

甲状腺乳头状癌 BRAF 突变与 RET/PTC 重排的临床意义

俞灵莺 马丽珍

甲状腺癌是内分泌系统最常见的恶性肿瘤,也是近 30 年来发生率增长最快的实体肿瘤,每年增加 6.2%。滤泡细胞来源的甲状腺癌分为甲状腺乳头状癌(papillary thyroid cancer, PTC)、甲状腺滤泡癌(follicular thyroid cancer, FTC)和未分化癌(anaplastic thyroid cancer, ATC)。PTC 是最常见的病理类型,也是构成近 30 年发生率迅速上升的主要病理类型^[1]。

虽然 PTC 患者 10 年生存率较高,但仍有 5% ~ 20% 复发,10% 发生转移,部分患者诊断时已属晚期。TNM 分期系统可以预测死亡风险,但对评估复发风险不足。除了肿瘤程度和年龄,复发风险还包括幼龄(<16 岁)、组织学变异(高细胞、柱状细胞、弥漫硬化或低分化甲状腺癌)、血管侵袭、手术不能完整切除、¹³¹I 治疗后首次扫描甲状腺床外的摄碘灶等。对个体患者而言,这些危险因素预测复发风险仍不精确,而且必须在初始治疗(手术加碘消融)后才能评估。理想的预后指标应该有助于每个复发风险增加的患者,并且在诊断时就能有效干预治疗策略,指导手术方案、辅助性放射碘消融的强度以及随访的频率等。从早期单个或小组潜在预后指标到晚近大规模组织标本的基因微阵列芯片,分子标志物颇具前景。

对于不能手术或者不摄碘的侵袭性或转移癌,目前仍缺乏有效的治疗手段。由于 RET/RAS/RAF/MAPK 信号通路激活在 PTC 发病中发挥重要作用并且发生率高,而许多激酶都有特异性的靶向抑制剂,靶向治疗将是这部分 PTC 非常好的选择。对这些潜在靶点的靶向治疗研究具有重要的临床意义。B 型 Raf 激酶(B-type Raf kinase, BRAF)突变与 RET/PTC 重排是 PTC 中最多见的早期事件。本文综述两

者在 PTC 诊断、预后及治疗的意义。

一、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK) 途径

MAPK 途径是细胞内信号转导途径,对细胞表面受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTK)起反应。当 RTK 与配体结合,激活的 RTK 经过交换因子激活 RAS 激酶,然后依次激活 Raf 激酶、MAP/细胞外信号调节激酶(MAP/extracellular signal-regulated kinase, MEK 1/2)和 extracellular signal regulated kinases(ERK 1/2),活性 ERK 易位,进入细胞核内诱导转录因子磷酸化,基因表达。70% 以上 PTC 发现 MAPK 途径相关基因改变,且很少同时发生,提示同一信号通路中一种突变引起的持续活化足以致癌。造成该信号通路持续激活的机制主要包括 RET/PTC 重排、RAS 突变及 BRAF 突变等^[2]。BRAF^{V600E}与 RET/PTC3 重排双重基因改变主要见于复发 PTC^[3]。

1. RET/PTC 重排:RET 原癌基因编码一种酪氨酸激酶受体,在滤泡旁 C 细胞高度表达而在甲状腺滤泡细胞表达低下。RET 基因通过染色体重排,将启动子和 N 端无关基因区与 RET 基因酪氨酸区相连形成嵌合体,不同嵌合形式受体称为 RET/PTC。RET/PTC 不依赖配体持续激活滤泡细胞,阳性率约 5% ~ 70%^[4]。已报道 RET/PTC 超过 11 种,其中 RET/PTC1 和 RET/PTC3 最多见。过表达 RET/PTC1 或 RET/PTC3 的甲状腺细胞和转基因小鼠可诱导甲状腺细胞转化,用 siRNA 沉默 BRAF 可阻断 RET/PTC 的致癌效应,证明该信号通路沿着 BRAF-MAPK 途径致癌。

2. RAS 突变:RAS 激酶属于小 G 蛋白家族成员,位于细胞膜内侧,在 GTP 结合的活性形式与 GDP 结合的非活性形式之间切换,激活下游效应器。RAS 点突变,与 GTP 的亲合力(12 号和 13 号密码子)增加或 GTP 酶自催化功能(61 号密码子)降低,均可导致持续激活 MAPK 途径。RAS 突变在各种甲状腺滤泡细胞起源的肿瘤均有报道,甲状腺滤泡腺瘤和 FTC

基金项目:浙江省医药卫生科学研究基金资助项目(2010KYA161)

作者单位:310006 杭州市第一人民医院内分泌科

多见,而 PTC 中很少发生,且仅见于滤泡细胞变异的 PTC (follicular variant papillary thyroid carcinoma, FVPTC)^[5]。

3. BRAF 突变:Raf 属于丝/苏氨酸激酶家族,是首个也是最具代表性的 RAS 下游效应器。3 个亚型, A - Raf、B - raf 和 C - raf (又称 Raf - 1),其中 BRAF 突变最常见。目前已证实至少 45 种 BRAF 突变,90% 是 15 号外显子 1799 位核苷酸 T→A 转位 (T1799A),导致 600 位缬氨酸被谷氨酸替代,称 V600E,主要见于经典的 PTC,发生率约 60%。在高细胞变异的 PTC 及 PTC 来源的低分化癌、ATC 也有报道。但在 FVPTC 极少,在 FTC 未见报道。

二、BRAF 突变与 RET/PTC 重排的临床意义

1. BRAF 突变与 RET/PTC 重排的诊断意义:细针穿刺(fine needle aspiration, FNA)细胞学检查可于术前评估甲状腺结节,但存在一部分诊断不确定或细胞量不足,影响诊断准确率。近年研究表明,在甲状腺结节 FNA 标本中进行包括 RET/PTC、RAS 和 PAX/PPAR γ 突变等突变和小分子 RNA 检测具有可行性,由此提高细胞学诊断准确率,其中 BRAF 突变研究最深入,可使诊断准确率从 88% 提高到 91%^[6-8]。但是 BRAF^{V600E} 突变在 PTC 的阳性率总体约 50%,阴性不能排除恶性,且大部分诊断不确定的病例为 FTC、FVPTC,此组病理类型很少发生 BRAF 突变。因此 BRAF^{V600E} 突变检测虽然特异性高,敏感度却不高。RET/PTC 是 PTC 中发现的首个癌基因,也是首个被建议用作肿瘤诊断标志物。早期研究认为 RET/PTC 重排仅见于甲状腺癌,但近年发现,在增长较快的甲状腺滤泡腺瘤和桥本甲状腺炎也有发生^[9,10]。可导致术前诊断假阳性,需要重新审慎其前瞻性诊断价值。

此外 FNA 样本量不足也可引起部分 DNA、RNA 提取量不足。因此在 FNA 标本中常规检测 BRAF^{V600E} 突变与 RET/PTC 重排作为诊断手段价值有限。但如果用于诊断不确定或样本量不足的 FNA 标本可提高对这部分患者诊断准确率,对这部分患者检测是合理的。

2. BRAF 突变与 RET/PTC 重排的预后价值:相比 RET/PTC 重排,BRAF 突变的 PTC 更具侵袭性并与预后不良相关。分化良好的大鼠甲状腺细胞株 PCCL3 细胞分别给予条件表达 BRAF^{V600E}、RET/PTC3 重排及 PET/PTC3 重排伴 siRNA 沉默 BRAF,结果 PCCL3 细胞基因表达谱既有受 RET/PTC3 重排和

BRAF^{V600E} 共同调节的基因簇,还有两个癌基因各自特异的两个基因簇。BRAF^{V600E} 诱导的一个基因簇上调金属蛋白酶 (metalloproteinases, MMP),包括 MMP3、MMP9 和 MMP13,其特征是该组细胞在基膜上的生长更具迁移性,向基膜侵袭增加^[11]。临床研究,高细胞变异的 PTC 和 PTC 起源的 ATC 中 BRAF^{V600E} 突变发生率较高,提示 BRAF^{V600E} 在 PTC 向更具侵袭性的甲状腺癌进展中可能起作用。既无 BRAF^{V600E} 突变又无 RET/PTC 重排的患者 [PTC - ga (-)] 与含两者之一基因改变的患者 [PTC - ga (+)] 比较临床病理特点,结果 PTC - ga (+) 患者比 PTC - ga (-) 患者肿瘤分期更晚,PTC - ga (-) 患者主要为 FVPTC,分化与正常组织较接近,预后也比存在基因改变者好^[12]。Rivera 等^[13] 对 FVPTC 不同突变模式比较浸润性差异,结果 BRAF 突变均为浸润癌,而 RAS 突变主要为包膜内癌。与包膜内癌组相比,浸润癌组甲状腺外侵犯、碘扫描阳性残余灶和淋巴结转移更多见。上述结果提示基因改变通过 MAPK 途径在 PTC 发生和进展中均发挥作用,含 BRAF^{V600E}、RAS 突变和 RET/PTC 重排的 PTC 患者表现不同的基因表达谱,提示不同病变影响 MAPK 途径的结局是不一样的。

与 RET/PTC 重排不同,BRAF^{V600E} 可通过诱导基因不稳定性而促进二次遗传事件的发生,诱导肿瘤向更具侵袭性、更晚分期进展。PI₃K/AKT 途径的异常激活常与 BRAF^{V600E} 突变同时出现在 ATC 和放射碘抵抗的肿瘤,提示 PTC 中主要由 BRAF^{V600E} 突变诱导的基因不稳定性促进包括 PI₃K/AKT 途径在内的二次基因改变,同时说明癌症晚期损伤不完全依赖于 MEK/ERK 途径^[14]。许多 ATC 存在乳头状结构区域,起源于 BRAF 突变 PTC 基础上发生 p53 基因突变。甲状腺癌细胞 BRAF^{V600E} 突变瞬间过表达还增加 NF- κ B DNA 结合活性,上调抗凋亡蛋白 cIAP - 1、cIAP - 2,X 连锁凋亡抑制剂,表现抗凋亡作用。与野生型 PTC 相比,BRAF^{V600E} 突变阳性 PTC 的血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 显著上调,启动子甲基化诱导肿瘤抑制基因沉默,使肿瘤向更大、甲状腺外侵犯以及向更晚分期进展。

BRAF^{V600E} 诱导肿瘤向低分化发展。PCCL3 细胞瞬间表达 BRAF^{V600E} 突变使钠碘转移体 (sodium/iodide symporter, NIS) 迅速减少,向细胞膜移动也减少,提示去分化作用,BRAF^{V600E} 突变可预测 NIS 介导的摄碘受损。同时 BRAF^{V600E} 突变的 PTC 中甲状腺过氧

化物酶(thyroid peroxidase, TPO)基因表达显著下降,总 TPO mRNA 下调。TPO 是甲状腺激素合成、碘有机化的关键酶,TPO 基因下调反映 BRAF^{V600E}突变的肿瘤贮碘能力下降^[15]。顶端碘转运受体是滤泡细胞上碘跨膜被动运输的转运体,编码该受体的 SLC5A8 基因甲基化导致基因沉默与 BRAF^{V600E}突变也相关,导致碘转运受损^[16]。相反,PTC 中葡萄糖转运子(glucose transporter type 1, Glut - 1)表达增加,BRAF^{V600E}突变者表达增加更明显^[17]。上述基础研究提示 BRAF^{V600E}突变的甲状腺肿瘤碘代谢受损,摄碘和贮碘能力下降,对放射碘扫描不敏感,对放射碘治疗反应差;而 Glut - 1 上调,提示糖代谢增加,可用 18FDG PET - CT 扫描显示 BRAF^{V600E}突变甲状腺癌复发与转移病灶。

高分辨超声的引进以及超声引导的甲状腺 FNA 的普遍应用,甲状腺乳头状微小癌(papillary thyroid microcarcinoma, PTMC)诊断率显著上升^[18],PTMC 发病率大幅上升,近 20 年增加了 2 ~ 4 倍,几乎占甲状腺癌的 1/4。通常 PTMC 被列为低危癌,对未出现已知危险因素或淋巴结转移征象的低危癌一般推荐一侧腺叶伴/不伴峡部切除术。然而有报道 PTMC 中多灶浸润、甲状腺外侵犯和淋巴结转移,分别是 7.1% ~ 56.8%, 2.0% ~ 62.1% 和 0 ~ 64%。部分研究比较了 PTC 与 PTMC 临床病理特征,发现两者多灶浸润、甲状腺外侵犯和淋巴结转移发生率相似。BRAF^{V600E}突变也是 PTMC 最多见的遗传变化。BRAF^{V600E}突变阳性的 PTMC 比阴性者更具侵袭性,复发率更高。

目前对低危 PTC 病人多采取较低强度的术后辅助治疗和较少的随访,对晚期病人根据组织学侵袭性或较高风险采取更积极的治疗。对高危病人目前的治疗和随访模式下,术前诊断 BRAF^{V600E}突变意义不大。但是 PTC 患者中大部分被列为低危,许多 PTMC 被列入 I / II 期,而这些病人 10 年内复发风险大,按目前的治疗策略,这些患者可能接受“不充分”的治疗和随访。BRAF^{V600E}突变与侵袭性增加、二次遗传事件、向去分化进展以及凋亡抵抗相关,被证明是一个预后差的标志物。对这些病人术前检测 BRAF^{V600E}突变有助于调整对这些患者的治疗策略,采取更积极的治疗,降低复发率。

3. BRAF 突变和 RET/PTC 与治疗:靶向作用于 BRAF 激酶或其下游效应器的抑制剂,可以抑制肿瘤生长和进展,该领域的深入研究为 PTC 的治疗,尤其

对于手术不能完整切除,不摄碘,对传统治疗不敏感的 PTC 患者开辟了新的治疗手段。(1) 非选择性 RAF 激酶抑制剂:AAL - 881 和 LBT - 613 是异喹啉化合物,非选择性抑制 Raf 激酶。在体外和动物试验显示抑制肿瘤细胞生长作用。对 RET/PTC 重排细胞(TPC1)细胞生长半数有效抑制浓度(IC₅₀)分别为 0.10 ~ 0.25mmol/L 和 0.05mmol/L,对 BRAF^{V600E}甲状腺癌细胞株(NPA、ARO 和 FRO)需较高浓度(约 TPC1 细胞的 20 倍)。细胞周期分析显示抑制 S 期向 G₂ ~ M 期进展,并阻滞 G₀ ~ G₁ 期,结果细胞生长减少并凋亡。但两者尚未进入临床试验。(2) BRAF^{V600E}特异性低分子抑制剂:PLX4032 阻滞 ATC 细胞和 NPA 细胞生长,对 TPC1 细胞株和 BRAF 野生型细胞株的 IC₅₀是 BRAF^{V600E}突变细胞株的 50 倍,显示对 BRAF^{V600E}突变的选择性抑制作用。在延长试验中诱导 ATC 细胞恢复表达 NIS。体内恢复 BRAF^{V600E}突变小鼠甲状腺癌摄碘活性,提示诱导分化作用。该药未进入临床试验。(3) MEK1/2 抑制剂:不论 BRAF^{V600E}突变与否,MEK1/2 抑制剂抑制 ERK 磷酸化。包括 AZD6244、CI - 1040 和 PD0325901 等,体外抑制细胞生长;体内抑制 BRAF^{V600E}突变小鼠原位移植瘤生长,并恢复 NIS 表达。CI - 1040 对来自 TPC1、BRAF 突变和 RAS 突变等不同基因改变细胞和小鼠原位移植瘤均显示抑制生长作用,对 TPC1 和 BRAF 突变 PTC 细胞 IC₅₀分别为 1.1 μmol/L 和 0.052 μmol/L,细胞周期分析显示 G₁ 期 - G₂/M - S 期分布依次为 TPC1 细胞株 88% - 5% - 5% (对照组 57% - 23% - 19%)、BRAF 突变 PTC 细胞 > 85% - 7% - 6% (对照组 61% - 15% - 23%),提示 G₁ 期阻滞作用;蛋白质印迹分析显示对磷酸化 ERK1/2 脱磷酸作用 and 抗凋亡蛋白表达下降作用。CI - 1040 是第 1 个进入临床试验的 MEK 抑制剂,AZD6244 也已进入临床试验。(4) 多靶点激酶抑制剂:这类药物包括 BAY43 - 9006(索拉非尼)、Sunitinib(舒尼替尼)、Axitinib(阿西替尼)和 Motesanib 等,系 BRAF 靶向和血管生成相关多靶点 RTK 抑制剂,研究者认为这类药物不是通过选择性抑制 BRAF,而是通过阻断血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)抑制血管生成途径和(或)血小板源生长因子受体(platelet derived growth factor receptor, PDGFR)途径抑制分化型甲状腺癌细胞生长。除了舒尼替尼仅对 RET/PTC 重排肿瘤有效阻断外,不同研究均显示多靶点 RTK 抑制剂对 TPC1 和 BRAF 突

变 PTC 细胞株抑制生长作用,对 RET/PTC 重排原位移植瘤生长抑制达 58% ~ 94%,对 BRAF 突变移植瘤达 53% 直至完全抑制,且均已进入临床试验阶段。虽然不同试验评估了 BRAF 抑制剂的抗癌效应,临床前期结果理想,但目前临床试验结果欠理想。

三、展 望

BRAF 突变和 RET/PTC 是 PTC 发生过程中最常见的早期事件。应用于 FNA 可提高诊断不确定和细胞量不足标本的细胞学诊断准确率,方法可行。BRAF^{V600E} 突变提示预后不良。低危 PTC,尤其是 PTMC,发生率高,复发风险却容易被忽视。发生 BRAF^{V600E} 突变的 PTC,包括 PTMC,具有多灶浸润、容易发生甲状腺外侵犯和早期淋巴结转移等特点,术前检测 BRAF^{V600E} 突变可优化对这部分患者的治疗和随访策略。对于手术不能完整切除,不摄碘的进展性晚期 PTC 患者目前缺乏有效的治疗手段,特异性激酶抑制剂分子靶向治疗则为这些患者开辟了新的治疗手段。

然而目前的研究也存在多项争议,包括:①肿瘤大小:一般认为,BRAF 突变可能不影响肿瘤生长,但在同样的生长条件下可能引起肿瘤侵袭性更早地激活;②淋巴结转移: BRAF 突变或存在于原发灶或在转移细胞重新形成,在 PTC 细胞淋巴结水平播散起关键作用的可能性有待进一步明确;③远处转移、肿瘤分期与复发:多项研究相关性不一致;④组织学变异:大部分研究显示 BRAF 突变与经典 PTC 和高细胞变异 PTC 相关,未发生基因改变与单纯的滤泡变异组织学相关。高细胞变异更具侵袭性、分化较差;⑤未分化癌: BRAF 突变也在 ATC 被检测到显著性。低分化甲状腺癌存在一个 BRAF 突变阳性部分及部分乳头状分化,提示从乳头状癌到低分化和未分化癌的进展过程中,可能与 BRAF 突变持续激活及其诱导的二次遗传事件相关;⑥靶向治疗:多靶点激酶抑制剂在结肠癌、非小细胞肺癌取得了可喜的临床成果,但其在甲状腺乳头状癌的临床疗效有待深入的试验进一步验证。

参考文献

- 1 Cramer JD, Fu P, Harth KC, *et al.* Analysis of the rising incidence of thyroid cancer using the Surveillance, epidemiology and end results national cancer data registry[J]. *Surgery*,2010,148(6):1147-1152
- 2 Tang KT, Lee CH. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma: pathogenic role and clinical implications[J]. *J Chin Med Assoc*, 2010,73(3):113-128
- 3 Henderson YC, Shellenberger TD, Williams MD, *et al.* High rate of BRAF and RET/PTC dual mutations associated with recurrent papillary thyroid carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*,2009,15(2):485-491

- 4 Zafon C, Obiols G. The mitogen - activated protein kinase (MAPK) signaling pathway in papillary thyroid cancer. From the molecular bases to clinical practice[J]. *Endocrinol Nutr*,2009,56(4):176-186
- 5 Stanojevic B, Dzodic R, Saenko V, *et al.* Mutational and clinico - pathological analysis of papillary thyroid carcinoma in Serbia[J]. *Endocr J*,2011,58(5):381-393
- 6 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
- 7 Nikiforova MN, Nikiforov YE. Molecular diagnostics and predictors in thyroid cancer[J]. *Thyroid*,2009,19(12):1351-1361
- 8 Maria RP, Isabella MB, Susi B, *et al.* BRAF analysis by fine needle aspiration biopsy of thyroid nodules improves preoperative identification of papillary thyroid carcinoma and represents a prognostic factor [J]. *A mono - institutional Experience Clin Chem Lab Med*,2011,49(2):325-329
- 9 Anna G, Maria RS, Vincenzo M, *et al.* Prevalence of RET/PTC rearrangement in benign and malignant thyroid nodules and its clinical application[J]. *Endo J*,2011,58(1):31-38
- 10 Kang DY, Kim KH, Kim JM, *et al.* High prevalence of RET, RAS, and ERK expression in Hashimoto's thyroiditis and in papillary thyroid carcinoma in the Korean population [J]. *Thyroid*,2007,17(11):1031-1038
- 11 Mesa Jr C, 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*,2006,66:6521-6529
- 12 Durand S, Ferraro - Peyret C, Joufre M, *et al.* Molecular characteristics of papillary thyroid carcinomas without BRAF mutation or RET/PTC rearrangement: relationship with clinico - pathological features [J]. *Endocr Relat Cancer*,2009,16(2):467-481
- 13 Rivera M, Ricarte - Filho J, Knauf J, *et al.* Molecular genotyping of papillary thyroid carcinoma follicular variant according to its histological subtypes (encapsulated vs infiltrative) reveals distinct BRAF and RAS mutation patterns[J]. *Mod Pathol*,2010,23(9):1191-1200
- 14 Xing M. Genetic alterations in the phosphatidylinositol - 3 kinase/Akt pathway in thyroid cancer[J]. *Thyroid*,2010,20(7):697-706
- 15 Romei C, Ciampi R, Faviana P, *et al.* BRAFV600E mutation, but not RET/PTC rearrangements, is correlated with a lower expression of both thyroperoxidase and sodium iodide symporter genes in papillary thyroid cancer[J]. *Endocr Relat Cancer*,2008,15(2):511-520
- 16 Porra V, Ferraro PC, Durand C, *et al.* Silencing of the tumor suppressor gene SLC5A8 is associated with BRAF mutations in classical papillary thyroid carcinomas[J]. *J Clin Endocrinol Metab*,2005,90:3028-3035
- 17 Mian C, Barollo S, Pennelli G, *et al.* Molecular characteristics in papillary thyroid cancers (PTCs) with no 131I uptake[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*,2008,68(1):108-116
- 18 Cramer JD, Fu P, Harth KC, *et al.* Analysis of the rising incidence of thyroid cancer using the surveillance, epidemiology and end results national cancer data registry[J]. *Surgery*,2010,148(6):1147-1152

(收稿日期:2012-03-28)

(修回日期:2012-04-23)