

超声联合 BRAF V600E 基因检测模型在主动监测甲状腺微小癌侵袭性中的应用

王雨竹¹ 彭梅¹ 姜凡¹ 王圣应² 刘建军² 陶堃³ 杨杨³ 何杰⁴

摘要 目的 建立预测甲状腺微小乳头状癌 (PTMC) 侵袭性的超声联合基因风险评估模型, 为主动监测 PTMC 侵袭性提供理论依据。方法 选取 2017 年 10 月-2021 年 1 月 264 例行手术治疗并经术后病理诊断为 PTMC 的患者。将 2017 年 10 月至 2019 年 4 月收集的 154 例纳入模型组 2019 年 5 月至 2021 年 1 月收集的 110 例纳入验证组。分析模型组 154 例经术后病理证实为 PTMC 患者的临床资料、超声特征及 BRAF V600E 基因结果。采用单因素分析筛选出 PTMC 侵袭性的危险因素, 再将其纳入多因素 Logistic 回归分析, 建立风险预测模型, 并将建立的模型代入验证组 110 例 PTMC 患者评估其诊断效能。结果 多因素分析显示男性、年龄 < 45 岁、微钙化、肿瘤最大径 > 5 mm、超声疑为腺外侵犯、超声疑为淋巴结转移、BRAF V600E 基因突变型为建立模型的危险因素。根据危险因素建立赋分模型, 得分越高则风险越高。在 110 例验证组中评估预测模型预测效能曲线下面积 AUC 为 0.774 (95% CI: 0.685 ~ 0.848) *cut-off* 值为 0.450 2, 灵敏度为 83.3% 特异度为 62.9%。模型具有较好的诊断效能。结论 超声联合 BRAF V600E 基因检测模型对 PTMC 侵袭性有一定的预测能力, 可为临床治疗方案的选择提供参考。

关键词 侵袭性; BRAF V600E 基因; 甲状腺微小乳头状癌
中图分类号 R 736.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)04-0640-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.04.025

甲状腺癌的发病率在全球不断攀升, 其中直径 ≤ 1 cm 的甲状腺微小乳头状癌 (papillary thyroid microcarcinoma, PTMC) 发病率占 50% 以上^[1]。2015 年美国甲状腺协会 (American thyroid association, ATA) 在《成人甲状腺结节和分化型甲状腺癌患者

管理指南》中提出, 对低侵袭性的 PTMC 患者可以考虑采用主动监测代替立即手术治疗^[2]。PTMC 的侵袭性特征有甲状腺腺外侵犯、发生淋巴结转移及远处转移^[3-4]。BRAF 基因突变是甲状腺乳头状癌最常见的基因突变, 而 BRAF 突变以 BRAF V600E 基因突变为主。部分研究^[5]表明, BRAF V600E 基因突变与 PTMC 的侵袭性有一定相关性。该研究旨在通过结合患者临床特征、术前超声检查、BRAF V600E 基因检测, 建立甲状腺结节侵袭性的风险预测模型, 为临床医师术前制定更好的治疗方案提供依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集在中国科学技术大学第一附属医院西区头颈乳腺外科初次行手术治疗, 并经术后病理证实为 PTMC 且符合纳入标准的患者共 264 例, 男 66 例, 女 198 例。将 2017 年 10 月至 2019 年 4 月收集的 154 例 PTMC 患者纳入模型组 2019 年 5 月至 2021 年 1 月收集的 110 例 PTMC 患者纳入验证组。纳入标准: ① 术后病理为单发癌灶; ② 具有完整的超声检查资料、临床资料、BRAF V600E 基因检测; ③ 手术切除范围至少为患侧腺叶切除 + 患侧中央区淋巴结清扫。排除标准: ① 合并其他肿瘤; ② 术前超声检查资料不完整、未做 BRAF V600E 基因检测; ③ 未行淋巴结清扫。

1.2 仪器与方法 超声检查采用 GE Logiq E9 超声诊断仪, L15 探头, 探头频率 6 ~ 15 MHz。检查者取仰卧位, 头部充分后仰暴露颈前区, 做甲状腺两侧叶、峡部的横断面及纵断面滑动扫查。常规超声扫查可发现甲状腺可疑恶性结节, 观察结节位置、测量结节大小、观察结节边缘、微钙化 (直径 ≤ 1 mm)、纵横比、回声及血流分布情况。对颈部淋巴结进行广泛扫查, 观察检出的淋巴结形态、大小、包膜、皮髓质回声以及与周围组织关系, 观察其内部及周边血流分布情况。超声疑为淋巴结转移是指淋巴结中出现团块状高回声或无回声区、点状强回声, 高回声内血流信号丰富。超声疑为腺外侵犯是指结节接触甲状

2022-01-21 接收

基金项目: 安徽省重点研究与开发计划项目 (编号: 201904a07020068)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第二附属医院超声科, 合肥 230601
中国科学技术大学附属第一医院西区² 头颈乳腺外科、
³ 超声科、⁴ 病理科, 合肥 230001

作者简介: 王雨竹, 女, 硕士研究生;
彭梅, 女, 副教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: 13955125956@163.com

腺包膜 >25% 或甲状腺包膜的回声线连续性中断。

BRAF V600E 基因检测: 收集符合标准的石蜡标本, 选择蜡块中间部分, 行 10 μm 切片, 使用武汉友芝公司生产的人类 BRAF 基因 V600E 突变检测试剂盒(PCR-荧光探针法)进行 BRAF V600E 突变检测, 利用实时荧光 PCR 原理, 针对 BRAF 基因第 1799 位核苷酸上 V600E 突变进行定性检测。严格按照使用说明书操作, 待反应结束分析收集到的荧光信号, 在阴性、阳性对照、内部质量控制均在合适范围的前提下, 600Glu PCR 反应液管突变检测 Ct 值 ≥38 或无 Ct 值, 样本为阴性; 600Glu PCR 反应液管突变检测 Ct 值 <38, 则计算该反应管的 ΔCt 值。若该反应管的 ΔCt 值小于 9, 则样本为 600 Glu 的突变阳性; 反之则为突变阴性。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 25.0、MedCalc 19.0 进行统计分析。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较行 *t* 检验; 计数资料以例数 (*n*) 和率 (%) 表示, 比较使用 χ^2 检验。筛选出 PTMC 侵袭性的独立危险因素, 将其纳入二元 Logistic 回归模型进行多因素分析, 绘制受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC 曲线) 评估危险因素对 PTMC 侵袭性的预测效能。模型的回归系数采用 Wald 检验, 拟合优度评估采用 Hosmer-Lemeshow 检验。将建立的模型代入 110 例验证组, 以术后病理作为“金标准”进行验证。绘制 ROC 曲线, 计算 ROC 曲线下面积, 评估模型的预测能力。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 模型组单因素分析结果 模型组 154 例 PTMC 患者中男 36 例, 女 118 例。对临床及超声特征进行单因素分析, 结果显示, 患者性别 (*P* = 0.003)、年龄 (*P* = 0.005)、肿瘤最大径 (*P* = 0.001)、微钙化 (*P* = 0.001)、超声疑为腺外侵犯 (*P* < 0.001)、超声疑为淋巴结转移 (*P* = 0.012)、BRAF V600E 基因突变 (*P* = 0.019) 均与 PTMC 的侵袭性有关, 差异均有统计学意义 (*P* < 0.05)。见表 1。

2.2 模型组多因素 Logistic 回归分析 将表 1 中有统计学意义的相关因素纳入多因素 Logistic 回归分析, 结果显示患者性别、年龄、肿瘤最大径、微钙化、超声疑为腺外侵犯、超声疑为淋巴结转移、BRAF V600E 基因突变均是 PTMC 的侵袭性的危险因素。见表 2。

表 1 单因素分析 PTMC 患者侵袭性的相关因素

相关因素	侵袭组 (<i>n</i> = 74)	非侵袭组 (<i>n</i> = 80)	χ^2/t 值	<i>P</i> 值
性别				
男	25(69.4)	11(30.6)	8.614	0.003
女	49(41.5)	69(58.5)		
年龄(岁)				
<45	49(58.3)	35(41.7)	7.826	0.005
≥45	25(35.7)	45(64.3)		
合并桥本甲状腺炎				
是	27(54.0)	23(46.0)	1.049	0.306
否	47(45.2)	57(54.8)		
肿瘤位置				
上极	10(50.0)	10(50.0)	1.026	0.795
中部	48(45.7)	57(54.3)		
下极	14(53.8)	12(46.2)		
峡部	2(66.7)	1(33.3)		
肿瘤最大径(mm)				
>5	64(56.1)	50(43.9)	11.503	0.001
≤5	10(25.0)	30(75.0)		
纵横比				
≥1	26(48.1)	28(51.9)	0.000	0.986
<1	48(48.0)	52(52.0)		
边缘				
光整	12(36.4)	21(63.6)	2.299	0.129
不光整	62(51.2)	59(48.8)		
边界				
清晰	6(30.0)	14(70.0)	3.001	0.083
欠清	68(50.7)	66(49.3)		
微钙化				
有	62(56.9)	47(43.1)	11.648	0.001
无	12(26.7)	33(73.3)		
内部血流信号				
有	61(50.4)	60(49.6)	1.261	0.261
无	13(39.4)	20(60.6)		
超声疑为腺外侵犯				
是	20(80.0)	5(20.0)	12.203	0.000
否	54(41.9)	75(58.1)		
超声疑为淋巴结转移				
是	25(65.8)	13(34.2)	6.358	0.012
否	49(42.2)	67(57.8)		
BRAF V600E 基因				
野生型	12(31.6)	26(68.4)	5.484	0.019
突变型	62(53.4)	54(46.6)		

表 2 多因素 Logistic 分析结果

危险因素	β	标准误	Wald 值	OR(95% 置信区间)	<i>P</i> 值
性别	0.960	0.482	3.970	2.611(1.016~6.714)	0.046
年龄	0.857	0.412	4.328	2.356(1.051~5.282)	0.037
微钙化	1.044	0.452	5.324	2.840(1.170~6.891)	0.021
肿瘤最大径	1.186	0.497	5.689	3.275(1.236~8.680)	0.017
超声疑为腺外侵犯	1.355	0.617	4.824	3.878(1.157~12.998)	0.028
超声疑为淋巴结转移	1.469	0.494	8.860	4.345(1.652~11.433)	0.003
BRAF V600E 基因	1.599	0.512	9.764	4.950(1.815~13.497)	0.002
常量	-4.200	0.836	25.243	0.015	0.000

2.3 模型组 ROC 曲线 以侵袭性为纵坐标,分别以超声指标(肿瘤最大径、微钙化、超声疑为腺外侵犯、超声疑为淋巴结转移)、BRAF V600E 基因、患者临床特征(性别、年龄)、超声指标联合临床特征、BRAF V600E 基因联合临床特征、超声指标联合 BRAF V600E 基因以及三者联合为横坐标,绘制 ROC 曲线评估其对 PTMC 侵袭性的预测效能(图 1),其曲线下面积 AUC 分别为 0.754 (95% CI: 0.678 ~ 0.831)、0.581 (95% CI: 0.491 ~ 0.671)、0.677 (95% CI: 0.592 ~ 0.762)、0.795 (95% CI: 0.725 ~ 0.864)、0.694 (95% CI: 0.612 ~ 0.776)、0.780 (95% CI: 0.709 ~ 0.852)、0.813 (95% CI: 0.747 ~ 0.879)。其中三者联合为横坐标所绘制的 AUC 为 0.813(95% CI: 0.747 ~ 0.879),高于其他指标。超声指标联合 BRAF V600E 检测及患者临床特征对 PTMC 患者侵袭性预测效能最好。

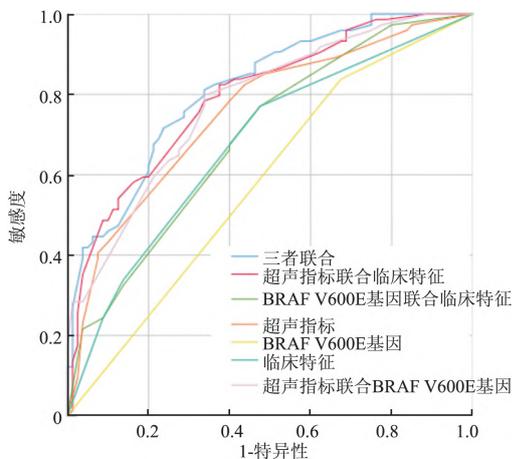


图 1 模型组各指标预测效能

2.4 构建风险预测模型 以患者临床特征、超声指标、BRAF V600E 基因检测为危险因素构建风险预测模型。将各危险因素进行分类,指定每组的参考值 W_{ij} ,选择合适的分组作为基础风险参考值 W_{iREF} ,记为 0 分。结合回归系数 β_i ,以及各组参考值 W_{ij} ,计算各组与 W_{iREF} 之间的距离 D 。设定常数 B 为 1,计算危险因素每个分类所对应的分值,数值四舍五入取整数,结果见表 3。根据结果,将每个危险因素的分值加起来计算总分,范围为:0 ~ 8 分。

再根据多因素 Logistic 回归方程,计算每一分值对应的风险预测概率值。计算公式如下: $P = \frac{1}{1 + \exp(-\sum_{i=0}^p \beta_i X_i)}$,其中 $\sum_{i=0}^p \beta_i X_i \approx$ 常数项 + $\beta_i \times W_{ij} + B \times$ 总分

表 3 危险因素赋分

危险因素	风险赋值 $\beta_i W_{ij}$	$D = (W_{ij} - W_{iREF}) \times \beta_i$	$Points_{ij} = D/B = (W_{ij} - W_{iREF}) \times \beta_i / B$
性别			
女	0 = W_{iREF}	0	0
男	1	0.960	1
年龄(岁)			
≥45	0 = W_{iREF}	0	0
<45	1	0.857	1
微钙化			
无	0 = W_{iREF}	0	0
有	1	1.044	1
肿瘤最大径(mm)			
≤5	0 = W_{iREF}	0	0
>5	1	1.186	1
超声疑为腺外侵犯			
否	0 = W_{iREF}	0	0
是	1	1.355	1
超声疑为淋巴结转移			
否	0 = W_{iREF}	0	0
是	1	1.469	1
BRAF V600E 基因			
野生型	0 = W_{iREF}	0	0
突变型	1	1.599	2

在本研究中, $\sum_{i=0}^p \beta_i X_i \approx -4.200 + 0.960 \times 0 + 0.857 \times 0 + 1.044 \times 0 + 1.186 \times 0 + 1.355 \times 0 + 1.469 \times 0 + 1.599 \times 0 + 0.521 \times$ 总分 = $-4.200 + 1 \times$ 总分。由此可以计算出总分与风险预测概率的对应表,见表 4。

同时 Hosmer-Lemeshow 检验结果提示 $P = 0.663$,确定系数 $\chi^2 = 5.861$ 。说明模型拟合优度好,预测结果准确可靠。

表 4 风险预测概率表

总分	风险预测概率
0	0.014 8
1	0.039 1
2	0.099 8
3	0.231 4
4	0.450 1
5	0.690 0
6	0.858 1
7	0.942 7
8	0.978 1

2.5 验证组 ROC 曲线 验证组共纳入经病理证实为 PTMC 的患者 110 例,其中男性 30 例,女性 80 例,26 ~ 68 (42.4 ± 10.3) 岁。将患者数据代入预测模型,计算风险预测概率,以术后病理结果作为金标准,绘制 ROC 曲线(图 2)。所得 AUC 为 0.774

(95% CI: 0.685 ~ 0.848) cut-off 值为 0.450 2, 灵敏度为 83.3%, 特异性为 62.9%, 模型具有较好的诊断效能。 cut-off 值为 0.450 2, 以总分 ≥ 5 分为预测患者甲状腺结节有侵袭性可能。图 3 所示为一位甲状腺微小乳头状癌伴颈部淋巴结转移患者的超声图像。患者男性, 36 岁, 肿瘤最大径 8 mm, 无微钙化, 结节外周区域甲状腺包膜线连续性中断, 颈部 VI 区淋巴结内见液性暗区, BRAF V600E 基因检测为突变型。预测模型计算侵袭性的风险为 94.3%, 预测为有侵袭性, 与病理结果相符。

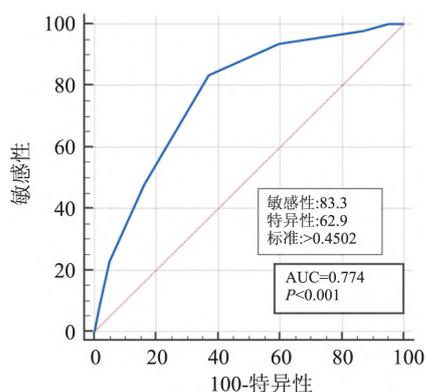


图 2 预测模型在验证组中的预测效能

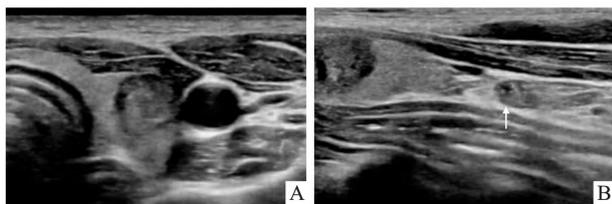


图 3 甲状腺微小乳头状癌伴颈部淋巴结转移的超声图像

A: 甲状腺横切面图; B 颈部 VI 区淋巴结(箭头所示淋巴结内见液性暗区)

3 讨论

PTMC 一般生物学行为温和, 一部分患者可能终生不表现出临床症状。越来越多的观点认为对于低侵袭性的 PTMC, 可采取主动监测的方法来代替手术切除^[2, 6-7]。多项研究^[8]表明, 对于主动监测期间有肿瘤生长或淋巴结转移的患者, 补救手术有良好的效果和预后, 同时主动监测组患者的术后并发症及医疗费用明显减少。但部分病例具有侵袭性, 原发灶常侵出甲状腺包膜, 侵犯周围组织, 淋巴结转移较早且范围广, 发生远处转移, 患者的生存率和预后不佳。因此, 对于 PTMC 侵袭性的预测能为临床选择合适的治疗方案提供帮助。

研究^[9]表明男性、年龄 < 45 岁是 PTMC 患者侵袭性的危险因素, 本研究中女性: 男性为 3: 1, OR 值为 2.611, 年龄 < 45 岁 OR 值为 2.356, 同样验证了这一点。微钙化反应出的是病理中砂砾体, 是钙化的一种特殊类型, 主要是肿瘤生长迅速、血供不足、细胞凋亡, 使癌组织内局部形成钙磷沉积微环境, 形成微钙化。多项研究^[10-11]表明微钙化对甲状腺良恶性结节的定性诊断有重要意义, 超声发现微钙化时往往提示为恶性结节。王猛等^[12]通过对 575 例 PTMC 患者的超声特征与颈部淋巴结转移的相关性分析, 认为微钙化是 PTMC 患者颈部淋巴结转移的危险因素, 本研究结果与之一致。一般认为肿瘤最大径越大, 其发生侵袭性行为的风险就越高。肿瘤最大径被认为是影响 PTMC 进展的独立危险因素, 本研究表明肿瘤最大径 > 5 mm 是 PTMC 患者侵袭性的独立危险因素, 该结论与 Cheng et al^[13]的研究是相吻合的。近年来, 应用分子生物学有望解决一些甲状腺组织诊断难的问题。BRAF V600E 基因突变是甲状腺乳头状癌最常见的基因突变类型。研究^[14]显示 BRAF 基因突变与 PTMC 的侵袭性密切相关, 本研究表明 BRAF V600E 基因突变型的患者出现侵袭性行为的风险更大。

以上各因素需综合分析, 因此本研究对于每个危险因素, 选择一个合适的分组作为基础风险参考值, 计算出预测模型, 并将模型带入 110 例验证组中评估, 以总分 ≥ 5 分为预测患者甲状腺结节有侵袭性分数, 所得 AUC 为 0.774 (95% CI: 0.685 ~ 0.848) cut-off 值为 0.450 2, 模型具有较好的诊断效能。本研究也存在一些局限性。PTMC 中存在多种分子标志物, 但本研究并未分析其他分子标志物与 PTMC 患者不良预后之间的关系, 也缺乏未手术的长期观察结果。对 PTMC 侵袭性的预测还需要大样本、多中心、前瞻性研究的证实。

参考文献

- [1] Lim H, Devesa S S, Sosa J A, et al. Trends in thyroid cancer incidence and mortality in the United States, 1974 - 2013 [J]. JAMA, 2017, 317(13): 1338 - 48.
- [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] Paparodis R D, Bantouna D, Imam S, et al. The non-interventional approach to papillary thyroid microcarcinomas. An "active surveillance" dilemma [J]. Surg Oncol 2019 29: 113 - 7.

- [4] Sugitani I, Ito Y, Miyauchi A, et al. Active surveillance versus immediate surgery: Questionnaire survey on the current treatment strategy for adult patients with low-risk papillary thyroid microcarcinoma in Japan [J]. *Thyroid* 2019, 29(11): 1563–71.
- [5] 薛金才, 刘勤江, 田尤新, 等. BRAF ~ (V600E) 及 TERT 启动子突变在甲状腺微小乳头状癌风险评估中的价值 [J]. *中国癌症杂志* 2018, 28(5): 335–41.
- [6] Ito Y, Miyauchi A, Oda H. Low-risk papillary microcarcinoma of the thyroid: A review of active surveillance trials [J]. *Eur J Surg Oncol* 2018, 44(3): 307–15.
- [7] Haser G C, Tuttle R M, Su H K, et al. Active surveillance for papillary thyroid microcarcinoma: New challenges and opportunities for the health care system [J]. *Endocr Pract* 2016, 22(5): 602–11.
- [8] Oh H S, Ha J, Kim H I, et al. Active surveillance of low-risk papillary thyroid microcarcinoma: A multi-center cohort study in Korea [J]. *Thyroid* 2018, 28(12): 1587–94.
- [9] 彭琛, 魏松峰, 郑向前, 等. 1401 例甲状腺微小乳头状癌临床病理特征及中央区淋巴结转移危险因素分析 [J]. *中国肿瘤临床* 2016, 43(3): 95–9.
- [10] 李建聪, 梁荣华, 吴堂珍. 甲状腺钙化病灶在鉴别甲状腺良恶性结节中的作用 [J]. *世界最新医学信息文摘* 2017, 17(35): 15–6.
- [11] 杜丹丹, 李小虎, 刘斌, 等. CT 影像组学对甲状腺腺瘤及乳头状癌的诊断价值 [J]. *安徽医科大学学报* 2019, 54(6): 950–3.
- [12] 王猛, 魏玺, 张晟, 等. 甲状腺微小乳头状癌超声特征与颈部淋巴结转移的相关性探讨 [J]. *中华普通外科杂志* 2018, 33(4): 293–7.
- [13] Cheng F, Chen Y, Zhu L, et al. Risk factors for cervical lymph node metastasis of papillary thyroid microcarcinoma: A single-center retrospective study [J]. *Int J Endocrinol*, 2019, 2019: 8579828.
- [14] 刘威, 彭梅, 姜凡, 等. 超声检查联合基因及血清检测预测甲状腺微小乳头状癌的侵袭性 [J]. *中国超声医学杂志*, 2020, 36(12): 1071–4.

Application of ultrasound combined with BRAF V600E gene detection model in proactively detecting the aggressiveness of thyroid microcarcinoma

Wang Yuzhu¹, Peng Mei¹, Jiang Fan¹, Wang Shengying², Liu Jianjun², Tao Kun³, Yang Yang³, He Jie⁴

(¹Dept of Ultrasound, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601;

²Dept of Head and Neck, ³Dept of Ultrasound, ⁴Dept of Pathology, The First Affiliated Hospital of USTC West District, Hefei 230001)

Abstract Objective To establish an assessment model for predicting the aggressiveness of papillary thyroid microcarcinoma (PTMC) and to provide a theoretical basis for actively monitoring the same. **Methods** 264 PTMC patients were included from October 2017 to January 2021. All patients were confirmed by postoperative pathology. 154 cases collected from October 2017 to April 2019 were included in the model group while 110 cases collected from May 2019 to January 2021 were included in the validation group. We analyzed the clinical data, ultrasound characteristics, and BRAF V600E gene status of 154 patients in the model group with confirmed PTMC based on pathological examination. Single factor regression was used to screen out risk factors for PTMC invasion, and these factors were then included in a multivariate logistic regression analysis to establish a risk prediction model; the established model was used to evaluate the diagnostic efficacy of 110 PTMC patients in the validation group. **Results**

Multivariate analysis showed that male sex, age < 45 years, microcalcification, tumor diameter > 5 mm, suspected extraglandular invasion and lymph node metastasis on ultrasound, and BRAF V600E gene mutation were all risk factors for PTMC invasion. A scoring model was established according to risk factors, and the higher the score, the higher the risk. In the 110-case verification group, the area under the predictive performance curve of the evaluation prediction model was 0.774 (95% CI: 0.685–0.848), the cut-off value was 0.4502, the sensitivity was 83.3%, and the specificity was 62.9%. The model therefore had good diagnostic efficacy. **Conclusion** Ultrasound combined with BRAF V600E gene detection model can predict the aggressiveness of PTMC to a certain extent, which can provide reference for the selection of clinical treatment options.

Key words aggressiveness; BRAF V600E gene; papillary thyroid microcarcinoma