

甲状腺乳头状癌并发桥本氏甲状腺炎患者 BRAF-V600E 基因表达及 T 淋巴细胞亚群分析

孟凡萍¹, 郝 坡², 范 慧¹

(1. 重庆三峡中心医院, 重庆 404000; 2. 重庆三峡医药高等专科学校, 重庆 400020)

摘要: 目的 探讨甲状腺乳头状癌并发桥本氏甲状腺炎 BRAF-V600E 基因表达及 T 淋巴细胞亚群的变化。方法 选取 2018 年 9 月~2019 年 8 月期间于重庆三峡中心医院就诊的单纯甲状腺乳头状癌患者 (PTC 组) 45 例、单纯桥本氏甲状腺炎 (HT 组) 患者 55 例、甲状腺乳头状癌并发桥本氏甲状腺炎患者 (PTC-HT 组) 42 例, 以健康体检者 (NC 组) 50 例为对照。观察三组研究对象的 BRAF-V600E 基因表达及 CD4⁺T, CD8⁺T, CD4⁺/CD8⁺ 的变化。结果 PTC 组患者 BRAF-V600E 突变率 48.15%, HT 组 1.81%, PTC-HT 组 66.67%, NC 组未见 BRAF-V600E 突变; 三个观察组 CD8⁺T 均比 NC 组显著升高, CD4⁺ 均比 NC 组显著降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 但 PTC 组患者 CD4⁺ 显著低于 HT 组和 PTC-HT 组, PTC-HT 组 CD8⁺ 又显著低于 HT 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。三个观察组 CD4⁺/CD8⁺ 均比 NC 组显著升高显著下降, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 与 PTC 组相比, BRAF-V600E 在 PTC-HT 组患者表达率更高, PTC, PTC-HT 和 HT 患者 T 淋巴细胞亚群均分化异常, 机体存在免疫功能障碍, 尤以 PTC 为甚。

关键词: 甲状腺乳头状癌; 桥本氏甲状腺炎; BRAF V600E 基因; CD4⁺/CD8⁺

中图分类号: R736.1; R730.43 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414(2020)01-032-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2020.01.009

Expression of BRAF-V600E Gene and Analysis of Lymphocyte Subgroup in Thyroid Papillary Carcinoma Combined with Hashimoto's Thyroiditis

MENG Fan-ping¹, HAO Po², FAN Hui¹ (1. Chongqing Three Gorges Central Hospital Chongqing 404000, China; 2. Chongqing Three Gorges Medical College, Chongqing 400020, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of BRAF-V600E gene and changes of T lymphocyte subsets in thyroid papillary carcinoma combined with Hashimoto's thyroiditis. **Methods** From September 2018 to August 2019 in Chongqing Three Gorges Central Hospital, 45 patients with simple papillary thyroid cancer (PTC group), 55 patients with Hashimoto's thyroiditis (HT group), 42 patients with papillary thyroid cancer and Hashimoto's thyroiditis (PTC-HT group), and 50 healthy subjects (NC group) were selected as controls. The BRAF-V600E gene expression and the changes of CD4⁺T, CD8⁺T and CD4⁺/CD8⁺ in three groups were observed. **Results** The mutation rate of BRAF-V600E in the PTC group was 48.15%, HT group was 1.81%, PTC-HT group was 66.67%, and the BRAF-V600E mutation was not observed in the NC group. The three observation groups CD8⁺ was all higher than the NC group, CD4⁺ significantly decreased compared with NC group, the differences were statistically significant (all $P < 0.05$), but the PTC group patients CD4⁺ were significantly lower than the HT and PTC-HT groups CD4⁺ in PTC-HT group was significantly lower than the HT group, the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). The three observation groups had a significant decrease in CD4⁺/CD8⁺ compared to the NC group, the differences were statistically significant (t/x^2 all $P < 0.05$). **Conclusion** Compared with PTC, BRAF-V600E had a higher expression rate in PTC-HT patients and the difference was significant, PTC, PTC-HT and HT patients had abnormal differentiation of T lymphocyte subgroups, and the body had immune dysfunction, especially PTC.

Keywords: thyroid papillary carcinoma; Hashimoto's thyroiditis; BRAF-V600E gene; CD4⁺/CD8⁺

甲状腺癌 (thyroid carcinoma, TC) 是头颈部最常见的内分泌腺恶性肿瘤, 其中最多的是甲状腺乳头状癌 (papillary thyroid carcinoma, PTC), 占 TC 的 70%

~80%, 在过去的十年中, PTC 的发病呈上升趋势, 严重危害人类健康。由于 PTC 患者中很大一部分并发桥本甲状腺炎 (Hashimoto's thyroiditis, HT), 故学者们

基金项目: 重庆市自然科学基金面上项目 (重庆市科技局, cstc2019jcyj-msxmX0122)。

作者简介: 孟凡萍 (1980-), 女, 医学博士, 副主任检验师, 研究方向: 脂代谢和胰岛素抵抗, E-mail: 63405353@qq.com。

通讯作者: 郝坡 (1979-), 男, 医学硕士, 副教授, 研究方向: 内分泌分子生物学检验, E-mail: hpo1979@126.com。

认为 HT 与 PTC 存在很大的相关性。HT 属于器官特异性免疫性甲状腺疾病,近年来发病已高达 (22.5 ~ 40.7)/10 万。该病有癌变的可能性,但其发病机制尚不清楚,目前多数人认为该病的癌变与患者的基因突变与免疫状态等多种因素相关。BRAF 基因在人体 7 号染色体上,是人类最重要的原癌基因之一,大约 8% 的人类肿瘤发生 BRAF 突变, V600E 是 BRAF 基因最常见的一个突变位点,主要发生在甲状腺癌、结肠癌、黑色素瘤、非小细胞肺癌中,该突变导致下游 MEK-ERK 信号通路持续激活,对肿瘤的生长增殖和侵袭转移至关重要。大量的研究证实, BRAF-V600E 基因突变与甲状腺癌的诊断、治疗和判断预后都有重要联系。BRAF-V600E 基因诊断 PTC 的特异度几乎可达 100%。HT 是细胞免疫功能紊乱导致, T 淋巴细胞亚群代表着机体的细胞免疫状态,故本次研究通过研究 PTC, PTC 并发 HT, 单纯 HT 患者 BRAF-V600E 基因的表达以及外周血 T 淋巴细胞亚群的变化特征, 探讨其 BRAF-V600E 基因的突变率以及机体的免疫状态, 旨在为二者之间的联系提供一些实验依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选取 2018 年 9 月 ~ 2019 年 8 月于本院就诊的单纯 PTC 患者 (PTC 组) 45 例、单纯 HT 患者 (HT 组) 55 例、PTC 并发 HT 患者 (PTC-HT 组) 42 例, 以健康体检者 (NC 组) 患者 50 例为对照, 年龄 21 ~ 72 岁, 平均年龄 45.7 岁。所有病例均经过病理证实, 临床资料完整, 排除其他肿瘤, 以及对本研究所涉及疾病有影响的其他疾病, 患者亦未接受过免疫治疗。

1.2 试剂和仪器 核酸提取试剂、人类 BRAF 基因 V600E 突变检测试剂盒 (荧光 PCR 法) 为厦门艾德生物医药科技公司产品, 紫外分光光度计购自美国 life 公司, 淋巴细胞亚群分析试剂盒、BD FAS CALIBUR 流式细胞分析仪以及 FCAP CELLQUEST 分析软件为美国 BD 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 人类 BRAF-V600E 基因突变的检测: 样本总 DNA 的提取: 192 例患者均经穿刺取新鲜甲状腺组织, 经 5 g/dl 福尔马林固定后, 用吸附柱法提取样本总 DNA, 用紫外分光光度计测定浓度, 确保其 A_{260nm}/A_{280nm} 在 1.8 ~ 2.0 内。

聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 测定: PCR 操作、反应过程及结果判定按照标准操作程序进行, 并设立阳性质控品和阴性对照, 共同进行检测和分析。

1.3.2 人 T 淋巴细胞亚群的检测: 采集各组受试者静息状态下外周血标本 2ml, 经 EDTA-K₂ 抗凝后上机检测, 用流式细胞术来分析各组受试者 T 淋巴细胞

亚群分布, 用 CD3⁺ (PE 标记)、CD4⁺ (PerCP 标记)、CD8⁺ (FITC 标记) 分别设门, 分别圈出阳性细胞后, 对数据进行采集和分析, 计算 CD4⁺T 细胞数、CD8⁺T 细胞数, 以及 CD4⁺/CD8⁺ 比值。

1.4 统计学分析 采用 SPSS19.0 统计软件, 计量资料采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 三组间的均数比较采用单因素方差分析, 两组间的均数比较采用 *t* 检验, 计数资料用卡方 (χ^2) 检验。

2 结果

2.1 PTC 组、HT 组、PTC + HT 组和 NC 组 BRAF-V600E 突变率 PTC 组、HT 组、TC-HT 组 BRAF-V600E 的突变率分别为 48.15% (26/54), 1.81% (1/55), 66.67% (28/42), 而 NC 组 BRAF-V600E 未突变。

2.2 PTC 组、HT 组、PTC + HT 组和 NC 组 T 淋巴细胞亚群分析结果 见表 1。通过三个观察组与 NC 组的比较和观察组之间的比较可知, 三个观察组 CD8⁺ 均比 NC 组显著升高, CD4⁺ 均比 NC 组显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), PTC 组患者 CD4⁺ 显著低于 HT 组 ($P < 0.05$) 和 PTC-HT 组, PTC-HT 组 CD4⁺ 又显著低于 HT 组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。三个观察组 CD4⁺/CD8⁺ 均比 NC 组显著下降, 其中 PTC 组下降最显著, 其次是 PTC-HT 组、HT 组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

PTC 是内分泌系统最常见的恶性肿瘤, 且患病率逐年上升。其发生机制可能与机体内分泌失调、免疫功能紊乱和基因突变有密切关系^[1]。有报道, 近年来, HT 伴 PTC 发生率高达 58.3%, 可见桥本氏甲状腺炎与癌变有非常大的关系^[2-3]。HT 是常见的自身免疫性甲状腺疾病, 其主要特征是体内出现特异性甲状腺抗体, 甲状腺组织中存在大量淋巴细胞、浆细胞浸润, 最终引起甲状腺组织结构破坏, 造成甲状腺功能低下。HT 的癌变问题是近年来医学界的研究热点, 但发病机制尚不明确, 有学者认为 HT 是 PTC 的危险因素^[4], 也有学者认为 HT 对于 PTC 是一种保护因素^[5]。本研究就是基于 PTC 的发病机制, 通过研究 PTC, PTC-HT, 单纯 HT 患者的 BRAF-V600E 基因的突变率以及 T 淋巴细胞亚群的变化, 探索 HT 与 PTC 之间的相互关系。

BRAF 基因是一个非常重要的原癌基因, 该基因位于人类 7 号染色体上, 编码 RAF 家族丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 是 MAPK/ERK 信号通路的关键分子, 与 PTC、结肠癌、非小细胞肺癌以及黑色素瘤等相关^[6], BRAF-V600E 在甲状腺其他肿瘤中几乎未见突变, 而仅在 PTC 中有突变, 可以说 BRAF-V600E 基因突变是 PTC 诊断的特异性标志物^[7]。有研究报道,

BRAF-V600E 位点的突变与 PTC 的侵袭性、转移和复发相关, BRAF-V600E 不仅可启动正常的甲状腺滤泡细胞肿瘤发生, 还能维持和促进 PTC 的侵袭性^[8]。本研究显示, PTC 组患者 BRAF V600E 突变率 48.15%, PTC 并发 HT 组为 66.67%, PTC 并发 HT 后, 突变率高于单纯 PTC 组, 而单纯 HT 组患者

BRAF-V600E 突变率仅为 1.81%, 这与大部分学者研究结论相符, 提示 BRAF-V600E 突变与 HT 是否发生癌变有关, BRAF-V600E 可能是 HT 发生癌变的危险因素。该基因位点不仅可作为甲状腺肿瘤良恶性的鉴别, 还有助于后续综合治疗, 以及以该基因为靶点的药物研发。

表1 各观察组与 NC 组 T 淋巴细胞亚群分析结果($\bar{x} \pm s$)

项目	PTC	PTC-HT	HT	NC	P 值		
					HT	PTC	PTC-HT
CD4 ⁺ T(CELL/L)	562 ± 52	619 ± 57	782 ± 49	1 004 ± 102	0.012 ^a	0.020 ^a	0.022 ^a
CD4 ⁺ T/总淋巴细胞(%)	24.3 ± 2.56	25.5 ± 2.47	30.0 ± 2.44	37.4 ± 3.02	0.071 ^b	0.025 ^b	
					0.013 ^c		
CD8 ⁺ T(CELL/L)	770 ± 63	659 ± 56	631 ± 41	552 ± 47	0.011 ^a	0.033 ^a	0.003 ^a
CD8 ⁺ T/总淋巴细胞(%)	33.3 ± 3.11	27.1 ± 3.16	24.2 ± 2.49	20.6 ± 2.43	0.031 ^b	0.054 ^b	
					0.032 ^c		
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	0.73 ± 0.05	0.94 ± 0.09	1.24 ± 0.19	1.82 ± 0.26	0.014 ^a	0.017 ^a	0.042 ^a
					0.001 ^b	0.015 ^b	
					0.043 ^c		

注:^a 与 NC 相比较;^b 与 HT 组比较;^c 与 PTC-HT 组比较。

HT 是一种免疫性疾病, 在人类自身免疫过程中, T 细胞所介导的细胞免疫与 PTC 以及 HT 的发生发展有着密不可分的关系^[9-10]。辅助性 T 细胞(Th)和细胞毒性 T 细胞(Ts)是 T 细胞的两个亚型, 前者表达 CD4⁺, 后者表达 CD8⁺, 二者共同维持机体的免疫稳定性, 常用 CD4⁺/CD8⁺ 的比值来衡量机体的免疫状态, 一般此比值维持在 1.5 ~ 2.5 之间, 此值的高低, 代表了机体细胞免疫水平。CD4⁺T 细胞与 CD8⁺T 细胞二者中的一方升高或降低, 或者出现比值倒置, 表明机体正常的免疫平衡状态被打破, 细胞免疫功能被抑制, 免疫细胞的活化和增殖速度减慢, 分泌细胞因子减少, 对肿瘤的识别和杀伤能力也随之下降, 从而增加了肿瘤的发病风险。机体发生 HT 时, 在环境等因素的诱导下, B 细胞受到 CD4⁺T 细胞活化后, 被募集至甲状腺并产生甲状腺自身抗体, 导致该器官的自身免疫性损害。同时, 活化的 CD4⁺T 细胞进一步活化 CD8⁺T 细胞, 产生抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)效应, 使甲状腺细胞进一步受到损害。因此, HT 的发病机制有体液免疫和细胞免疫的共同参与^[11]。近年来, PTC 并发 HT 的病例逐年增多, HT 患者相比其他甲状腺疾病来说, 更容易发生癌变, 而癌变后绝大多数为 PTC。有研究发现 HT 与 PTC 之间存在免疫方面的相互联系^[12-13]。PTC 体内 CD4⁺T 细胞持续下降, 而 CD8⁺T 细胞持续增多, CD4⁺/CD8⁺ 比例持续降低, 而在 HT 体内有 CD4⁺T 细胞减少, 而 CD8⁺T 细胞增多现象, 说明在 HT 与

PTC 机体有相似的免疫状态。本研究显示, HT, PTC, PTC 并发 HT 三组的 CD8⁺ 均比 NC 组升高, CD4⁺ 均比 NC 组降低, CD4⁺/CD8⁺ 均比 NC 组显著下降, 说明 PTC 及 PTC + HT, HT 患者 T 淋巴细胞亚群均分化异常, 机体存在免疫功能障碍, 尤以 PTC 为甚。提示甲状腺癌变与机体免疫功能异常有关, HT 并发 PTC 过程中, 免疫因素起着关键作用, 其癌变可能由于机体长期处于持续免疫功能异常的环境而导致。希望能通过检测患者外周血 T 淋巴细胞亚群, 达到对 PTC 风险的预测和评估, CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺ 也将作为 HT, PTC, PTC 并发 HT 患者免疫治疗的靶点。

参考文献:

- [1] HE Yayi, LIU Shu, GUO Hui, et al. Incidental finding of papillary thyroid carcinoma with BRAFV600E mutation in a patient with coexistent primary hyperparathyroidism and Graves'hyperthyroidism[J]. BMJ Case Reports, 2014, 2014: pii:bcr2013203436.
- [2] PYZIK A, GRYWALSKA E, MATYJASZEK-MATUSZEK B, et al. Immune disorders in Hashimoto's thyroiditis: what do we know so far [J]. Journal of Immunology Research, 2015, 2015: 979167.
- [3] HU Shiqian, RAYMAN M P. Multiple nutritional factors and the risk of Hashimoto's thyroiditis [J]. Thyroid, 2017, 27(5): 597-610.
- [4] UHLIAROVA B, HAJTMAN A. Hashimoto's thyroiditis - an independent risk factor for papillary carcinoma [J]. Braz J Otorhinolaryngol, 2018, 84(6): 729-735.

(下转 48 页)