甲状腺结节不能确诊,其中有接近 44%是恶性^[5,6]。这些未被确诊的患者就需要进一步的观察或重复穿刺,或进行诊断性甲状腺手术,其中有 70%-80%接受了不必要的手术^[7]。随着对分子标志物研究的不断深入,已有国外学者尝试将分子标志物的检测应用到术前穿刺中,以此进一步提高甲状腺结节的术前诊断^[8-11]。然而,US-FNAB 联合分子标志物的检测还未得到大规模的验证、普及,分子标志物对于最优诊治方案的指导还未得到充分的认识。为此,我们收集了与我院行甲状腺术前 US-FNAB 的细胞学标本及相应结节的术后新鲜组织,以此探讨 *BRAF*^{T1799A} 点突变、*RET/PTC1* 及 *RET/PTC3* 重排在甲状腺结节细针穿刺标本中的表达及其对术前诊断结节良恶性的意义。

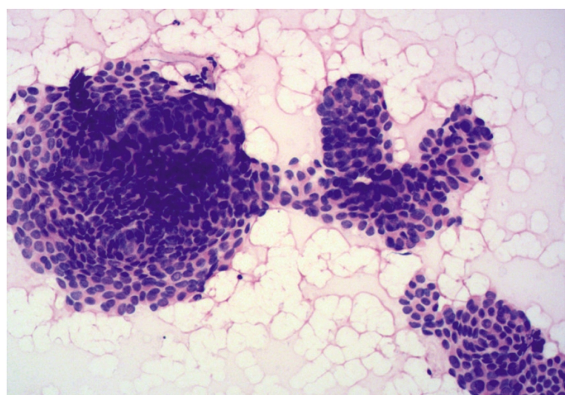


图 1 细胞学诊断恶性涂片(SP× 200)

Fig.1 Cytologic slide of a malignant specimen(SP× 200)

1.2.2 细针穿刺所得标本的处理 用 5 mL 生理盐水反复冲洗上述涂片后的 10 mL 注射器,并将冲洗液收集于 5 mL 冻存管中。立即用低温离心机(4℃;4000 r/min)离心 10 分钟,弃上清液,剩余的 300 μL 的 FNAB 标本置液氮中保存,用于基因组 DNA、RNA 的提取。

1.2.3 对应结节术后新鲜组织的处理 标本离体 1 h 内用眼科剪获取已进行细针穿刺的相应结节组织,装于 2 mL 冻存管中,迅速置于液氮中保存。

1.2.4 *BRAF*^{T1799A} 点突变的基因分析 ① DNA 提取:使用 DNA/RNA 共提取试剂盒(DP422)对 FNAB 的细胞学标本及相应结节术后新鲜组织行 DNA 提取。② DNA 扩增:使用试剂(KT-201)对 DNA (A260/A280 值 1.7-2.0, DNA 浓度 20 ng/μL

1 材料与方法

1.1 材料

收集 2013 年 7 月至 2014 年 8 月我院收治的进行甲状腺术前 US-FNAB 的患者 322 例(共 346 个结节),所有患者均久居青岛、初发、无放射性物质接触史。收集其细针穿刺的标本。选择进一步手术的结节 152 个,收集其术后新鲜组织。标本采集以不影响患者今后的诊治为基准,均得到患者的知情同意,并经医学伦理委员会审核批准。

适应症:超声怀疑为甲状腺癌(直径≥ 0.4 cm)的结节;超声诊断为良性结节,但随访中发现结节明显生长(结节体积增大 50%以上,或至少有两径线超过 20%),或伴有恶变的症状、体征(声音嘶哑、吞咽/呼吸困难、颈部淋巴结大、结节固定)。

1.2 方法

1.2.1 超声引导下细针穿刺细胞学检查 在进行 US-FNAB 前,常规签署知情同意书。超声(西门子 S1000,高频探头 14-5MHz)引导下确认穿刺位置和路径。常规碘伏消毒穿刺位置,铺无菌洞巾。2%的利多卡因逐层浸润麻醉。取 10 mL 注射器,抽 4-5 mL 负压,由最佳穿刺点进针,不同方向反复穿插可疑结节 4-5 次后,迅速拔出针头,将抽吸物推与载玻片上,用拉片法均匀涂片,并用 95%的乙醇固定。将固定的涂片交予病理科行 HE 染色,细胞学诊断(图 1、2)。对于伴有纤维化、钙化的结节,不易得到足够的细胞学标本时,可根据患者情况考虑重复穿刺。

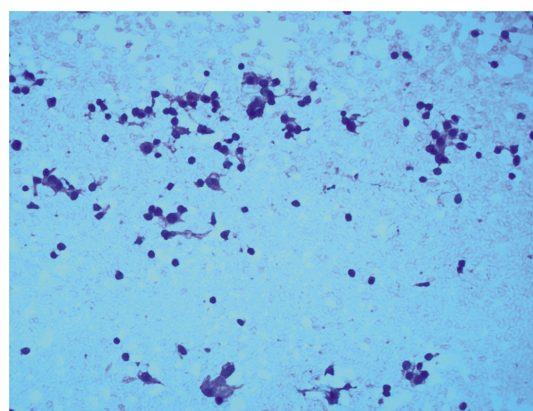


图 2 细胞学诊断良性涂片(SP× 200)

Fig.2 Cytologic slide of benign specimen(SP× 200)

以上)进行 PCR 扩增,扩增体系为 25 μL,反应条件为 94℃ 预变性 3 min;94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,共 35 个循环;72℃,10 min。每组 PCR 均设有内参及空白对照。引物设计参考文献^[12]。③ 琼脂糖凝胶电泳及测序:具体操作步骤参照前期研究^[13]。选择条带单一、清晰的 PCR 产物送于上海申速生物技术有限公司纯化测序。所得序列与正常 *BRAF* 基因组序列进行比对,筛选 *BRAF*^{T1799A} 点突变(图 3、4)。

1.2.5 *RET/PTC1* 及 *RET/PTC3* 基因重排的分析 ① RNA 提取:使用 DNA/RNA 共提取试剂盒(DP422)对 FNAB 的细胞学标本行 RNA 提取。② 逆转录 cDNA:使用逆转录试剂盒(KR106)对 RNA(A260/A280 值 1.7-2.0, RNA 浓度 20 ng/μL 以上)进行逆转录。③ 巢式 PCR 扩增 DNA:使用试剂(KT-201)将

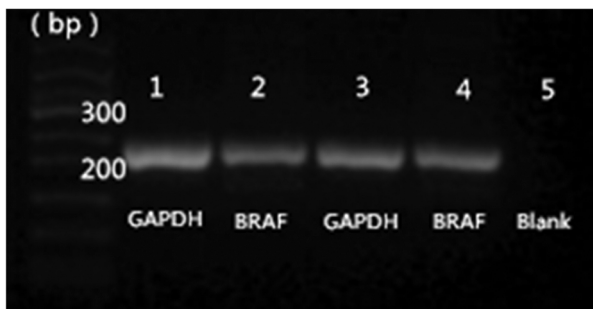
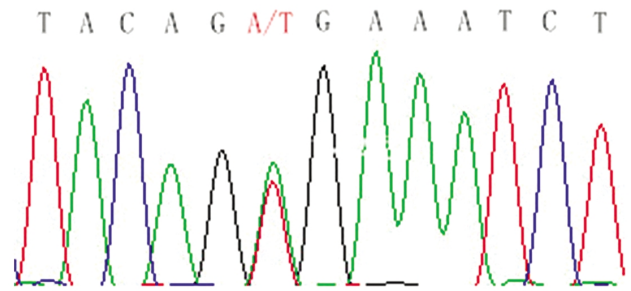
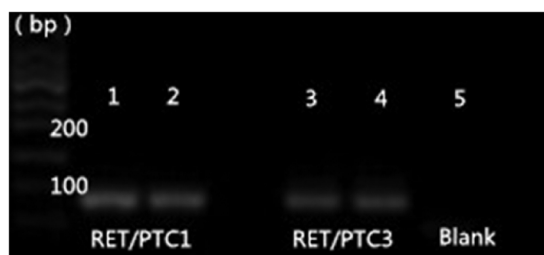
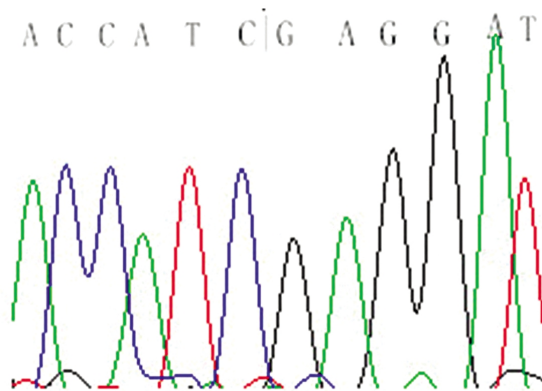
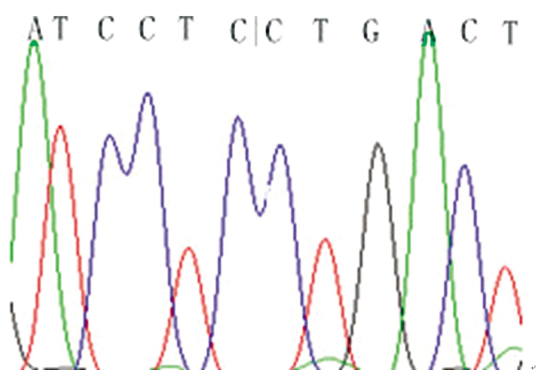


图3 PCR 扩增 BRAF 基因

Fig.3 BRAF gene was analyzed by PCR

图4 $BRAF^{T1799A}$ 点突变Fig.4 $BRAF^{T1799A}$ mutation

所得 CDNA 进行 PCR 扩增。扩增体系 25 μ L, 反应条件及引物参照前期研究^[13]。每组 PCR 均设有内参及空白对照。④ 琼脂糖凝胶电泳及测序: 同上(图 5、6、7)。

图5 巢式 PCR 扩增 $RET/PTC1$ 及 $RET/PTC3$ 重排产物Fig.5 $RET/PTC1$ and $RET/PTC3$ rearrangements were detected by nested-PCR图6 $RET/PTC1$ 重排Fig.6 $RET/PTC1$ rearrangements图7 $RET/PTC3$ 重排Fig.7 $RET/PTC3$ rearrangements

1.3 统计学处理

采用 SPSS19.0 统计学软件进行数据分析, US-FNAB 与 US-FNAB 联合 $BRAF^{T1799A}$ 点突变、 RET/PTC 重排两种甲状腺结节术前诊断方法的比较采用 McNemar 配对 X^2 检验, $BRAF^{T1799A}$ 点突变与患者性别、肿瘤大小、被膜外侵犯、淋巴结转移之间的相关性采用独立 X^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 术前甲状腺 US-FNAB 细胞学结果与术后组织病理类型

依据 Bethesda 病理分级, 细胞学结果分为: 良性 230 个; 非典型 3 个; 滤泡性肿瘤或可疑滤泡性肿瘤 10 个; 可疑恶性 22 个; 恶性 75 个; 无法诊断或不满意 6 个, 重复穿刺后, 4 个细胞学结果为良性, 另 2 个仍无法诊断。(最终细胞学结果及对应术后病理类型见图 8)

2.2 术前 US-FNAB 细胞学标本及其对应结节术后新鲜组织的基因检测结果

术前 US-FNAB 标本中共检测到 51 个结节发生 $BRAF^{T1799A}$ 点突变, 其细胞学分类为 36 个恶性, 11 个可疑恶性, 4 个良性。该 51 个发生突变的结节术后病理证实均为 PTC。20 个发生 $RET/PTC1$ 重排, 其术前细胞学结果为 17 个恶性, 2 个可疑恶性, 1 个滤泡性肿瘤或可疑滤泡性肿瘤, 术后病理证实均为 PTC。3 个结节发生 $RET/PTC3$ 重排, 其术前细胞学结果为恶性, 术后病理证实均为 PTC。对 45 个术前 US-FNAB 标本检测 $BRAF^{T1799A}$ 突变阴性而术后病理证实为 PTC 的结节, 将其对应结节的术中组织行该基因的检测, 仅有 1 个结节的术后组织中检测到该突变。见图 8。

2.3 基因检测的价值

以术后的组织病理为金标准。本研究中, 术前 US-FNAB 诊断 PTC 的敏感性、特异性、准确性分别为 73.96 %、92.86 %、80.92 %。US-FNAB+ $BRAF^{T1799A}$ + $RET/PTC1$ + $RET/PTC3$ 诊断 PTC 的敏感性、特异性、准确性分别为 92.71 %、92.86 %、92.76 %。采用 McNemar 配对 X^2 检验比较 US-FNAB 与 US-FNAB 联合上述分子标志物两种术前诊断方法, $P < 0.05$ ($X^2=16.06$), 差异有统计学意义。从上述具体资料来看, US-FNAB 联合上述分子标志物在术前诊断 PTC 方面更优(表 1、2)。

2.4 $BRAF^{T1799A}$ 点突变与患者性别、肿瘤大小、被膜外侵犯、淋巴结转移之间的相关性

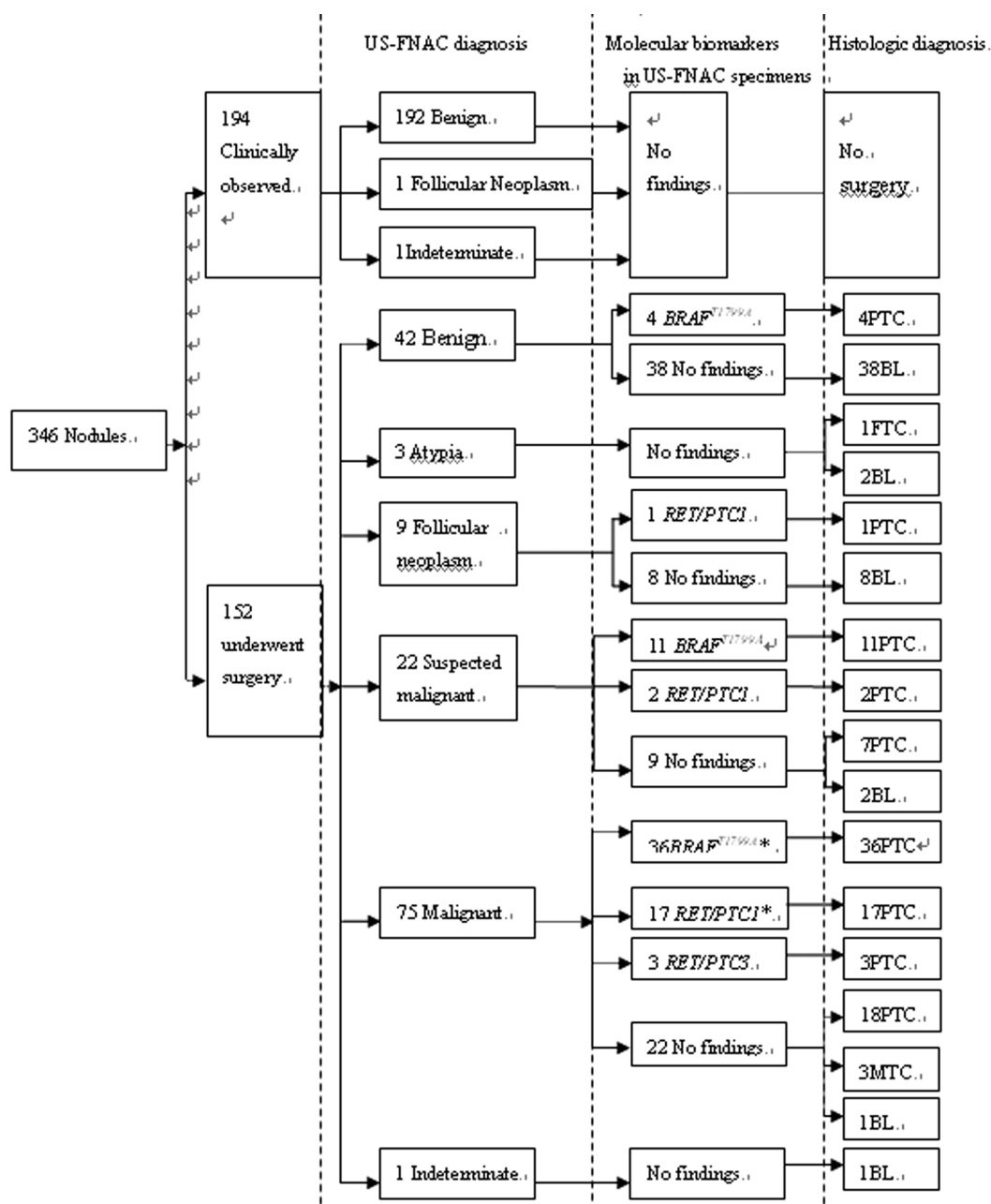


图8 术前 US-FNAC 诊断及其分子标志物的表达以及对应病理诊断

Fig.8 Correlation between preoperative cytology, molecular findings, and corresponding histological diagnosis

Note: PTC, papillary thyroid carcinoma; FTC, follicular thyroid carcinoma; MTC, medullary thyroid carcinoma; BL, benign lesion. *BRAF*^{T1799A} mutations with *RET/PTC1* rearrangements were detected in 3 nodules. No findings meant anyone of *BRAF*^{T1799A} mutation, *RET/PTC1*, *RET/PTC3* rearrangements was detected.

接受手术的 152 个结节中,术后病理证实 96 个为 PTC,其共有 52 个发生 *BRAF*^{T1799A} 点突变,突变率 54.17 % (52/96)。采用独立 X^2 检验探究 *BRAF*^{T1799A} 突变与患者性别、肿瘤大小、被膜外侵犯、淋巴结转移之间的相关性,提示 *BRAF*^{T1799A} 点突变与甲状腺被膜外侵犯相关($X^2=4.11$, $P<0.05$),与患者性别、肿瘤大小、淋巴结转移无明显相关性(表 3)。

3 讨论

BRAF^{T1799A} 点突变主要发生在 PTC(约 45 %左右),其中典型 PTC 占 35 %-79 %,滤泡变异型 PTC 占 5 %-20 %,未分化癌

占 25 %,在其他类型的甲状腺癌以及结节性甲状腺肿中均未发现^[14,15],因此可以推断,该突变对于甲状腺癌的特异性很高。本研究中青岛地区 *BRAF*^{T1799A} 点突变在 PTC 中发生率为 54.12 % (52/96),3 个髓样癌、1 个滤泡状甲状腺癌及 52 个良性结节均未见 *BRAF*^{T1799A} 点突变,与上述文献报道基本相符,但其突变率高于前期(37.5 %)的研究^[13]。推测可能原因有:①本次研究中 PTC 样本例数较之前明显增大,能更准确的反映青岛地区 *BRAF*^{T1799A} 突变情况;②本次研究对象为超声怀疑为甲状腺癌的患者;③不排除近 7 年来 *BRAF*^{T1799A} 点突变在 PTC 中发生率的改变。本研究中,由于样本量有限,*BRAF*^{T1799A} 点突变对于

表 1 术前 US-FNAB 与 US-FNAB 联合 $BRAF^{T1799A}$ 、 $RET/PTC1$ 、 $RET/PTC3$ 诊断 PTC 的敏感性、特异性、准确性(%)

Table 1 Sensitivity and specificity of Preoperative US-FNAB diagnosis and US-FNAB combined with the analysis of $BRAF^{T1799A}$ 、 RET/PTC rearrangements (%)

Preoperative diagnosis	Sensitivity(%)	Specificity(%)	Accuracy(%)
US-FNAB	73.96	92.86	80.92
US-FNA+ $BRAF$ + RET/PTC	92.71*	92.86	92.76*

Note: * $P<0.05$, compared with US-FNAB group.

表 2 152 个甲状腺结节的术前 US-FNAB 与 US-FNAB 联合 $BRAF^{T1799A}$ 点突变、 RET/PTC 重排诊断方法之间比较的四格表(个)

Table 2 Comparison of US-FNAB diagnosis with US-FNAB+ $BRAF$ + RET diagnosis for 152 nodules of thyroid gland

US-FNAB	US-FNA+ $BRAF$ + RET		Total
	Positive	Negative	
Positive	75	0	75
Negative	18	59	77
Total	93	59	152

表 3 $BRAF^{T1799A}$ 点突变与患者性别、肿瘤大小、被膜外侵犯、淋巴结转移之间的相关性

Table 3 Correlation between $BRAF^{T1799A}$ mutation, gender, tumor size, extracapsular extension and lymph node metastasis

Clinical factors	Number	$BRAF^{T1799A}$ mutation(%)	X ² value	P value
Gender				
Male	23	16(69.57)		
Female	73	36(49.31)	2.88	> 0.05
Tumor size(cm)				
< 1.0	49	24(50.00)		
≥ 1.0	47	28(59.57)	1.08	> 0.05
Extracapsular extension				
Yes	32	22(68.75)		
No	64	30(46.88)	4.11	< 0.05
Lymph node metastasis				
Yes	37	24(64.86)		
No	59	28(47.46)	2.77	> 0.05

PTC 特异性为 100%，虽然该基因对于甲状腺癌特异性较高，但近期有 1 病例报道称，使用双引物寡核苷酸多聚酶链反应可以提高检测 $BRAF^{T1799A}$ 点突变的灵敏度，但同时也增加了假阳性结果，尤其对于细胞学检查不能确诊的患者^[16]。尽管目前这方面的报道很少见，但临床医师需注意使用高灵敏度检测方法时该情况的发生。本次研究中 1 个结节术前 US-FNAB 标本未检测 $BRAF^{T1799A}$ 突变而术后组织检测到该基因突变。术前 US-FNAB 标本用于 $BRAF^{T1799A}$ 突变检测的成功率为 98.96 % (95/96)。

除了 $BRAF^{T1799A}$ 点突变，APK 通路中另一常见、重要的基因改变是 RET/PTC 重排。根据不同研究者所采用方法的不同以及地域、年龄等的差异， RET/PTC 重排的发生率也有所不同，散发性 PTC 中占 10 %-20 %，有辐射接触史者高达 50 %-80 %，儿童是 40 %-70 %，低龄和射线暴露是形成 RET/PTC 重

排的危险因子^[17]。本研究中的患者均未接触放射性物质，无儿童，检测结果显示 RET/PTC 重排率为 23.96 % (23/96)。与文献报道基本相符，但与我们前期研究(47.92 %)相比较低。具体原因尚不清楚，可能原因有：①本研究样本为术前 US-FNAB 标本，提取的 RNA 浓度较低，虽然采用巢式 PCR 扩增，但不排除假阴性的可能。尽管在术后组织中对 $BRAF^{T1799A}$ 突变进行了验证，术前 US-FNAB 标本用于 $BRAF^{T1799A}$ 突变检测的成功率为 98.96 %，但该成功率是否适应于 RET/PTC 重排，有待进一步术后组织的验证；②本次选取的对象为超声怀疑为甲状腺癌的患者；③本研究样本较前明显增加，能更准确的反应青岛地区 RET/PTC 重排情况。近期有文献报导，在增长较快的甲状腺滤泡性腺瘤、结节性甲状腺肿、桥本甲状腺炎、甲亢中均有不同程度的发生^[18,19]。而在本次研究中， RET/PTC 重排仅见于 PTC，3 个髓样癌、1 个滤泡状甲状腺癌及 52 个良性结节中均未发现。

可能与研究中除 PTC 外其他类型太少有关。因此,将 *RET/PTC* 重排应用到术前细胞学诊断中要注意假阳性的发生。可以推断 *RET/PTC* 重排在诊治乳头状甲状腺癌方面主要与其他基因,如 *BRAF^{T1799A}* 点突变,联合应用,以提高实验结果的准确性^[20,21]。

本研究中术前 US-FNAB 诊断 PTC 的敏感性、特异性分别为 73.96 %, 92.86 %, 与文献报道基本一致^[12,22]。然而,目前对于细胞学结果阳性的标准尚不统一,有将细胞学诊断恶性定义为阳性,也有将细胞学诊断恶性及可疑恶性均定义为阳性^[12,22,23]。这造成了术前 US-FNAB 诊断甲状腺 PTC 在敏感性、特异性等方面主观的不同。本研究考虑到目前国内术前 US-FNAB 在诊断甲状腺结节良恶性方面技术相差较大,尤其在诊断可疑恶性方面,故将阳性的标准定义为细胞学诊断恶性。术前 US-FNAB 联合上述分子标志物以后诊断 PTC 的敏感性提高了 18.75 %,因此 US-FNAB 联合分子标志物检测必定有助于术前诊断。本研究中,术前 US-FNAB 诊断为恶性的 75 个结节中,上述分子标志物检出率 70.67 % (53/75, 有 3 个结节 *BRAF^{T1799A}* 合并 *RET/PTC1* 重排), 术后病理证实 71 个为 PTC。在术前 US-FNAB 诊断为可疑恶性的 22 个结节中,术后病理证实有 20 个 PTC,而其分子标志物仅诊断出 13 个 PTC。因此单纯上述分子标志物的检测不能取代术前 US-FNAB^[24]。我们推断随着超声诊断医师、病理科医师细胞学诊断技术的提高,术前联合分子标志物的检测对于如何选择最佳治疗方案、最大限度的提高患者生活质量意义更大。目前,分子标志物对于临床诊治方案的指导还未得到充分的认识,为此,我们将最大限度的追踪随访上述患者的诊治及预后情况。

我们前期研究发现,血小板源性生长因子(PDGF-B)与肿瘤的生长和浸润密切相关,而 *BRAF^{T1799A}* 基因突变与 PDGF-B 表达强度之间具有强相关性^[13]。有文献也报道了 *BRAF^{T1799A}* 点突变诱导的一个基因簇上调金属蛋白酶(metalloproteinases, MMP),包括 MMP3、MMP9 及 MMP13,其特征是使细胞在基膜上的生长更具迁移性,向基膜侵袭增加^[25]。本研究中 *BRAF^{T1799A}* 点突变与患者性别、肿瘤大小、淋巴结转移无明显相关性,而与甲状腺被膜外侵犯相关。可能与本研究观察时间及样本有限,无法对 PTC 患者术后复发及淋巴结转移情况等预后做出正确判断,尚需要进一步扩充样本例数,完善术后随访。

综上所述,本研究结果初步表明,对术前 US-FNAB 细胞标本进行分子标志物的检测方法可靠,联合 *BRAF^{T1799A}* 突变、*RET/PTC1* 及 *RET/PTC3* 检测可显著提高术前诊断 PTC 的准确性,并有助于进一步选择最优诊治方案。

参考文献(References)

- [1] Aschebrook-Kilfoy B, Ward MH, Sabra MM, et al. Thyroid cancer incidence patterns in the United States by histologic type, 1992-2006 [J]. *Thyroid*, 2011, 21(2): 125-134
- [2] 岳晓燕, 王斐, 于凤泉, 等. 山东省沿海与内陆甲状腺癌患病模式变迁[J]. *现代肿瘤医学*, 2010, 18(4): 670-674
Yue Xiao-yan, Wang Fei, Yu Feng-quan, et al. The variant trend of thyroid cancer in coastal city and inland city of Shandong Province China[J]. *Journal of Modern Oncology*, 2010, 18(4): 670-674
- [3] Pellegriti G, Frasca F, Regalbutto C, et al. Worldwide increasing thyroid carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2013, 6(1): 191-196
- [4] 吴琍, 王萍, 赵世华, 等. 青岛地区 14 年甲状腺癌患者的临床特点[J]. *山东医药*, 2008, 48(28): 78-79
Wu Li, Wang Ping, Zhao Shi-hua, et al. Clinical characteristics of thyroid cancer in Qingdao area [J]. *Shandong Medical Journal*, 2008, 48(28): 78-79
- [5] Nikiforov YE, Ohori NP, Hodak SP, et al. Impact of mutational testing on the diagnosis and management of patients with cytologically indeterminate thyroid nodules: a prospective analysis of 1056 FNA samples[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, 96(11): 3390-3397
- [6] Filicori F, Keutgen XM, Buitrago D, et al. Risk stratification of indeterminate thyroid fine-needle aspiration biopsy specimens based on mutation analysis[J]. *Surgery*, 2011, 150(6): 1085-1091
- [7] Mazeh H, Mizrahi I, Halle D, et al. Development of a microRNA-based molecular assay for the detection of papillary thyroid carcinoma in aspiration biopsy samples[J]. *Thyroid*, 2011, 21(2): 111-118
- [8] Rodrigues HG, DE Pontes AA, Adan LF. Contribution of the *BRAF* oncogene in the pre-operative phase of thyroid carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2013, 6(1): 191-196
- [9] Moses W, Weng J, Sansano I, et al. Molecular testing for somatic mutations improves the accuracy of thyroid fine-needle aspiration biopsy[J]. *World J Surg*, 2010, 34(11): 2589-2594
- [10] Ohori NP, Singhal R, Nikiforova MN, et al. *BRAF* mutation detection in indeterminate thyroid cytology specimens: underlying cytologic, molecular, and pathologic characteristics of papillary thyroid carcinoma[J]. *Cancer Cytopathol*, 2013, 121(4): 197-205
- [11] Pupilli C, Pinzani P, Salvianti F, et al. Circulating *BRAFV600E* in the diagnosis and follow-up of differentiated papillary thyroid carcinoma[J]. *Clin Endocrinol Metab*, 2013, 98(8): 3359-3365
- [12] Maria CZ, Giorgio T, Stefania L. *BRAF V600E* mutation analysis increases diagnostic accuracy for papillary thyroid carcinoma in ne-needle aspiration biopsies[J]. *European Journal of Endocrinology*, 2009, 161(3): 467-473
- [13] 王萍, 王颜刚, 赵文娟, 等. 甲状腺乳头状癌 *BRAF* 基因突变及 *RET/PTC* 基因重排与血小板源性生长因子 B 表达的相关性研究[J]. *中华内科杂志*, 2012, 51(12): 987-991
Wang Ping, Wang Yan-gang, Zhao Wen-juan, et al. The correlation between *BRAF* mutations, *RET/PTC* rearrangements and platelet-derived growth factor B expression in papillary thyroid carcinomas [J]. *Chinese Journal of Internal Medicine*, 2012, 51(12): 987-991
- [14] Xing M. *BRAF* mutation in thyroid cancer [J]. *Endocr Relat cancer*, 2005, 12(2): 245-262
- [15] Frasca F, Nucera C, Pellegriti G, et al. *BRAF (V600E)* mutation and the biology of papillary thyroid cancer[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2008, 15(1): 191-205
- [16] Dilenzo MM, Miller JL, Tuluc M, et al. False-Positive FNA Due to Highly Sensitive *BRAF* Assay[J]. *Endocr Pract*, 2014, 20(1): e8-e10
- [17] Tronko M, Bogdanova T, Voskoboynik L, et al. Radiation induced thyroid cancer: fundamental and applied aspects[J]. *Exp Oncol*, 2010, 32(3): 200-204

- [10] Palatini P, Julius S. Elevated heart rate: a major risk factor for cardiovascular disease[J]. Clin Exp Hyperten, 2004, 26(7-8): 637-644
- [11] Gooney MT, Vartiainen E, Laatikainen T, et al. Elevated resting heart rate is an independent risk factor for cardiovascular disease in healthy men and women[J]. Am Heart J, 2010, 159(4): 612-613.e3
- [12] Lonn EM, Rambihar S, Gao P, et al. Heart rate is associated with increased risk of major cardiovascular events, cardiovascular and all-cause death in patients with stable chronic cardiovascular disease: an analysis of Ontaret/Transcend [J]. Clin Res Cardiol, 2014, 103(2): 149-159
- [13] Fox K, Bousser MG, Amarenco P, et al. Heart rate is a prognostic risk factor for myocardial infarction: a post hoc analysis in the PERFORM (Prevention of cerebrovascular and cardiovascular Events of ischemic origin with terutroban in patients with a history of ischemic stroke of transient ischemic attack) study population [J]. Int J Cardiol, 2013, 168(4): 3500-3505
- [14] Custodis F, Schirmer SH, Baumhakel M, et al Vascular pathophysiology in response to increased heart rate [J]. J Am Coll Cardiol, 2010, 56(24): 1973-1983
- [15] Reil JC, Custodis F, Swedberg K, et al. Heart rate reduction in cardiovascular disease and therapy[J]. Clin Res Cardiol, 2011, 100(1): 11-19
- [16] Zuanetti G, Mantini L, Hernandez-Bernal, et al. Relevance of heart rate as a prognostic factor in patients with acute myocardial infarction: insights from the GISSI-2 study [J]. Eur Heart J, 1999, 19 (Suppl F): F19-26
- [17] Palatini P, Casiglia E, Julius S, et al. High heart rate: a risk factor for cardiovascular death in elderly men [J]. Arch Intern Med, 1999, 159 (6): 585-592
- [18] Tantry US, Bliden KP, Suarez TA, et al. Hypercoagulability, platelet function, in inflammation and coronary artery disease acuity: results of the Thrombotic Risk Progression (TRIP) study[J]. Platelets, 2010, 21 (5): 360-367
- [19] Wu H, Qian J, Wang Q, et al. Thrombin induced platelet-fibrin clot strength measured by thrombelastography is a novel marker of platelet activation in acute myocardial infarction [J]. Int J Cardiol, 2014, 172(1): e24-25
- [20] 杨敏, 唐熠达, 陈珏. 冠脉介入术后亚急性支架内血栓形成1例报告兼谈血栓弹力图的应用 [J]. 中国实用内科杂志, 2010, 30(11): 1041-1042
- Yang Min, Tang Yi-da, Chen Jue. A case report about sub-acute stent thrombosis after percutaneous coronary intervention with discussing about the application of thromboelastography [J]. Chinese Journal of Practical Internal Medicine, 2010, 30(11): 1041-1042

(上接第 3033 页)

- [18] Marotta V, Guerra A, Sapio MR, et al. RET/PTC rearrangement in benign and malignant thyroid diseases: a clinical standpoint [J]. Eur J Endocrinol, 2011, 165(4): 499-507
- [19] Sapio MR, Guerra A, Marotta V, et al. High growth rate of benign thyroid nodules bearing RET/PTC rearrangements [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2011, 96(6): E916-919
- [20] Eszlinger M, Krogdahl A, Mü nz S, et al. Impact of Molecular Screening for Point Mutations and Rearrangements in Routine Air-Dried Fine-Needle Aspiration Samples of Thyroid Nodules[J]. Thyroid, 2014, 24(2): 305-313
- [21] Musholt TJ, Fottner C, Weber MM, et al. Detection of papillary thyroid carcinoma by analysis of BRAF and RET/PTC1 mutations in fine-needle aspiration biopsies of thyroid nodules [J]. World J Surg, 2010, 34(11): 2595-2603
- [22] Martina R, Mattia B, Stefania B, et al. Role of Ultrasonographic/Clinical Profile, Cytology, and BRAF V600E Mutation Evaluation in Thyroid Nodule Screening for Malignancy: A Prospective Study[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2012, 97(7): 2354-2361
- [23] Marisa CG, Patricia BM, López de la Torre-Casares M, et al. Reduction of False-Negative Papillary Thyroid Carcinomas by the Routine Analysis of BRAF^{V600E} Mutation on Fine-Needle Aspiration Biopsy Specimens: A Prospective Study of 814 Thyroid FNAB Patients[J]. Ann Surg, 2012, 255(5): 986-992
- [24] Filicori F, Keutgen XM, Buitrago D, et al. Risk stratification of indeterminate thyroid fine-needle aspiration biopsy specimens based on mutation analysis[J]. Surgery, 2011, 150(6): 1085-1091
- [25] Mesa CJ, Mirza M, Mitsutake N, et al. Conditional activation of RET/PTC3 and BRAFV600E in thyroid cells is associated with gene expression profiles that predict a preferential role of BRAF in extracellular matrix remodeling[J]. Cancer Res, 2006, 66(13): 6521-6529