

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.18.045

甲状腺癌诊断及预后相关分子标志物的研究进展*

梅志丹 陈 晨 胡章威 郑安元 陶泽璋[△]

(武汉大学人民医院耳鼻喉头颈外科 湖北 武汉 430060)

摘要: 甲状腺结节是最常见的疾病之一,其精确诊断对于患者的有效临床管理十分重要。分子标志物是一项非常有效的诊断和预后评估工具,尤其在细胞学不确定的甲状腺癌结节。近年来,分子标志物的临床应用发展已经取得显著的进步。随着新一代基因检测技术的发展,能够同时检测多个基因,这不仅可以为甲状腺癌的诊断提供依据,而且也可为预测甲状腺癌患者的预后提供参考,本文就甲状腺癌的诊断及预后相关的分子标志物进行综述。

关键词: 甲状腺癌;分子标志物;肿瘤;靶向治疗

中图分类号: R736.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2017)18-3592-04

Progress in Molecular Markers of Thyroid Cancer Diagnosis, Prognosis*

MEI Zhi-dan, CHEN Chen, HU Zhang-wei, ZHENG An-yuan, TAO Ze-zhang[△]

(Department of Otolaryngology, Head & Neck Surgery, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei, 430060, China)

ABSTRACT: Thyroid nodules are common, and the accurate diagnosis of Thyroid nodules is important for the effective clinical management of patients. Molecular markers are a helpful diagnostic and prognosis evaluation tool, particularly for cytologically indeterminate thyroid nodules. In recent years, significant progress has been made in developing molecular markers for clinical use. With the development of next generation sequencing technology, multiple genes can be detected, which not only can provide the basis for diagnosis of thyroid cancer, but also providing reference for predicting the prognosis of patients with thyroid cancer. In this review, we summarize the Progress in Molecular Markers of Thyroid Cancer Diagnosis, Prognosis.

Key words: Thyroid Cancer; Molecular Markers; Tumor; Targeted therapy

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

Article ID: 1673-6273(2017)18-3592-04

前言

甲状腺癌是近年来几种发病率逐年增加的肿瘤之一,其最常用的诊断方式为超声和超声引导下的甲状腺结节的细针穿刺。虽然甲状腺癌的发生率增加部分原因归功于超声和其他影像学技术对小或者亚临床的甲状腺结节诊断的提高,但是各种大小甲状腺癌发病率的增加同样被报道,而甲状腺乳头状癌增加的病例数主要是滤泡型和RAS突变阳性肿瘤,这也提示了环境(化学/饮食)因素的潜在作用^[1,2]。尽管甲状腺癌的发病率增加,但是甲状腺癌患者的总体死亡率仍然低于5%。除了环境因素外,遗传因素也与甲状腺癌的易感性有关,如我们已知的甲状腺髓样癌具有明显的家族倾向性,一级亲属中患有甲状腺非髓样癌的,其患病风险较正常人群增加了四倍到十倍^[3]。家族性甲状腺非髓样癌表现为常染色体的显性遗传伴不完全外显,约占所有类型甲状腺癌的5%-10%^[4]。基因连锁研究在多个区域发现易感位点,包括:1q21,2q21,8q24,9q22,14q31及19q13等,在这些基因的候选区域,明确的生殖系基因突变所具有潜

在的甲状腺癌变倾向尚有待进一步证实。甲状腺癌的发展可能与基因易感性和环境风险因素之间复杂的相互作用有关。

甲状腺癌通常表现为甲状腺结节,然而在60岁以上的人群中,通常甲状腺结节的发生率超过50%^[5]。大多数甲状腺癌为高分化的乳头状癌或滤泡状癌,其死亡率较低,特别是I期或II期的患者,其生存率高达98%以上,但是一些高分期,发生远处转移及低分化或未分化的甲状腺癌患者通常死亡率较高^[6]。因此,准确识别具有高度侵袭性和高死亡率的亚型的甲状腺癌能够帮助指导患者的治疗和管理,同时能够预防对低风险因素的疾病产生过度治疗。

1 分子标志的必要性

在手术切除的不确定性甲状腺结节中,约有10%-40%被证实为恶性肿瘤^[7]。结果使大部分的诊断性手术切除的为良性甲状腺结节,而另一方面,那些接受了外科腺叶切除的患者随后发现肿瘤组织大于1cm,通常需要进行二次手术切除剩下的甲状腺腺叶,因此,需要额外的诊断标志物来管理未确定性

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81372880);高等学校博士学科点专项科研基金项目(20130141120093);

湖北省自然科学基金项目(2012FFA045)

作者简介:梅志丹,男,博士研究生,主要研究方向:鼻科学、头颈肿瘤基础研究,E-mail: zhenganyuan2015@126.com

[△] 通讯作者:陶泽璋(1954-),男,博士生导师,教授,主要研究方向:鼻科学、头颈肿瘤基础研究,

E-mail: taozezhang@163.com,电话:88041911

(收稿日期:2016-11-11 接受日期:2016-12-15)

甲状腺结节的患者,从而减少不必要诊断性腺叶切除手术和二次手术。

对于分子标志物在不确定性甲状腺结节中作用主要通过每个实验的灵敏性,特异性,阴性预测值(negative predictive value, NPV)及阳性预测值(positive predictive value, PPV)来评价。而在高敏感度及阴性预测值的分子实验中,阴性结果往往提示不确定性甲状腺结节更倾向于良性结节并且可能只需要积极的监视,而拥有较高特异性和阳性预测值的阳性结果患者,则更多提示诊断为甲状腺癌,预示着需要进行手术治疗。

更好的理解甲状腺癌变过程中的分子机制,除了能够提高我们的分子诊断技术,同时也能够促进在甲状腺癌的诊断,预后评估及治疗选择上的进步。并且能够从理论上指导术前风险的程度,优化首次手术的步骤及平衡肿瘤的担忧与生活质量之间的顾虑。另外,改善的术前风险评估能够为低风险的患者在非手术治疗提供适当的参考依据^[9]。

分子标志主要分为通过免疫细胞化学或免疫组织化学的方法检测的蛋白基础标志物,miRNA 表达分析,多基因表达面板,基因突变和重组面板及疾病的外周循环标志物检测如:TSH 受体 mRNA^[9],本文就甲状腺癌分子标志物的检测及临床实用价值进行综述。

2 甲状腺癌相关的分子标志物

在甲状腺癌细胞内,BRAF 和 RAS 基因的点突变,RET/PTC 和 PAX8/PPAR γ 的基因重组是最常见的基因改变,并且这些指标已被用于细针穿刺细胞学诊断不明确的甲状腺癌的检测。二十世纪九十年代以来,从只有 25%的甲状腺癌的发病机制被发现到现在认为超过 90%的甲状腺癌的发病机理与基因有关,在阐明甲状腺癌潜在的分子机制方面取得了巨大进步。这一进步为甲状腺癌的新的诊断标志物,预后标志物及靶向治疗提供了基础,并且一直在发展中。

2.1 诊断相关分子标志物

大多数的甲状腺癌的发病机制涉及到 MAPK 和 PI3K/AKT 信号通路的异常调节。在甲状腺癌细胞内,经常通过 BRAF 和 RAS 基因位点的突变,RET/PTC 和 TRK 的基因重组来激活 MAPK 信号通路^[10]。BRAF 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,能够被 RAS 所激活,并通过激活 MEK 和 MAPK 下游的效应器。BRAF 的点突变几乎存在约 45%的乳头状甲状腺癌内,在几乎所有的病例(98%-99%的患者)BRAF 激活性的点突变都涉及到密码子 600,并导致 V600E 的突变,而另外 1%-2%BRAF 突变病例则为 K601E 突变,框内的插入或缺失以及 BRAF 基因的重组,这些突变与电离辐射造成的甲状腺癌相关^[11]。

RAS 基因(HRAS, KRAS 及 NRAS)都属于 G 蛋白,其信号主要传导到 MAPK 及 PI3K/AKT 信号通路。RAS 基因的点突变主要发生在 12、13、61 位点,约 40%-50%的滤泡型甲状腺癌及 10%-20%的甲状腺乳头状癌存在 RAS 基因的以上改变,伴 RAS 基因突变的甲状腺乳头状癌一般为滤泡型乳头状癌^[10]。而 NRAS、HRAS、KRAS 基因突变主要发生于滤泡细胞来源的甲状腺癌,同时 HRAS 和 KRAS 基因的突变也会发生于甲状腺髓样癌^[12]。

RET 基因是一种受体酪氨酸激酶,主要在甲状腺 C 细胞

中表达,但是不表达于滤泡细胞,通过结合各种分子驱使 RET 基因 3' 端表达编码受体的酪氨酸激酶结构域,从而激活 RET 基因,并且提供一种二聚化作用,从而使 RET 激酶被持续激活。RET/PTC1 和 RET/PTC3 基因重组是最常见的重组,其中大约 10%-20%的甲状腺乳头状癌存在以上两种基因重组,并且它们发生率在逐渐下降^[13],这些重组在儿童和年轻成年人及曾有辐射暴露的患者中有较高的发生频率,与 RET 有关的基因重组,主要发现在甲状腺乳头状癌,而不管是家族性还是散发性髓样型甲状腺癌,RET 基因突变比较常见^[14]。

在甲状腺癌中,除了以上三种比较常见的基因改变,同时还存在 PAX8/PPAR γ 的基因重组,PI3K/AKT 信号通路的异常激活以及 TP53 和 CTNNB1 基因的突变等相关的改变,以上已发现的多种与甲状腺癌相关的分子标志物虽然较多,但针对甲状腺癌完全特异性的分子标志物尚未发现。

2.2 预后相关分子标志物

侵袭性甲状腺癌的统一标志主要包括:肿瘤的去分化及 p53 (25-30%),PIK3CA (10-20%),CTNNB1 (10-20%)及 AKT1 (5-10%)基因的突变^[15]。然而端粒酶逆转录酶启动子的突变也与甲状腺癌的侵袭性分化有显著的相关性,端粒酶的激活是恶性肿瘤的一个标志,其可使细胞持续复制,而 TERT 启动子突变已经在其他恶性肿瘤(如:黑色素瘤、脑胶质瘤)中被证实。在甲状腺癌中,TERT 启动子在甲状腺乳头状癌中的突变发生率为 7%-22%,在滤泡型甲状腺癌的发生率约为 35%,并且经常发现与 BRAF 及 RAS 基因突变有关,而这一类甲状腺癌在组织学上往往为侵袭性分化的甲状腺癌^[16-18]。Melo 等报道 TERT 基因启动子突变与甲状腺乳头状癌和滤泡型甲状腺癌患者的疾病死亡风险增加有显著的相关性,且 TERT 基因启动子突变也已经在未分化和分化较差的甲状腺癌中被证实^[19]。

BRAF V600E 的突变也已经被研究可能成为甲状腺乳头状癌患者预后的分子标志物。在 Xing 的一篇综述中,BRAF 基因的体变与侵袭性肿瘤特性相关,如甲状腺癌肿瘤的浸润,诊断时即为晚期甲状腺癌及淋巴结和远处的转移^[20]。BRAF V600E 已经被证实是肿瘤复发的独立预测指标,且与可能与年龄具有相关性^[21]。在一项队列研究中,持久或复发的疾病可能出现在 BRAF V600E 阳性的肿瘤或年龄大于 65 岁以上的甲状腺乳头状癌^[22]。Elisei 随访 102 位甲状腺乳头状癌患者平均十五年,发现 BRAF V600E 基因突变是肿瘤相关死亡的一个独立危险因素。因此 BRAF V600E 基因检测是最有必要的术前准备之一,并且能够用于帮助决定首次手术的切除范围。考虑到其与淋巴结转移的联系,因此高分辨的超声淋巴结显像技术应该在术前被使用。

在没有临床或超声下淋巴结转移的患者,当前的主要矛盾在于是否要进行预防性的中央区淋巴结清扫。一项单一机构的研究发现,预防的中央区淋巴结清扫能够减少甲状腺球蛋白的水平,并可能较少肿瘤的几部复发,但是没有研究证明其能够减少肿瘤相关的死亡率^[23]。甲状腺乳头状癌 BRAF V600E 突变患者存在中央区淋巴结转移的高风险,并且在一项多元性分析中,BRAF 仍旧是一项甲状腺结节疾病术前的预测指标^[24]。因此术前的 BRAF V600E 检测可能区别那些患者将能够从预防性

中央区淋巴结清扫中获益。大多数的微小甲状腺乳头状癌是无痛性肿瘤,主要是在切除大的良性肿瘤时被发现,也广泛的通过手术治疗。然而,微小甲状腺乳头状癌的一个亚型能够表现出侵略性并导致局部复发和致死性。通过微小甲状腺乳头状癌队列研究得到的病理学分子评分,并进一步在一个独立的微小甲状腺乳头状癌的子集中进行验证,发现 BRAF V600E 伴随的组织病理学特点包括:纤维化、位置表浅及腺内肿瘤的广泛浸润或多灶性,并能够预测微小甲状腺乳头状癌侵略性的高风险因素^[25]。

2.3 新型分子标志物

除了发现在大约 15% 的甲状腺肿瘤存在 RET/PTC 及 PAX8/PPAR γ 基因重组外,许多其他基因被发现存在基因融合,比如:NTRK 或 BRAF 基因的重组。BRAF 与 AKAP9 融合是一种重组,虽然很少出现在散发性甲状腺癌,但是在放射暴露的患者中有较高的发生频率^[26,27]。NTRK1 是一种受体酪氨酸激酶,当其与三个潜在的融合伴侣中的一个发生重组时,可激活 MAPK 信号通路。约 1-5% 的甲状腺乳头状癌发生了 NTRK1 基因重组,并存在较高的辐射暴露频率^[28,29]。

在一项甲状腺癌的全转录组分析中,ETV6-NTRK3 染色体重组与甲状腺癌的辐射暴露有关,发现于大约 2% 的散发性甲状腺乳头状癌和 14.5% 的辐射暴露相关肿瘤^[30]。在侵袭型甲状腺癌中,另一个有趣的基因融合对治疗的影响通过 RNA-seq 分析被证明,STRN 基因和 ALK 基因的融合发生约在 9% 的低分化甲状腺癌,4% 的未分化甲状腺癌及 1.2% 的高分化甲状腺乳头状癌^[31-33]。然而在过去,由于高额的花费和需要大量的 DNA 和 RNA,罕见的融合和其他突变的测试很难通过使用临床细针穿刺样本进行个人基因实验,现如今新一代的靶向测序技术为细针穿刺样本多位点突变和基因重组提供了一个方便、经济的检测。

另外,TERT 基因的启动子未发现在良性的甲状腺结节发生突变,因此,这说明 TERT 突变的存在不仅在甲状腺癌疾病预后评估中起着重要的作用,同时对于恶性结节的诊断也是十分必要的。

3 小结与展望

近几年来,对甲状腺癌的遗传学机制了解及分子检测的发展,使甲状腺肿瘤的诊断取得巨大进步。新一代测序技术能够有效利用细针穿刺活检取得的有限标本检测其遗传学改变,相较于当前可用的临床检测,新一代测序技术显著提高了甲状腺结节的肿瘤检测的精确性。这一基于分子检测的技术将可以在未来精确的诊断细针穿刺细胞学不确定的甲状腺癌,并且将会降低分子检测的花费,使分子标志物诊断能够得到更加广泛应用。

此外,分子标志物被认为在肿瘤的诊断和预后评估上有着重要的意义。虽然 BRAF V600E 基因突变对乳头状癌的预后评估相对敏感,但是缺乏一定的特异性,且其不能够被单独使用作为肿瘤预后评估指标。近来,在一小部分分化良好的乳头状癌和滤泡状癌中,广谱的肿瘤基因型分析发现了多种特异性的分子标志物(比如:多个启动子突变,TP53 突变或 TERT 启动

子突变等),并与肿瘤的侵袭性有显著的相关性。同时这些分子标志物被证实有可能为分化良好的甲状腺癌的肿瘤的复发和致死风险提供更具特异性的检测。因此,未来的研究方向将为通过分子标志物来确定最佳手术方案和术后管理。伴随这些进步,在不久的将来,甲状腺结节的个性化肿瘤基因组检测将变得更加可行,并真正为甲状腺结节和癌症患者提供个性化的诊断和治疗。

参考文献(References)

- [1] Jung CK, Little MP, Lubin JH, et al. The increase in thyroid cancer incidence during the last four decades is accompanied by a high frequency of BRAF mutations and a sharp increase in RAS mutations [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2014, 99(2): E276-85
- [2] Kitahara CM, Sosa JA. The changing incidence of thyroid cancer[J]. Nat Rev Endocrinol, 2016, 110[Epub ahead of print]
- [3] Hemminki K, Eng C, Chen B, et al. Familial risks for nonmedullary thyroid cancer[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90(10): 5747-5753
- [4] Mazeh H, Sippel RS. Familial nonmedullary thyroid carcinoma [J]. Thyroid, 2013, 23(9): 1049-1056
- [5] Guth S, Theune U, Aberle J, et al. Very high prevalence of thyroid nodules detected by high frequency (13?MHz) ultrasound examination [J]. European Journal of Clinical Investigation, 2009, 39 (8): 699-706
- [6] Tanaka K, Sonoo H, Saito W, et al. Analysis of clinical outcome of patients with poorly differentiated thyroid carcinoma [J]. Isrn Endocrinology, 2011, 2011: 308029-308029
- [7] Baloch Z W, Livolsi V A, Asa S L, et al. Diagnostic terminology and morphologic criteria for cytologic diagnosis of thyroid lesions: A synopsis of the National Cancer Institute Thyroid Fine Needle Aspiration State of the Science Conference [J]. Diagnostic Cytopathology, 2008, 36(6): 425-437
- [8] Ito Y, Miyauchi A, Inoue H, et al. An observational trial for papillary thyroid microcarcinoma in Japanese patients. [J]. World Journal of Surgery, 2010, 34(1): 28-35
- [9] Milas M, Shin J, Gupta M, et al. Circulating thyrotropin receptor mRNA as a novel marker of thyroid cancer: clinical applications learned from 1758 samples [J]. Annals of Surgery, 2010, 252 (4): 643-651
- [10] Adeniran AJ, Zhu Z, Gandhi M, et al. Correlation Between Genetic Alterations and Microscopic Features, Clinical Manifestations, and Prognostic Characteristics of Thyroid Papillary Carcinomas [J]. American Journal of Surgical Pathology, 2006, 30(2): 216-222
- [11] Chiosea S, Nikiforova M, Zuo H, et al. A novel complex BRAF mutation detected in a solid variant of papillary thyroid carcinoma[J]. Endocrine Pathology, 2009, 20(2): 122-126
- [12] Agrawal N, Jiao Y, Sausen M, et al. Exomic Sequencing of Medullary Thyroid Cancer Reveals Dominant and Mutually Exclusive Oncogenic Mutations in RET and RAS [J]. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2012, 98(2): 364-369
- [13] Jung C K, Little M P, Lubin J H, et al. The increase in thyroid cancer incidence during the last four decades is accompanied by a high frequency of BRAF mutations and a sharp increase in RAS mutations. [J]. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2014, 99 (2):

276-285

- [14] Kloos R T, Eng C, Evans D B, et al. Medullary thyroid cancer: management guidelines of the American Thyroid Association [J]. Thyroid Official Journal of the American Thyroid Association, 2009, 19(6): 565-612
- [15] Nikiforov Y E, Nikiforova M N. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer [J]. Nature Reviews Endocrinology, 2011, 7 (10): 569-580
- [16] Liu X, Bishop J, Shan Y, et al. Highly prevalent TERT promoter mutations in aggressive thyroid cancers[J]. Endocrine Related Cancer, 2013, 20(4): 603-610
- [17] Landa I, Ganly I, Chan T A, et al. Frequent somatic TERT promoter mutations in thyroid cancer: higher prevalence in advanced forms of the disease [J]. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2013, 98(9): 1562-1566
- [18] Kim T H, Kim Y E, Ahn S, et al. TERT promoter mutations and long-term survival in patients with thyroid cancer [J]. 2016 [Epub ahead of print]
- [19] Melo M, Da R A, Vinagre J, et al. TERT Promoter Mutations Are a Major Indicator of Poor Outcome in Differentiated Thyroid Carcinomas [J]. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2014, 99(5): 754-765
- [20] Xing M. BRAF Mutation in Papillary Thyroid Cancer: Pathogenic Role, Molecular Bases, and Clinical Implications [J]. Endocrine Reviews, 2007, 28(7): 742-762
- [21] Tufano R P, Teixeira G V, Bishop J, et al. BRAF mutation in papillary thyroid cancer and its value in tailoring initial treatment: a systematic review and meta-analysis [J]. Medicine, 2012, 91 (5): 274-286
- [22] Howell G M, Carty S E, Armstrong M J, et al. Both BRAF V600E mutation and older age (≥ 65 years) are associated with recurrent papillary thyroid cancer [J]. Annals of Surgical Oncology, 2011, 18 (13): 3566-3571
- [23] Wang T S, Cheung K, Farrokhyar F, et al. A meta-analysis of the effect of prophylactic central compartment neck dissection on locoregional recurrence rates in patients with papillary thyroid cancer [J]. Annals of Surgical Oncology, 2013, 20(11): 3477-3483
- [24] Zeiger M A, Schneider E B. BRAF V600E Mutation Independently Predicts Central Compartment Lymph Node Metastasis in Patients with Papillary Thyroid Cancer[J]. Annals of Surgical Oncology, 2013, 20(1): 47-52
- [25] Leo A. Niemeier MD $\uparrow$ § , Haruko Kuffner Akatsu MD $\ddagger$ § , Chi Song MS, et al. A combined molecular-pathologic score improves risk stratification of thyroid papillary microcarcinoma [J]. Cancer, 2012, 118(8): 2069-2077
- [26] Ciampi R, Nikiforov Y E. Alterations of the BRAF gene in thyroid tumors[J]. Endocrine Pathology, 2005, 16(3): 163-172
- [27] Khan M S, Pandith A A, Azad N, et al. Impact of molecular alterations of BRAF in the pathogenesis of thyroid cancer [J]. Mutagenesis, 2014, 29(2): 131-137
- [28] Rebecca J. Leeman-Neill MD PhD, Alina V. Brenner MD PhD MPH, Mark P. Little MA DPhil, et al. RET/PTC, and PAX8/PPAR γ chromosomal rearrangements in post-Chernobyl thyroid cancer and their association with iodine-131 radiation dose and other characteristics ?[J]. Cancer, 2013, 119(10): 1792-1799
- [29] Armstrong M J, Yang H, Yip L, et al. PAX8/PPAR rearrangement in thyroid nodules predicts follicular-pattern carcinomas, in particular the encapsulated follicular variant of papillary carcinoma [J]. Thyroid Official Journal of the American Thyroid Association, 2014, 24 (9): 1369-1374
- [30] Leeman-Neill RJ1, Kelly LM, Liu P, et al. ETV6-NTRK3 is a common chromosomal rearrangement in radiation-associated thyroid cancer[J]. Cancer, 2014, 120(6): 799-807
- [31] Kelly L M, Barila G, Liu P, et al. Identification of the transforming STRN-ALK fusion as a potential therapeutic target in the aggressive forms of thyroid cancer [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(11): 4233-4238
- [32] Chou A, Fraser S, Toon C W, et al. A detailed clinicopathologic study of ALK-translocated papillary thyroid carcinoma [J]. American Journal of Surgical Pathology, 2015, 39(5): 652-659
- [33] Demeure M J, Aziz M, Rosenberg R, et al. Whole-genome sequencing of an aggressive BRAF wild-type papillary thyroid cancer identified EML4-ALK translocation as a therapeutic target [J]. World Journal of Surgery, 2014, 38(6): 1296-1305