

甲状腺结节良恶性的分子分型研究

李浩榕, 韩如来, 郁丹燕, 叶蕾

(上海交通大学医学院附属瑞金医院内分泌代谢科 上海市内分泌代谢病研究所

国家代谢性疾病临床医学研究中心(上海) 国家卫健委内分泌代谢病重点实验室

上海市内分泌肿瘤重点实验室, 上海 200025)

[摘要] 目的: 建立用于甲状腺结节分子分型的二代靶向测序方案。方法: 基于生物素化探针靶向捕获和高通量测序技术, 对 112 个甲状腺结节相关基因进行靶向测序, 建立用于甲状腺结节分子分型与分化水平的二代靶向测序方案, 甲状腺结节 Panel (ThyNod Panel, 甲结 Panel)。基因包括甲状腺良性结节相关基因、甲状腺恶性肿瘤相关基因、甲状腺发育和功能基因、细胞来源标志基因等, 检测目的基因碱基替换、插入缺失、拷贝数变异和融合等突变类型以及基因表达水平。使用甲结 Panel 对良恶性甲状腺结节进行分子分型。结果: 成功构建并应用甲结 Panel, 完成 856 例良恶性甲状腺结节检测。其中 676 例甲状腺结节检出意义明确的突变, 占比 79.0%。627 例甲状腺结节病理诊断明确, 良性结节占比 17.6%。甲状腺恶性肿瘤病理类型包括经典性乳头状癌、滤泡亚型乳头状癌、髓样癌等。最常见的突变检出基因为 *BRAF* ($n=426$), 其次是 *RET* ($n=68$), *RET/PTC* 融合 ($n=68$), *DICER1* ($n=35$), 还有端粒酶逆转录酶 (telomerase reverse transcriptase, *TERT*) ($n=35$), *HRAS* ($n=24$), *NRAS* ($n=23$), 神经营养酪氨酸受体激酶 (neurotrophin receptor kinase, *NTRK3*) 融合基因 ($n=19$), 真核翻译起始因子 1A, X 染色体 (eukaryotic translation initiation factor 1A, X-chromosomal, *EIF1AX*) 基因 ($n=11$) 等。对检出突变统计结节恶性率, *BRAF* V600E、*RET* 融合变异等结节恶性比例高于 90.0%, 而 *RAS*-类变异恶性率仅为 18.9%。结论: 甲结 Panel 可有效进行甲状腺结节的分子分型。

关键词: 甲状腺结节; 甲状腺结节 Panel; 靶向测序; 融合变异

中图分类号: R581 文献标志码: A 文章编号: 1673-6087(2023)04-0266-04

DOI: 10.16138/j.1673-6087.2023.04.011

Molecular study of benign and malignant thyroid nodules LI Haorong, HAN Rulai, YU Danyan, YE Lei. Department of Endocrine and Metabolic Diseases, Shanghai Institute of Endocrine and Metabolic Diseases, Shanghai National Clinical Research Center for Metabolic Diseases, Key Laboratory for Endocrine and Metabolic Diseases of the National Health Commission of the P.R. China, Shanghai Key Laboratory for Endocrine Tumor, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

[Abstract] **Objective** To establish a next-generation sequencing panel for the molecular diagnosis of thyroid nodules. **Methods** The panel, named ThyNod Panel, was designed to detect single nucleotide variant (SNV), indel, fusion, copy number variant (CNV) and RNA expression levels in 112 thyroid nodules associated genes, including benign and malignant molecular markers, thyroid differentiation or function genes and cell identity marker genes. **Results** The ThyNod Panel was successfully constructed and applied, and 856 benign or malignant thyroid nodules were completed sequencing. Totally 676 (79.0%) thyroid nodules were detected mutations. In 627 thyroid nodules with definite pathological diagnosis, 17.6% were benign nodules and 82.4% were malignant ones, in which malignant pathological types included classical papillary carcinoma, follicular variant papillary carcinoma, and medullary carcinoma. The most common mutant genes detected were *BRAF* ($n=426$), followed by *RET* ($n=68$), *RET/PTC* fusion ($n=68$), *DICER1* ($n=35$), telomerase reverse transcriptase (*TERT*) ($n=35$), *HRAS* ($n=24$), *NRAS* ($n=23$), neurotrophin receptor kinase (*NTRK3*) fusion ($n=19$), and eukaryotic translation initiation factor 1A, X-chromosomal (*EIF1AX*) ($n=11$). The malignant percentage was counted for the detected mutations, and the malignant related variants such as *BRAF* V600E and *RET* fusion were higher than 90.0%, while the overall malignant percentage of *RAS*-like variants was only 18.9%. **Conclusions** ThyNod Panel can efficiently identify genetic characteristics in thyroid nodules and be applied in the molecular diagnosis of thyroid nodules.

Key words: Thyroid nodules; ThyNod Panel; Target sequencing; Fusion

基金项目: 国家自然科学基金项目 (项目编号: 92059106, 82141115)

通信作者: 叶蕾 E-mail: lei_yelei@163.com

甲状腺结节(thyroid nodules)是指甲状腺内可触及的或在超声检查中与周边甲状腺组织回声不同的病灶。绝大多数甲状腺结节为良性,仅有少数最终诊断为恶性结节,即甲状腺癌(thyroid cancer)。甲状腺癌按分化水平分为分化型甲状腺癌、低分化癌和未分化癌。分化型甲状腺癌整体预后较好,甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)是其最常见的类型,也是最常见的甲状腺癌病理类型,占全部甲状腺癌的 85%~90%^[1]。而低分化癌和未分化癌患者预后差。绝大部分穿刺细胞学良性的甲状腺结节不会恶变^[2]。因此,甲状腺结节的良恶性鉴别和甲状腺癌的风险分层非常重要。

分子分型可协助甲状腺结节良恶性鉴别和甲状腺癌的风险分层。甲状腺癌的驱动基因主要涉及丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路和磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)-AKT 通路,肿瘤进展与端粒酶逆转录酶(telomerase reverse transcriptase, TERT)、TP53、PIK3CA 和 AKT1 等基因的突变累积相关^[3-5]。2022 年,世界卫生组织(World Health Organization, WHO)更新了甲状腺肿瘤分类,对滤泡起源的恶性肿瘤根据分子特征和侵袭性进行了分类,分为 BRAF 类(BRAF-like)和 RAS 类(RAS-like)^[1]。BRAF 类为经典乳头状形态,MAPK 信号通路高水平激活;RAS 类多为滤泡性包裹性生长模式,MAPK 信号通路低水平激活。目前许多 RAS 类的 PTC 被重新分类于恶性伴有乳头状核特征的非浸润性滤泡肿瘤和恶性潜能未定的高分化肿瘤。甲状腺良性结节特有 Zeste 同源物增强子 1(enhancer of Zeste homolog 1, EZH1)、斑点型 BTB/POZ 蛋白(speckle type BTB/POZ protein, SPOP)、锌指蛋白 148(zinc finger protein 148, ZNF148)基因突变,占比 20%左右,与甲状腺癌基因组突变类型不同,两者遗传进化路径迥异,具有独立起源^[6]。另外,促甲状腺激素(thyroid stimulating hormone, TSH)受体(TSH receptor, TSHR)和 GNAS 变异可引起甲状腺高功能腺瘤;甲状腺激素合成通路胚系基因突变,可导致结节性甲状腺肿形成^[7-8]。

二代靶向测序技术可对目标基因区域进行靶向高通量测序,可实现测序范围的个性化定制,并且极大节约测序成本。上海交通大学医学院附属瑞金医院(瑞金医院)内分泌团队自建甲结 Panel,可完成 112 个基因的靶向检测,包括甲状腺良性结节相关基因、甲状腺癌相关基因、甲状腺发育和功能

相关基因、细胞来源鉴定基因和内参基因 5 类基因。可检测目的基因的碱基替换、插入缺失、拷贝数变异和融合突变以及基因表达水平。

本研究拟对甲状腺结节进行分子分型,开展甲状腺良恶性结节的分子分型研究。

材料与方法

一、样本采集

纳入 2009 年至 2022 年在瑞金医院接受甲状腺手术和 2020 年至 2022 年期间接受甲状腺细针穿刺(fine needle aspiration, FNA)的患者,排除血清 TSH 异常患者。于入组患者术后组织中直径>0.5 cm 的实性部分取材,并将样本于液氮中速冻保存;入组患者的甲状腺结节 FNA 样本则于获得样本后 2 h 内进行核酸抽提;对罕见甲状腺肿瘤亚型如甲状腺髓样癌等补充了福尔马林固定石蜡包埋(Formalin-fixed paraffin-embedding, FFPE)样本。术后组织病理学诊断根据第 5 版 WHO 甲状腺肿瘤分类^[1]完成。肿瘤分期根据美国癌症联合委员会(American Joint Committee on Cancer, AJCC)第七版 TNM 分类系统进行。本研究获得瑞金医院伦理委员会批准,所有入组患者均知情同意。

二、核酸抽提

使用 AllPrep DNA/RNA micro kit (QIAGEN)试剂盒对液氮冻存组织和 FNA 样本进行 DNA 和 RNA 提取,使用 GeneRead™ DNA FFPE kit(QIAGEN)和 QIAGEN RNeasy® FFPE kit 分别对 FFPE 样本进行 DNA 和 RNA 提取。使用 NanoDrop™ 2000 和 Qubit™ 4.0(Invitrogen™)评估核酸质量和浓度。

三、靶向测序和生信分析

甲结 Panel 使用 Integrated DNA Technologies (IDT) 公司的 xGen™ 定制杂交捕获探针组对目标基因区域实现靶向富集,使用 Illumina NextSeq CN500 高通量测序仪对甲结 Panel 靶向富集的文库进行测序。

由 Illumina bcl2fastq 软件生成 FastQ 文件;使用 GATK 和 HISAT2 软件完成 gDNA 和 cDNA 序列与参考基因组的比对;Mutect2 和 VarDict 软件用于变异读取;Arriba 和 STAR-Fusion 软件用于检测融合变异;CNVkit 软件用于分析拷贝数变异;基因表达使用 TMM 标准化方法。

四、变异解读

变异解读参照美国医学遗传学和基因组学

会 (American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG) 2017 年体细胞变异解读指南进行。按 ACMG 体细胞变异解读指南, 体细胞变异分类中仅 I~II 类变异(强临床意义和潜在临床意义)纳入研究分析。

结 果

一、甲状腺结节分子分型

本研究总计完成 856 例甲状腺结节样本的分子分型, 入组患者平均年龄为 (43.09±13.70) 岁, 女性占比 75.0% (n=642)。其中有 678 例液氮速冻组织、133 例 FNA 样本和 45 例 FFPE 样本。79.0% (n=676) 甲状腺结节检出至少 1 个突变。最常见的突变检出基因为 *BRAF* (n=426); 其次是 *RET* (n=68), 包括 38 例 *RET* 融合基因和 30 例 *RET* 基因的点突变或插入缺失变异; 还有 *TERT* (n=35)、*HRAS* (n=24)、*NRAS* (n=23)、神经生长酪氨酸受体激酶 (neurotrophin receptor kinase, *NTRK3*) 融合基因 (n=19)、*DICER1* (n=19)、真核翻译起始因子 1A, X 染色体 (eukaryotic translation initiation factor 1A, X-chromosomal, *EIF1AX*) (n=11)、*BRAF* 融合 (n=10)、*SPOP* (n=10)、*KRAS* (n=8)、细胞周期检测点激酶 2 (checkpoint kinase 2, *CHEK2*) (n=7)、胰岛素样生长因子 2 mRNA 结合蛋白 3 (insulinlike growth factor 2 mRNA binding protein 3, *IGF2BP3*) 融合基因 (n=7)、*EZH1* (n=6)、*TP53* (n=36)、*TSHR* (n=5)、*ALK* 融合基因 (n=4)、*ATM* (n=4)、*NTRK1* (n=3)、*PIK3CA* (n=3) 等。

FNA 样本中有 106 例存在 *TG* 基因表达, 可判断为甲状腺滤泡细胞来源甲状腺结节, 其中 44 例 (41.5%) 检出变异, 变异基因分别为 *BRAF*、*NRAS*、*KRAS*、*HRAS*、*BRAF* 融合基因、*RET* 融合基因、*DICER1*、*EIF1AX*、*NTRK3* 融合基因、*SPOP*、*TSHR* 等。

二、甲状腺结节分子分型与病理类型

627 例甲状腺结节病理类型结果明确。其中恶性结节中经典型乳头状癌最为常见, 有 285 例 (45.5%); 其次是乳头状微癌 96 例 (15.3%); 髓样癌 91 例 (14.5%); 滤泡亚型乳头状癌 32 例 (5.1%); 高柱细胞亚型乳头状癌 13 例 (2.1%), 弥漫硬化亚型 9 例 (1.4%), 滤泡癌 4 例, 占比 0.6%。97 例 (15.5%) 病理诊断为良性; 恶性潜能未定的滤泡性肿瘤 1 例 (0.2%)。

经典型乳头状癌与乳头状微癌以 *BRAF* 基因变异为主, 占比 80.1% (305 例), 融合基因占比

12.9% (56/435), 其中 75.0% (42 例) 为 *RET* 融合和 *NTRK* 融合基因。髓样癌以 *RET* 基因变异为主, 占比 72.5% (66 例), 其次是 *HRAS* 和 *KRAS*, 占比 19.8% (18 例), 另外, 在髓样癌中检出 1 例 *BRAF* T599dup 和 2 例 *BRAF* N486_P490del。滤泡亚型乳头状癌最常见变异基因为 *BRAF*, 占比 43.8% (14 例), 远低于 *BRAF* 基因变异在经典型乳头状癌与乳头状微癌的检出。而在 9 例弥漫硬化亚型中检出 5 例 *BRAF* 变异, 3 例 *RET* 融合变异。

三、突变恶性百分比

对其中 503 例滤泡细胞来源的甲状腺结节的分子分型结果和病理结果进行分析, 变异恶性百分比如表 1, 总数小于 3 例的分子分型不作统计。发现 *BRAF* 类变异 (*BRAF* V600E、*RET* 融合) 整体恶性百分比为 97.3%; *RAS* 类 (*NRAS*、*HRAS*、*KRAS*、*DICER1*、*EIF1AX*、*IGF2BP3* 融合) 变异整体恶性百分比为 18.9%; 良性结节相关基因整体恶性百分比为 0。

表 1 甲结 Panel 检出突变的恶性百分比[n(%)]

基因	恶性	良性	总计
<i>BRAF</i> V600E	336(98.0)	7(2.0)	343
<i>RET</i> 融合	27(90.0)	3(10.0)	30
<i>TERT</i>	26(100.0)	0(0.0)	26
<i>NRAS/HRAS/KRAS</i>	8(29.6)	18(66.7)	27
<i>NTRK3</i> 融合	14(93.3)	1(6.7)	15
<i>DICER1</i>	1(10.0)	9(90.0)	10
<i>BRAF</i> 融合	8(88.9)	1(11.1)	9
<i>EIF1AX</i>	1(11.1)	8(88.9)	9
<i>IGF2BP3</i> 融合	0(0.0)	7(100.0)	7
<i>CHEK2</i>	4(66.7)	2(33.3)	6
<i>ALK</i> 融合	4(100.0)	0(0.0)	4
<i>TP53</i>	3(100.0)	0(0.0)	3
<i>PIK3CA</i>	3(100.0)	0(0.0)	3
<i>ATM</i>	3(100.0)	0(0.0)	3
<i>EZH1</i>	0(0.0)	4(100.0)	4
<i>SPOP</i>	0(0.0)	4(100.0)	4

讨 论

本研究对 856 例甲状腺结节完成了分子分型。PTC 是最常见的甲状腺肿瘤病理类型, *BRAF* V600E 是最常见的基因变异。甲状腺髓样癌以 *RET* 基因变异和 *RAS* 基因变异为主。在甲状腺髓样癌中还检出 1 例 *BRAF* T599dup 和 2 例 *BRAF* N486_P490del 突变。2023 年有研究首次报道了 *BRAF* 是甲状腺髓样癌驱动基因^[9]。良性甲状腺结节 59.8% 检出变异, 相关基因包括 *SPOP*、*EZH1*、*TSHR*。因此, 甲状腺良性、恶性结节具有特异的分

子分型,并可被检出。

甲状腺结节的良恶性鉴别是甲状腺结节诊疗的关键。本研究发现 *BRAF* 类变异整体恶性百分比为 97.3%,而 *RAS* 类变异整体恶性百分比为 18.9%。可见 *RAS* 类变异在作为标志物进行良恶性鉴别时需慎重。在鉴别甲状腺结节良恶性时,*RAS* 变异如何作为分子标志物应用仍然存在争议。有研究认为检出 *RAS* 突变的甲状腺结节提示低风险甲状腺癌,建议手术^[10]; *RAS* 突变合并 *TERT* 启动子突变或 *EIF1AX* 基因突变时,则与高恶性度的甲状腺癌有关^[11],而 FNA 细胞学不确定的样本中最常见的分子改变也是 *RAS* 突变^[12]。因此,*RAS* 类甲状腺结节的良恶性鉴别是甲状腺结节分子诊断的重点和难点,未来可能需要联合转录或表观遗传特征进行判定。

基因融合变异在甲状腺癌的发生和发展中起着重要作用,已有涉及 *RET*、*NTRK* 融合基因靶向治疗药物获得泛癌或多癌批准^[13-15]。美国癌症基因组图谱(the Cancer Genome Atlas,TCGA)研究发现 15.3%的 PTC 存在融合基因变异^[16]。本研究完成 mRNA 检测的 435 例 PTC 中,12.9%的 PTC 检出融合基因变异,其中 75.0%为 *RET*、*NTRK* 融合基因,可指导晚期进展甲状腺癌患者的靶向治疗药物选择。

对甲状腺结节进行分子分型,能辅助甲状腺结节的良恶性鉴别,并指导晚期甲状腺癌患者靶向治疗药物的确定^[17]。甲结 Panel 可有效进行甲状腺结节的分子分型。

[参考文献]

- [1] Baloch ZW, Asa SL, Barletta JA, et al. Overview of the 2022 WHO classification of thyroid neoplasms[J]. *Endocr Pathol*, 2022,33(1):27-63.
- [2] Durante C, Costante G, Lucisano G, et al. The natural history of benign thyroid nodules[J]. *JAMA*, 2015, 313(9): 926-935.
- [3] Molinaro E, Romei C, Biagini A, et al. Anaplastic thyroid carcinoma: from clinicopathology to genetics and advanced therapies[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2017, 13(11): 644-660.
- [4] Yoo SK, Song YS, Lee EK, et al. Integrative analysis of genomic and transcriptomic characteristics associated with progression of aggressive thyroid cancer[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2764.
- [5] Xing M. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(3): 184-199.
- [6] Ye L, Zhou X, Huang F, et al. The genetic landscape of benign thyroid nodules revealed by whole exome and transcriptome sequencing[J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15533.
- [7] Parma J, Duprez L, Van Sande J, et al. Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene cause hyperfunctioning thyroid adenomas[J]. *Nature*, 1993, 365(6447): 649-651.
- [8] Paschke R. Molecular pathogenesis of nodular goiter[J]. *Langenbecks Arch Surg*, 2011, 396(8): 1127-1136.
- [9] Shi X, Sun Y, Shen C, et al. Integrated proteogenomic characterization of medullary thyroid carcinoma[J]. *Cell Discov*, 2022, 8(1): 120.
- [10] Gupta N, Dasyam AK, Carty SE, et al. *RAS* mutations in thyroid FNA specimens are highly predictive of predominantly low-risk follicular-pattern cancers[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013, 98(5): E914-E922.
- [11] Guan H, Toraldo G, Cerda S, et al. Utilities of *RAS* mutations in preoperative fine needle biopsies for decision making for thyroid nodule management[J]. *Thyroid*, 2020, 30(4): 536-547.
- [12] Marcadis AR, Valderrabano P, Ho AS, et al. Interinstitutional variation in predictive value of the ThyroSeq v2 genomic classifier for cytologically indeterminate thyroid nodules[J]. *Surgery*, 2019, 165(1): 17-24.
- [13] Ye L, Santarpia L, Gagel RF. The evolving field of tyrosine kinase inhibitors in the treatment of endocrine tumors[J]. *Endocr Rev*, 2010, 31(4): 578-599.
- [14] Subbiah V, Hu MI, Wirth LJ, et al. Pralsetinib for patients with advanced or metastatic *RET*-altered thyroid cancer (ARROW): a multi-cohort, open-label, registration, phase 1/2 study[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2021, 9(8): 491-501.
- [15] Drilon A, Laetsch TW, Kummar S, et al. Efficacy of larotrectinib in *TRK* fusion-positive cancers in adults and children[J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(8): 731-739.
- [16] Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma[J]. *Cell*, 2014, 159(3): 676-690.
- [17] 中华医学会内分泌学分会中华医学会, 外科学分会甲状腺及代谢外科学组, 中国抗癌协会头颈肿瘤专业委员会, 等. 甲状腺结节和分化型甲状腺癌诊治指南(第二版)(2023 版)[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2023, 39(3): 181-226.

(收稿日期:2023-06-05)

(本文编辑:王朝晖)