

• 论 著 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2021. 17. 011

甲状腺细针穿刺残留物标本 BRAF V600E 突变检测联合细胞学诊断在甲状腺乳头状癌中的诊断价值

夏 苇¹, 苏新良², 张阳丽¹, 李雪松², 程 伟¹, 张玉洪^{1△}

重庆医科大学附属第一医院:1. 检验科;2. 内分泌乳腺外科, 重庆 400016

摘 要:目的 探讨使用甲状腺细针穿刺(FNA)残留物标本检测 BRAF V600E 突变的可行性及其联合细胞学诊断在甲状腺乳头状癌中的诊断价值。方法 回顾性收集 2017 年 3 月至 2018 年 12 月的 1 674 例进行甲状腺 FNA、具有完整细胞学诊断及 FNA 残留物标本 BRAF V600E 突变检测结果的患者信息,其中 876 例患者进行了手术切除且有组织病理诊断结果。同时对 128 例手术患者的配对术后切除组织进行 BRAF V600E 突变检测。结果 所有术后甲状腺乳头状癌患者的 BRAF V600E 突变率为 86. 6%(733/846)。FNA 残留物的 BRAF V600E 突变检测结果与配对术后切除组织的 BRAF V600E 突变检测结果一致性极好($Kappa=0.890$, $P<0.001$)。BRAF V600E 突变和细胞学诊断联合检测可将灵敏度由单独细胞学诊断的 83. 5% 提高到 97. 2%, 准确度由 83. 7% 提高到 96. 5%。结论 甲状腺 FNA 残留物标本 BRAF V600E 突变检测联合细胞学诊断可提高甲状腺乳头状癌诊断的灵敏度和准确度。

关键词:BRAF V600E 突变; 甲状腺乳头状癌; 细针穿刺; 细胞学诊断

中图法分类号:R446. 9

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)17-2497-04

The diagnostic value of residual FNA needle rinses for BRAF V600E mutation detection combined with cytological diagnosis in papillary thyroid carcinoma

XIA Wei¹, SU Xinliang², ZHANG Yangli¹, LI Xuesong², CHENG Wei¹, ZHANG Yuhong^{1△}

1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Endocrine and Breast

Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: **Objective** To investigate the feasibility of detecting BRAF V600E mutation by using residual fine-needle aspiration (FNA) needle rinses and the diagnostic value combined with cytological diagnosis in papillary thyroid carcinoma (PTC). **Methods** The cytological diagnosis and residual FNA needle rinses for BRAF V600E mutation detection results of 1 674 patients, who underwent thyroid FNA in the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University from March 2017 to December 2018 were collected retrospectively. A total of 876 patients received a postoperative diagnosis. For 128 of the surgical patients, paired surgical tissue samples were collected to perform BRAF V600E mutation detection. **Results** There were 86. 6% (733/846) PTC nodules harbored the BRAF V600E mutation. Most paired residual FNA needle rinse samples and surgical tissues received consistent BRAF V600E mutation results showing almost perfect agreement ($Kappa=0.890$, $P<0.001$). A combination of BRAF V600E mutation detection and FNA cytology improved the sensitivity of PTC diagnosis from 83. 5% to 97. 2%, and accuracy from 83. 7% to 96. 5%. **Conclusion** A combination of residual FNA needle rinses for BRAF V600E mutation detection and FNA cytological diagnosis could improve the sensitivity and accuracy of diagnosis of PTC.

Key words: BRAF V600E mutation; papillary thyroid carcinoma; fine-needle aspiration; cytological diagnosis

随着超声检查技术的发展,越来越多的甲状腺结节被检出^[1],根据 Bethesda 分类系统进行细针穿刺(FNA)细胞学诊断被认为是最经典的术前鉴别甲状腺结节良恶性的方法^[2],然而仍有 10%~40%接受 FNA 细胞学诊断的患者无法获得确诊^[3-5]。因此,联

合其他的检查方法进一步明确甲状腺结节的良恶性,提高诊断的灵敏度和准确度显得非常必要。有研究表明,BRAF V600E 突变是甲状腺乳头状癌(PTC)中最常见的分子改变,存在于 36%~80%的 PTC 中,对 PTC 有较高的特异度^[6]。FNA 细胞学诊断的同时进

作者简介:夏苇,女,在读硕士研究生,主要从事肿瘤的分子诊断研究。△ 通信作者,E-mail:zhangyh1963@126. com。

本文引用格式:夏苇,苏新良,张阳丽,等. 甲状腺细针穿刺残留物标本 BRAF V600E 突变检测联合细胞学诊断在甲状腺乳头状癌中的诊断价值[J]. 检验医学与临床,2021,18(17):2497-2500.

行 BRAF V600E 突变检测有助于检出 PTC、指导手术及避免不必要的手术。目前, BRAF V600E 突变检测使用的标本主要为额外进行 FNA 获取的标本、FNA 涂片、细胞块和术后切除组织等^[7-10]。而使用 FNA 残留物标本进行 BRAF V600E 突变检测, 不用额外进行穿刺, 可以最大限度地利用有限的穿刺物。因此, 本研究探讨了使用 FNA 残留物标本检测 BRAF V600E 突变的可行性及其与细胞诊断学联合在 PTC 中的诊断价值, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 回顾性收集重庆医科大学附属第一医院 2017 年 3 月至 2018 年 12 月收治的 1 674 例进行甲状腺 FNA 的患者信息, 均具有完整细胞学诊断、FNA 残留物标本 BRAF V600E 突变检测结果, 患者包括男 353 例, 女 1 321 例; 年龄 13~89 岁, 平均(45±12)岁。其中 876 例患者进行了手术切除且有组织病理诊断结果, 包括男 208 例, 女 668 例, 平均年龄(43±12)岁。同时有 128 例手术患者的配对术后切除组织进行了 BRAF V600E 突变检测。

1.2 方法

1.2.1 甲状腺 FNA 和细胞学诊断 在超声引导下进行甲状腺 FNA, 每例患者穿刺 2~3 针。穿刺液制成酒精固定的涂片, 并使用 HE 染色。病理医师根据 Bethesda 分类系统进行细胞学诊断: (1) 标本无法诊断或不满意; (2) 良性病变; (3) 意义不明的细胞非典型病变或滤泡性病变(AUS/FLUS); (4) 滤泡性肿瘤或可疑滤泡性肿瘤(FN/SFN); (5) 可疑恶性(SM); (6) 恶性^[5]。

1.2.2 标本制备和 DNA 提取 使用 5 mL 生理盐水冲洗针头内剩余物质, 残留物储存于 EP 管中。按照核酸提取试剂盒(成都新百基生物科技有限公司)说明书提取 FNA 残留物 DNA。将术后切除组织制成 5 μm 厚的切片 5 张, 由病理医师在显微镜下标记切片中肿瘤细胞比例>50% 的区域, 并刮取、加入 EP 管中, 按照核酸提取试剂盒(厦门艾德生物医药科技股份有限公司)说明书提取术后组织 DNA。将 FNA 残留物和术后组织提取出的 DNA 使用紫外分光光度计(美国赛默飞 NanoDrop One)进行浓度和纯度检测, 并将 DNA 浓度稀释至 0.4 ng/μL。

1.2.3 扩增阻滞突变系统 PCR (ARMS-PCR) 检测 使用人类 BRAF V600E 突变检测试剂盒(厦门艾德生物医药科技股份有限公司)进行 BRAF V600E 突变检测, 每个反应体系包含 5 μL DNA 和 35 μL 试剂。使用 Cobas Z480 实时荧光定量 PCR 仪进行 ARMS-PCR, 反应流程如下: 第 1 阶段 1 个循环, 95℃ 5 min; 第 2 阶段 15 个循环, 95℃ 25 s、64℃ 20 s、72℃ 20 s; 第 3 阶段 31 个循环, 93℃ 25 s、60℃ 35 s、72℃ 20 s。待测标本的内控(HEX/VIC)信号有明显的扩增曲线且 Ct 值为 13~21, 则确定检测有效。

当标本的 FAM 信号 Ct 值等于或低于 28 时为 BRAF V600E 突变型, 高于 28 为 BRAF V600E 野生型。

1.3 统计学处理 以术后病理诊断作为金标准计算灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值和准确度。使用 SPSS25.0 统计软件进行数据处理及统计分析, 计数资料以例数或百分率表示, 组间比较采用 χ^2 检验。FNA 残留物与术后切除组织的 BRAF V600E 突变检测结果采用 Kappa 一致性检验分析二者的一致性。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同特征患者的 BRAF V600E 突变检测结果比较 男性患者 BRAF V600E 突变率明显高于女性患者, 差异有统计学意义($\chi^2=4.398, P=0.036$), 年龄≤50 岁患者 BRAF V600E 突变率明显高于年龄>50 岁患者, 差异有统计学意义($\chi^2=20.404, P<0.001$)。918 例(54.8%)患者检测到 BRAF V600E 突变, 6 个类别细胞学诊断标本的 BRAF V600E 突变率不同, 差异有统计学意义($\chi^2=792.872, P<0.001$), 进一步分析显示恶性患者的 BRAF V600E 突变率最高, 其他依次为 SM 和 AUS/FLUS 患者, 标本无法诊断或不满意、良性病变和 FN/SFN 患者的突变率较低。见表 1。

表 1 不同特征患者的 BRAF V600E 突变检测结果比较[n(%)]

特征	n	BRAF V600E 突变型	BRAF V600E 野生型	χ^2	P
性别				4.398	0.036
男	353	211(59.8)	142(40.2)		
女	1 321	707(53.5)	614(46.5)		
年龄(岁)				20.404	<0.001
≤50	1 121	658(58.7)	463(41.3)		
>50	553	260(47.0)	293(53.0)		
细胞学诊断				792.872	<0.001
标本无法诊断或不满意	73	1(1.4)	72(98.6)		
良性病变	345	16(4.6)	329(95.4)		
AUS/FLUS	383	179(46.7)	204(53.3)		
FN/SFN	22	0(0.0)	22(100.0)		
SM	266	203(76.3)	63(23.7)		
恶性	585	519(88.7)	66(11.3)		

2.2 876 例手术患者的 BRAF V600E 突变及病理特征 876 例手术患者中, PTC 846 例, 良性病变 30 例, 良性病变中结节性甲状腺肿 8 例, 滤泡性腺瘤 7 例, 桥本氏甲状腺炎 5 例, 正常组织 5 例, 透明样变 3 例, 亚急性甲状腺炎 1 例, 纤维组织增生伴炎性细胞浸润 1 例。术后病理诊断和相应的 FNA 细胞学诊断及 BRAF V600E 突变检测结果见表 2。846 例患者的术

后病理诊断为 PTC 的患者中 733 例(86.6%)患者为 BRAF V600E 突变型。在 138 例细胞学诊断为 AUS/FLUS 的手术患者中,131 例术后病理诊断为 PTC,BRAF V600E 突变检测在 AUS/FLUS 手术患者中的灵敏度为 84.7%,准确度为 84.1%;在 5 例细胞学诊断为 FN/SFN 的手术患者中,1 例术后病理诊断为 PTC,为 BRAF V600E 野生型。

表 2 876 例手术患者的 BRAF V600E 突变检测结果、细胞学诊断和术后病理诊断[n(%)]

细胞学诊断	<i>n</i>	术后病理 诊断为 PTC	术后病理诊断为 PTC 中 BRAF V600E 突变
标本无法诊断或不满意	5	3(60.0)	0(0.0)
良性病变	19	5(26.3)	5(100.0)
AUS/FLUS	138	131(94.9)	111(84.7)
FN/SFN	5	1(20.0)	0(0.0)
SM	206	205(99.5)	173(84.4)
恶性	503	501(99.6)	444 (88.6)
合计	876	846(96.6)	733(86.6)

2.3 FNA 残留物和配对术后切除组织的 BRAF V600E 突变检测结果 128 例手术患者的配对术后

切除组织的 BRAF V600E 突变检测结果见表 3, *Kappa* 一致性检验显示,配对术后切除组织的 BRAF V600E 突变检测结果与 FNA 残留物的 BRAF V600E 突变检测结果具有极好的一致性(*Kappa* = 0.890, *P* < 0.001)。

表 3 FNA 残留物和配对术后切除组织的 BRAF V600E 突变检测结果(*n*)

配对术后切除组织	FNA 残留物		合计
	BRAF V600E 突变型	BRAF V600E 野生型	
BRAF V600E 突变型	111	2	113
BRAF V600E 野生型	1	14	15
合计	112	16	128

2.4 BRAF V600E 突变检测、细胞学诊断单独及二者联合的灵敏度及准确度 对于诊断 PTC,BRAF V600E 突变检测和细胞学诊断的灵敏度分别为 86.6%和 83.5%,特异度分别为 80.0%和 90.0%,准确度分别为 86.4%和 83.7%,见表 4。将 BRAF V600E 突变检测和细胞学诊断联合使用后,诊断 PTC 的灵敏度上升至 97.2%,且准确度达到最高(96.5%)。

表 4 BRAF V600E 突变检测、细胞学诊断单独及二者联合的诊断价值[%(*n*/*n*)]

项目	灵敏度	特异度	阳性预测值	阴性预测值	准确度
BRAF V600E 突变检测	86.6(733/846)	80.0(24/30)	99.2(733/739)	17.5(24/137)	86.4(757/876)
细胞学诊断	83.5(706/846)	90.0(27/30)	99.6(706/709)	16.2(27/167)	83.7(733/876)
联合检测	97.2(822/846)	76.7(23/30)	99.2(822/829)	48.9(23/47)	96.5(845/876)

3 讨 论

近年来,PTC 的发病率呈逐年上升趋势,FNA 细胞学诊断以其微创、经济、准确度高的优势成为术前诊断甲状腺结节最常用的方法。本研究中单独使用细胞学诊断的准确度为 83.7%,与文献[11-12]报道一致。然而,由于标本取材不满意、细胞数量偏少、制片过程不当、形态学不典型及病理医师经验的差异等,单独使用细胞学诊断 PTC 仍存在 16.5%的假阴性率和 10.0%的假阳性率。如何正确处理细胞学诊断中无法明确诊断的患者是临床诊治的难点,而分子诊断技术的发展有助于 PTC 的术前诊断,其中与 PTC 关系最密切的分子标志物是 BRAF V600E 突变。BRAF V600E 突变为第 1 799 位点的胸腺嘧啶突变为腺嘌呤,导致第 600 位编码氨基酸由缬氨酸变为谷氨酸,诱导 BRAF 蛋白活化,从而引起 MAPK 信号通路不断激活,细胞无限增殖、分化,最后导致 PTC 的发生、发展^[13]。研究表明,BRAF V600E 突变较少存在于甲状腺滤泡癌和良性病变中,显示出较高的特异度,为 PTC 的诊断提供了新的思路^[14-15]。

本研究中 PTC 患者的 BRAF V600E 突变率高达

86.6%,与国内隋燕霞等^[16]、张亚丽等^[17]的研究结果一致,也与韩国 KIM 等^[18]报道的 81.4%相似。因此,术前检测 BRAF V600E 突变成为除细胞学诊断外的有效方法。对 128 例手术患者的残留物标本与配对术后切除组织的 BRAF V600E 突变检测结果进行比对,具有极好的一致性(*Kappa* = 0.890, *P* < 0.001),证明利用 FNA 残留物可以代替额外进行 FNA 获取的标本、FNA 涂片、细胞块和术后切除组织等,使检测简便、快速,同时也避免了额外进行 FNA、延长操作时间和增加感染、出血等不良反应。

联合 BRAF V600E 突变检测和细胞学诊断后灵敏度由单独细胞学诊断的 83.5%提高至 97.2%,准确度由 83.7%提高至 96.5%,阳性预测值高达 99.2%,与 ZHAO 等^[19]的研究结果相符。目前,临床一般认为 BRAF V600E 突变型的患者有着更高的恶性风险,建议进行甲状腺全切术,而对于 BRAF V600E 野生型的患者仍不能排除 PTC 诊断,但可采取更为经济保守的治疗方式^[2,20]。联合诊断后灵敏度和准确度的提高主要得益于增加了细胞学诊断不确定(AUS/FLUS)患者的 BRAF V600E 突变检出率

(46.7%)。BRAF V600E 突变检测在进行了手术的 AUS/FLUS 患者中的灵敏度为 84.7%，准确度为 84.1%。因此，增加 BRAF V600E 突变检测有助于明确甲状腺结节的良恶性，指导临床制订具体的手术计划，以及减少不必要的检查，如诊断性甲状腺手术、术中冰冻和重复 FNA 等，特别是对于细胞学诊断不确定的患者。

本研究也存在一些不足：首先，术后诊断为良性病变的患者偏少，这可能是由于本研究为回顾性研究，外科医生在选择手术患者时会结合 BRAF V600E 突变检测、细胞学诊断、超声检查及甲状腺触诊结果，仅选择恶性风险高的患者进行手术，以避免不必要的手术。对于未实行甲状腺手术无术后病理诊断结果的患者，还需要进行包含长期超声和 FNA 随访的研究，以进一步证实 BRAF V600E 突变检测的诊断价值。其次，FN/SFN 患者的数量较少，这可能是由于病理医师在出具细胞学诊断结果时比较谨慎，导致 AUS/FLUS 患者的数量更多，而 FN/SFN 患者数量偏少。

综上所述，甲状腺 FNA 残留物标本可用于 BRAF V600E 突变检测，其可以最大限度地利用有限的穿刺液提供更多的诊断 PTC 的依据。BRAF V600E 突变检测联合细胞学诊断可提高 PTC 诊断的灵敏度和准确度。

参考文献

- [1] WILTSHIRE J J, DRAKE T M, UTTLEY L, et al. Systematic review of trends in the incidence rates of thyroid cancer[J]. *Thyroid*, 2016, 26(11): 1541-1552.
- [2] HAUGEN B R, ALEXANDER E K, BIBLE K C, et al. 2015 American thyroid association management guidelines for adult patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer; the American thyroid association guidelines task force on thyroid nodules and differentiated thyroid cancer[J]. *Thyroid*, 2016, 26(1): 1-133.
- [3] LI X Y, LI E L, DU J, et al. BRAF mutation analysis by ARMS-PCR refines thyroid nodule management[J]. *Clin Endocrinol(Oxf)*, 2019, 91(6): 834-841.
- [4] DALQUEN P, RASHED B, HINSCH A, et al. Fine-needle aspiration (FNA) of the thyroid gland: analysis of discrepancies between cytological and histological diagnoses [J]. *Pathologie*, 2016, 37(5): 465-472.
- [5] CIBAS E S, ALI S Z. The 2017 Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology[J]. *J Am Soc Cytopathol*, 2017, 27(11): 1341-1346.
- [6] TAVARES C, MELO M, CAMESELLE-TEIJEIRO J M, et al. Endocrine Tumours; Genetic predictors of thyroid cancer outcome [J]. *Eur J Endocrinol*, 2016, 174 (4): R117-R126.
- [7] KURE S, ISHINO K, KUDO M, et al. Incidence of BRAF V600E mutation in patients with papillary thyroid carcinoma: a single-institution experience[J]. *J Int Med Res*, 2019, 47(11): 5560-5572.

- [8] COLLET J F, LACAVE R, HUGONIN S, et al. BRAF V600E detection in cytological thyroid samples; a key component of the decision tree for surgical treatment of papillary thyroid carcinoma[J]. *Head Neck*, 2016, 38(7): 1017-1021.
- [9] KIM D S, KIM D W, HEO Y J, et al. Utility of including BRAF mutation analysis with ultrasonographic and cytological diagnoses in ultrasonography-guided fine-needle aspiration of thyroid nodules[J]. *PLoS One*, 2018, 13(8): e0202687.
- [10] SHI Q Y, IBRAHIM A, HERBERT K, et al. Detection of BRAF mutations on direct smears of thyroid fine-needle aspirates through cell transfer technique[J]. *Am J Clin Pathol*, 2015, 143(4): 500-504.
- [11] 卢振启, 龚文博, 黑虎, 等. BRAF V600E 基因检测联合细针穿刺活检对甲状腺结节良恶性诊断中的价值[J]. *中国肿瘤临床*, 2019, 46(20): 1036-1039.
- [12] 章美武, 张燕, 范晓翔, 等. 甲状腺细针穿刺细胞学联合 BRAF 基因检测的诊断价值[J]. *介入放射学杂志*, 2017, 26(7): 622-626.
- [13] PRETE A, BORGES DE SOUZA P, CENSI S, et al. Update on fundamental mechanisms of thyroid cancer[J]. *Front Endocrinol*, 2020, 11: 102.
- [14] SU X, JIANG X, XU X, et al. Diagnostic value of BRAF (V600E)-mutation analysis in fine-needle aspiration of thyroid nodules: a Meta-analysis[J]. *Onco Targets Ther*, 2016, 9: 2495-2509.
- [15] ZHAO H, ZHANG Z H, ZHOU B, et al. Detection of BRAF c. 1799T > A (p. V600E) mutation using residual routine fine-needle aspiration specimens of papillary thyroid carcinoma[J]. *Diagn Cytopathol*, 2015, 43(10): 786-790.
- [16] 隋燕霞, 蒋娜, 南鹏飞, 等. 超声引导下 FNAC 联合 BRAFV600E 基因突变检测在甲状腺结节诊断中的意义 [J]. *诊断病理学杂志*, 2020, 27(1): 32-37.
- [17] 张亚丽, 王冬青, 张贺, 等. 大标本评价 BRAF V600E 基因检测在甲状腺细胞学诊断中的价值[J]. *中华病理学杂志*, 2020, 49(2): 186-188.
- [18] KIM S K, LEE J H, WOO J W, et al. Prediction table and nomogram as tools for diagnosis of papillary thyroid carcinoma; combined analysis of ultrasonography, fine-needle aspiration biopsy, and BRAF V600E mutation[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2015, 94(21): e760.
- [19] ZHAO C K, ZHENG J Y, SUN L P, et al. BRAF(V600E) mutation analysis in fine-needle aspiration cytology specimens for diagnosis of thyroid nodules; the influence of false-positive and false-negative results[J]. *Cancer Med*, 2019, 8(12): 5577-5589.
- [20] NIKIFOROV Y E, OHORI N P, HODAK S P, et al. Impact of mutational testing on the diagnosis and management of patients with cytologically indeterminate thyroid nodules: a prospective analysis of 1 056 FNA samples[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, 96(11): 3390-3397.