DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20181204.002
网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1049.r.20181204.1212.004.html

基于 TCGA 数据库分析 BRAF ^{V600E}和 RAS 基因突变与甲状腺乳头状癌临床病理特征的相关性

赵 跃[1,2],吴冰杰[3], 王朵朵[4],刘春蓉[1],孙甲甲[2],周广磊[2],黄景昊[2],吴凤云[2] ✉
(1.中国人民武装警察部队后勤学院,天津 300309;2.中国人民武装警察部队特色医学中心甲状腺和乳腺外科,天津 300162;3.天津医科大学研究生院,天津 300070;4.安徽医科大学研究生院,安徽 合肥 230032)

[摘要] **目的**:分析 BRAF ^{V600E}和 RAS 基因突变在甲状腺乳头状癌(PTC)中的发生情况,研究 BRAF ^{V600E}和 RAS 基因突变与 PTC 各临床病理特征及预后的相关性。**方法**:通过 cBioPortal 网站下载整理癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas,TCGA)数据库中 PTC 的相关信息,选取资料完善的 402 例 PTC 样本的基因突变和临床信息进行分析。先单因素分析 BRAF ^{V600E}和 RAS 基因突变与临床病理参数的相关性,再对其进行多因素 Logistic 回归分析。**结果**:在 402 例 PTC 中,BRAF^{V600E} 的突变率为 48.5%(195/402),RAS 基因突变率为 10.2%(41/402)。单因素分析显示 BRAF ^{V600E}突变与患者的年龄、性别无关($P>0.05$),与有无淋巴结转移、有无腺外侵犯、分期、复发进展和病理亚型有关($P<0.05$);RAS 基因突变与患者年龄、性别、分期、复发进展无关($P>0.05$),与有无淋巴结转移、有无腺外侵犯和病理亚型有关($P<0.05$)。Logistics 回归分析显示 BRAF^{V600E} 基因突变与有无腺外侵犯和 PTC 的病理亚型有关($P<0.05$),RAS 基因突变与有无淋巴结转移、有无腺外侵犯和 PTC 病理亚型有关($P<0.05$)。**结论**:在 PTC 中,BRAF^{V600E} 基因突变率显著高于 RAS 基因突变率;BRAF ^{V600E}和 RAS 基因突变可作为 PTC 患者预后的预测因素。

[关键词] 甲状腺乳头状癌; TCGA 数据库;BRAF ^{V600E};RAS;突变
[中图分类号] R736.1 [文献标识码] A [文章编号] 1007-1237(2019)01-0001-04

Correlation of BRAF^{V600E} and RAS mutations with clinicopathological characteristics of papillary thyroid cancer using TCGA database analysis

ZHAO Yue[1,2], WU Bing-jie[3], WANG Duo-duo[4], LIU Chun-rong[1], SUN Jia-jia[2], ZHOU Guang-lei[2], HUANG Jin-hao[2], WU Feng-yun[2] ✉

(1. *Logistics University of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin* 300309, *China*; 2. *Department of Thyroid and Breast Surgery, Characteristic Medical Center of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin* 300162, *China*; 3. *Graduate School, Tianjin Medical University, Tianjin* 300070, *China*;4. *Graduate School, Anhui Medical University, Hefei* 200233, *Anhui, China*)

[*Foundation Project*]: *This study was supported by National Natural Science Foundation of China (Grant No.81302577).*

[*Author*]:*ZHAO Yue*(1994-), *Male, from Hanshan Anhui, Master Degree Candidate, E-mail*:18622045874@163.*com*.
[*Correspondence to*]:*WU Feng-yun, Chief Physician, Master Supervisor, E-mail*:*wfy*90@126.*com*.

Received: 2018-11-09 *Revised*: 2018-11-20 *JHMC*,2019;25(1):0001-0004

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81302577)
[作者简介] 赵跃(1994-),男,安徽含山人,硕士研究生,E-mail:18622045874@163.com。
[通信作者] 吴凤云,主任医师,硕士研究生导师,E-mail:wfy90@126.com。
[收稿日期] 2018-11-09 [修回日期] 2018-11-20 网络出版时间:2018-12-06 11:56:02

[ABSTRACT] Objective: To investigate the occurrence of $BRAF^{V600E}$ and RAS mutations in thyroid papillary carcinoma (PTC) and to study their correlation with clinicopathological features of PTC. Methods: Relevant information of PTC was downloaded and organized from The Cancer Genome Atlas (TCGA) via cBioPortal, and then the gene mutation and clinical information of 402 PTC samples were analyzed. The correlation of $BRAF^{V600E}$ and RAS mutations with clinicopathological features and prognosis of PTC were subjected to univariate analysis. Then, binary logistic multivariate analysis was used to analyze the factors screened above. Results: $BRAF^{V600E}$ mutation rate was 48.5% (195/402) and RAS mutation rate was 10.2% (41/402) in 402 cases of PTC. Univariate analysis showed that $BRAF^{V600E}$ mutation had nothing to do with age and sex of patients ($P>0.05$). There was a significant correlation among $BRAF^{V600E}$ mutation and lymph node metastasis, extrathyroidal invasion, staging, recurrence, progression and pathological subtypes in PTC ($P<0.05$). There was no significant correlation among RAS and age, sex, staging, recurrence, progression ($P>0.05$). There was a significant correlation among RAS and lymph node metastasis, extrathyroidal invasion and pathological subtypes in PTC ($P<0.05$). Multivariate logistic regression analysis indicated that there was a significant correlation among $BRAF^{V600E}$ mutation and extrathyroidal invasion, pathological subtypes in PTC ($P<0.05$). There was a significant correlation among RAS and lymph node metastasis, extrathyroidal invasion and pathological subtypes in PTC ($P<0.05$). Conclusion: The mutation rate of $BRAF^{V600E}$ is significantly higher than that of RAS in PTC. Mutations in $BRAF^{V600E}$ and RAS can be used as predictors of prognosis in PTC.

[KEY WORDS] Papillary thyroid cancer; TCGA data; $BRAF^{V600E}$; RAS; Mutation

甲状腺癌是最常见的内分泌恶性肿瘤，近年来其国内外发病率不断上升，甲状腺乳头状癌是其最常见的病理类型，占甲状腺癌的80%以上[1,2]。研究表明甲状腺癌的发生、发展和预后与基因突变、缺失、失活、激活等相关，包括BRAF、RAS、TP53等基因突变和RET/PTC、PAX8/PPARG等基因重排，其中$BRAF^{V600E}$基因突变最常见于PTC中，RAS突变最常见于甲状腺滤泡状癌(follicular thyroid carcinoma, FTC)中，也可见于PTC的一些病理亚型和良性甲状腺结节中[3-5]。越来越多研究表明$BRAF^{V600E}$和RAS基因突变与甲状腺癌的预后、治疗有关，包括TSH(促甲状腺激素)抑制治疗和碘^{131}放射治疗[6]。但关于$BRAF^{V600E}$基因突变对PTC各临床病理参数的影响结论不一，且样本量较少，关于RAS基因突变的研究大多为甲状腺滤泡状癌，RAS基因突变与PTC临床病理特征的相关研究还较少[7,8]。因此，本文从TCGA数据库中下载筛选出402例PTC患者的相关信息，分析$BRAF^{V600E}$和RAS基因突变与PTC各临床病理参数的相关性，探讨其对PTC预后的评估价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

cBioPortal网站整合了多个肿瘤基因组研究的数据，包括体细胞突变，DNA拷贝数改变，mRNA和microRNA表达，DNA甲基化，蛋白丰度以及磷蛋白丰度，数据内容来源于TCGA、ICGC、GEO等数据库，此外部分样本还包括了临床预后等表型的信息。本文通过cBioPortal网站(http://www.cbioportal.org/)下载TCGA数据库中人类PTC的临床数据。根据PTC患者临床信息的完整程度进行筛选，删除其中TNM分期和临床病理分期缺失、病理亚型信息缺失、生存时间缺失的患者，最后共纳入402例PTC样本信息。

1.2 统计学处理

用SPSS 25.0软件对数据进行统计学分析，基因突变与临床病理参数的相关性分析采用χ^2检验，$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 $BRAF^{V600E}$和RAS基因突变与PTC各临床病理参数的相关性

402例PTC中$BRAF^{V600E}$基因突变率为48.5%(195/402)，高细胞亚型突变率75.8%(25/33)，经典型突变率为56.5%(156/276)，滤泡亚型突变率为13.1%(11/84)，其它亚型突变率为33.3%(3/9)。RAS基因突变率为10.2%(41/402)，滤泡型亚型突变率为31%(26/84)，经典型突变率为5.4%(15/276)，其它亚型未见RAS基因突变。单因素分析显示，$BRAF^{V600E}$基因突变与患者的年龄、性别无关($P>0.05$)，而与患者有无淋巴结转移、是否腺外侵犯、分期、复发进展以及PTC病理亚型有关($P<0.05$)。见表1。RAS基因突变与患者的年龄、性别、分期、复发进展无关($P>0.05$)，而与患者有无淋巴结转移、是否腺外侵犯以及PTC病理亚型有关($P<0.05$)。见表2。在三种RAS基因突变中，NRAS突变率最高为63.4%(26/41)，HRAS突变率为29.3%(12/41)，KRAS突变率为7.3%(3/41)。

表 1 BRAF^{V600E} 基因突变与甲状腺乳头状癌临床病理特征的关系

Table 1 Association between BRAF^{V600E} gene mutation and clinicopathological features of thyroid papillary carcinoma

变量	n	BRAF^{V600} 突变(例,%)		χ^2	P
		+	−		
年龄(岁)					
<45	195	89(45.6)	106(54.4)	1.246	0.264
≥45	207	106(51.2)	101(48.8)		
性别					
男	103	50(48.5)	53(51.5)	<0.001	0.993
女	299	145(48.5)	154(51.5)		
淋巴结转移					
是	181	99(54.7)	82(45.3)	5.048	0.025
否	221	96(43.4)	125(56.6)		
腺外侵犯					
是	117	74(63.2)	43(36.8)	14.356	<0.01
否	285	121(42.5)	164(57.5)		
分期					
Ⅰ~Ⅱ期	276	124(44.9)	152(55.1)	4.518	0.034
Ⅲ~Ⅳ期	126	71(56.3)	55(43.7)		
复发/进展					
是	26	18(69.2)	8(30.8)	4.779	0.029
否	376	177(47.1)	199(52.9)		
病理亚型					
经典型	276	156(56.5)	120(43.5)	59.910	<0.01
滤泡型	84	11(13.1)	73 (86.9)		
高细胞型	33	25(75.8)	8(24.2)		
其它亚型	9	3 (33.3)	6 (66.7)		

表 2 RAS 基因突变与甲状腺乳头状癌临床病理特征的关系

Table 2 Association between RAS gene mutation and clinicopathological features of thyroid papillary carcinoma

变量	n	BRAF^{V600} 突变(例,%)		χ^2	P
		+	−		
年龄(岁)					
<45	195	21(10.8)	174(89.2)	0.134	0.714
≥ 45	207	20(9.7)	187(89.8)		
性别					
男	103	11(10.7)	92(89.3)	0.035	0.852
女	299	30(10.0)	269(90.0)		
淋巴结转移					
是	181	8(4.4)	173(95.6)	12.006	<0.01
否	221	33(14.9)	188(85.1)		
腺外侵犯					
是	117	5(4.3)	112(95.7)	6.327	0.012
否	285	36(12.6)	249(87.4)		
分期					
Ⅰ~Ⅱ期	276	31(11.2)	245(88.8)	1.026	0.311
Ⅲ~Ⅳ期	126	10(7.9)	116(92.1)		
复发/进展					
是	26	3(6.5)	23(88.5)	0.054	0.815
否	376	38(10.1)	338(89.9)		
病理亚型					
经典型	276	15(5.4)	261(94.6)	51.112	<0.01
滤泡型	84	26(31.0)	58(69.0)		
高细胞型	33	0	33		
其它亚型	9	0	9		

2.2 BRAF^{V600E} 和 RAS 基因突变的多因素 Logistic 回归分析

为排除各因素间的相互影响,分别以 BRAF ^{V600E}和 RAS 基因突变为因变量,以上述单因素分析中有统计学差异的变量为自变量,进行多因素 logistic 回归分析。结果显示 BRAF ^{V600E}基因突变与患者病理亚型、是否腺外侵犯有关($P<0.05$),RAS 基因突变与患者病理亚型、有无淋巴结转移、是否腺外侵犯有关($P<0.05$)。见表 3、4。

表 3 BRAF^{V600E} 基因突变的 Logistic 回归分析

Table 3 Logistic regression analysis of BRAF^{V600E} gene mutation

变量	$s_{\bar{x}}$	*Wald* χ^2值	*P* 值	*OR* 值	95% *CI*
病理亚型	0.242	19.981	<0.01	2.927	1.828-4.687
淋巴结转移	0.224	0.107	0.743	1.076	0.694-1.668
复发进展	0.457	2.258	0.133	1.986	0.812-4.860
腺外侵犯	0.260	10.488	<0.01	2.324	1.395-3.872
分期	0.255	0.382	0.536	1.171	0.710-1.930

表 4 RAS 基因突变的 Logistic 回归分析

Table 4 Logistic regression analysis of RAS gene mutation

变量	$s_{\bar{x}}$	*Wald* χ^2值	*P* 值	*OR* 值	95% *CI*
病理亚型	0.222	4.420	0.036	1.594	1.032-2.460
淋巴结转移	0.418	7.723	<0.01	0.313	0.138-0.710
腺外侵犯	0.511	4.248	0.039	0.349	0.128-0.950

3 讨论

PTC 是甲状腺癌最常见的病理类型,其发病率不断上升,虽然其恶性程度较低,但淋巴结转移率发生较高,且具有一定的复发率和死亡率[2,9,10]。关于 PTC 分子机制的研究表明 BRAF^{V600E} 基因突变与 PTC 的发生、发展有关,BRAF^{V600E} 基因突变是由于第 15 位外显子的第 1799 位点上的胸腺嘧啶(T)转变成腺嘌呤(A),从而导致密码子 600 位上的缬氨酸(V)被谷氨酸(E) 替代,进而持续激活 BRAF 激酶,造成 MAPK 通路持续活化,导致细胞分裂、增殖,进而形成肿瘤[11,12]。还有研究表明 BRAF^{V600E} 基因突变与 PTC 的临床生物学行为有关,加之会降低摄碘率从而增加对放射性碘治疗的抵抗,影响患者治疗与预后[13-15]。本研究单因素分析显示 BRAF ^{V600E}突变与患者的年龄、性别无关($P>0.05$),而与有无淋巴结转移、有无腺外侵犯、分期、复发进展和病理亚型有关($P<0.05$);多因素分析显示 BRAF^{V600E} 基因突变与 PTC 的病理亚型和有无腺外侵犯有关($P<0.05$)。此外,在 PTC 各病理亚型分组中,BRAF^{V600E} 基因突变率的顺序为高细胞型>经典型>滤泡亚型,这与 PTC 临床侵袭性的特点相似。

RAS 基因是一种原癌基因,包括 NRAS、HRAS 和 KRAS 等 3 种功能性基因,它们编码的 p21 蛋白与 GTP、GDP 结合,调节细胞的生长和分

化[16,17]。约30%的人类恶性肿瘤中存在RAS基因的点突变,包括胰腺癌、肺癌、结直肠癌、肝癌和甲状腺癌等[18,19]。关于甲状腺癌的研究表明,RAS基因最常见于FTC,其次为滤泡型PTC,也可见于部分良性甲状腺结节中,因此用RAS基因突变鉴别结节的良恶性还未得到一致认可[18,20]。但有研究表明RAS基因突变与PTC远处转移有关,关于RAS基因突变与PTC临床病理特征的关系意见不一[21,22]。本研究结果表明,RAS基因突变与患者病理亚型、有无淋巴结转移、是否腺外侵犯有关($P<0.05$),与患者的年龄、性别、分期、复发进展无关($P>0.05$)。在各病理亚型中,RAS基因突变率最高的为滤泡型PTC,其次为经典型PTC,其余亚型中未见RAS基因突变。在三种RAS基因突变率比较中,顺序为NRAS>HRAS>KRAS。

综上所述,在PTC中,最常见的突变为$BRAF^{V600E}$基因突变,RAS突变主要发生在滤泡型PTC中,且最常见的为NRAS突变。$BRAF^{V600E}$和RAS基因突变与PTC的临床病理特征相关,突变的患者具有更加侵袭性的临床生物学行为,可作为PTC患者预后的预测因素。关于$BRAF^{V600E}$和RAS基因突变在甲状腺癌术前鉴别诊断、手术切除范围、术后放射性碘治疗、靶向治疗等方面还需要更多大样本、随访时间长、前瞻性的研究来进一步证实和细化。

参考文献

1 Lim H, Devesa SS, Sosa JA, et al. Trends in thyroid cancer incidence and mortality in the United States, 1974-2013 [J]. JAMA, 2017, 317(13): 1338-1348.

2 董芬,张彪,单广良.中国甲状腺癌的流行现状和影响因素[J].中国癌症杂志,2016,26(1):47-52.

3 Penna GC, Vaisman F, Vaisman M, et al. Molecular markers involved in tumorigenesis of thyroid carcinoma: Focus on aggressive histotypes [J]. Cytogenet Genome Res, 2016, 150(3-4): 194-207.

4 Virk RK, Van Dyke AL, FinkelsteinA, et al. $BRAF^{V600E}$ mutation in papillary thyroid microcarcinoma: A genotype-phenotype correlation [J]. Mod Pathol, 2013, 26(1): 62-70.

5 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): E276-285.

6 Xing M, Alzahrani AS, Carson KA, et al. Association between $BRAF^{V600E}$ mutation and mortality in patients with papillary thyroid cancer [J]. JAMA, 2013, 309(14): 1493-1501.

7 Jang EK, Song DE, Sim SY, et al. NRAS codon 61 mutation is associated with distant metastasis in patients with follicular thyroid carcinoma [J]. Thyroid, 2014, 24(8): 1275-1281.

8 Ciampi R, Romei C, Pieruzzi L, et al. Classical point mutations of RET, BRAF and RAS oncogenes are not shared in papillary and medullary thyroid cancer occurring simultaneously in the same gland [J]. J Endocrinol Invest, 2017, 40(1): 55-62.

9 Liu C, Chen T, Liu Z. Associations between $BRAF^{(V600E)}$ and prognostic factors and poor outcomes in papillary thyroid carcinoma: A meta-analysis [J]. World J Surg Oncol, 2016, 14(1): p. 241.

10 Davies L, Welch HG. Current thyroid cancer trends in the United States [J]. JAMA Otolaryngol Head Neck Surg, 2014, 140(4): 317-322.

11 Nucera C, Porrello A, Antonello ZA, et al. $B\text{-}Raf^{(V600E)}$ and thrombospondin-1 promote thyroid cancer progression [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(23): 10649-10654.

12 Vu-Phan D, Koenig RJ. Genetics and epigenetics of sporadic thyroid cancer [J]. Mol Cell Endocrinol, 2014, 386(1-2): 55-66.

13 Wang Z, Chen JQ, Liu JL, et al. Clinical impact of BRAF mutation on the diagnosis and prognosis of papillary thyroid carcinoma: A systematic review and meta-analysis [J]. Eur J Clin Invest, 2016, 46(2): 146-157.

14 Zhang H, Chen D. Synergistic inhibition of MEK/ERK and $BRAF^{V600E}$ with PD98059 and PLX4032 induces sodium/iodide symporter (NIS) expression and radioiodine uptake in BRAF mutated papillary thyroid cancer cells [J]. Thyroid Res, 2018, 11(11): 13.

15 Li F, Chen G, Sheng C, et al. $BRAF^{V600E}$ mutation in papillary thyroid microcarcinoma: a meta-analysis [J]. Endocr Relat Cancer, 2015, 22(2): 159-168.

16 Mo SP, Coulson JM, Prior IA. RAS variant signalling [J]. Biochem Soc Trans, 2018, 46(5): 1325-1332.

17 Patel SG, Carty SE, McCoy KL, et al. Preoperative detection of RAS mutation may guide extent of thyroidectomy [J]. Surgery, 2017, 161(1): 168-175.

18 刘广伟,张再兴,戴建军. ras基因在肿瘤发生、发展及诊断中的作用研究进展[J].山东医药,2014,54(27):93-95,98.

19 Ryan MB, Corcoran RB. Therapeutic strategies to target RAS-mutant cancers [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2018, 15(11): 709-720.

20 Xing M. Clinical utility of RAS mutations in thyroid cancer: a blurred picture now emerging clearer [J]. BMC, 2016, 27(14): 12.

21 Ming J, Liu Z, Zeng W, et al. Association between BRAF and RAS mutations, and RET rearrangements and the clinical features of papillary thyroid cancer [J]. 2015, 8(11): 15155-15162.

22 邵飞,张晓文,沈山梅. BRAF、TERTp、RAS、RET/PTC、PAX8/PPAR在甲状腺癌中的研究进展[J].医学综述,2018,24(7):1318-1323.