·临床研究·

甲状腺乳头状癌突变等位基因肿瘤异质性的临床及其与预后相关性研究

陈思远　胡夏荣　谢楚平

【摘要】 目的　探讨突变等位基因肿瘤异质性 (MATH) 在甲状腺乳头状癌（PTC）中的临床意义。**方法**　从癌症基因图谱公共数据集下载并预处理 PTC 肿瘤测序数据及临床资料数据，分析 MATH 与 PTC 临床病理特征的相关性，使用 Kaplan-Meier 法进行生存分析，验证 MATH 对 PTC 患者的预后价值。**结果**　PTC 患者中 MATH 值为 2.57~93.72，平均 29.45±16.19；将≥ 29.45 者纳入高 MATH 组，< 29.45 者纳入低 MATH 组。高 MATH 组与低 MATH 组的患者年龄、性别、临床分期、BRAF 基因型差异无统计学意义（$P > 0.05$）。MATH 不是 PTC 患者总体生存期（OS）的显著预测因素（$P=0.4595$）；在 BRAF 突变型 PTC 患者中，高 MATH 者的 OS 低于低 MATH 者（$P=0.0252$），而在 BRAF 野生型 PTC 患者中，高 MATH 者的 OS 高于低 MATH 者（$P=0.0495$）。**结论**　MATH 可在 BRAF 突变型和野生型亚组中可预测 PTC 患者的预后及指导临床治疗。

【关键词】 突变；　等位基因；　肿瘤异质性；　甲状腺肿瘤；　BRAF 基因型；　总体生存期

Clinical and prognostic significance of mutant-allele tumor heterogeneity in thyroid papillary carcinoma

Chen Siyuan, Hu Xiarong, Xie Chuping. The First Department of General Surgery, Dongguan People's Hospital, Dongguan 523059, China

Corresponding author: Xie Chuping, Email: 13712029688@163.com

【Abstract】 Objective　To investigate the clinical significance of mutant-allele tumor heterogeneity (MATH) levels in papillary thyroid carcinoma (PTC). **Methods**　The sequencing data and clinical data of PTC were downloaded from the public data sets of The Cancer Genome Atlas (TCGA) and preprocessed. The correlation between MATH and clinicopathological features of PTC was analyzed. Kaplan-Meier survival analysis was used to verify the prognostic value of MATH in patients with PTC. **Results**　MATH scores ranged from 2.57 to 93.72 in PTC patients, with an average of 29.45±16.19. The patients with an MATH score ≥ 29.45 were assigned to a high-MATH group, and those with an MATH score < 29.45 were assigned to a low-MATH group. There was no significant difference in age, gender, tumor stage and BRAF genotype between the high-MATH group and low-MATH group ($P > 0.05$). MATH was not a significant predictor of overall survival (OS) in patients with PTC ($P=0.4595$). Whereas in PTC patients with BRAF mutation, the OS in patients with a high MATH score was significantly worse than that in patients with a low MATH score ($P=0.0252$). In PTC patients with wild-type BRAF, the OS was significantly better in patients with a high MATH score than in those with a low MATH ($P=0.0495$). **Conclusion**　MATH can predict the prognosis of PTC patients with wild type or mutant BRAF, which can be used to guide clinical treatment.

【Key words】 Mutation;　Alleles;　Tumor heterogeneity;　Thyroid neoplasms;　BRAF genotype;　Overall survival

甲状腺乳头状癌（papillary thyroid carcinoma，PTC）约占甲状腺恶性肿瘤的 80%[1]，PTC 是最常见的内分泌系统肿瘤之一[2]，亦是近 30 年发生率增长最快的恶性肿瘤[3]。PTC 预后良好，远处转移率较低，全基因组测序技术显示这可能与其基因异质性相对较低有关[4]。但部分高危患者易发生转移、复发甚至死亡[5-6]，故寻找预后判断指标用于识别预后较差的甲状腺癌患者至关重要。目前

DOI：10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2019.11.007

作者单位：523059　东莞市人民医院普外科一区

通信作者：谢楚平，Email：13712029688@163.com

甲状腺癌分子标志物检测正在逐步进入临床，如 BRAF 突变、RAS 突变、RET/PTC 和 PAX8/PPAR 基因融合、TERT 启动子突变、STRN/ALK 基因融合等，然而单个基因改变仍无法准确判断预后[7-11]。本研究应用癌症基因图谱（the cancer genome atlas，TCGA）公共数据集[12]，探讨突变等位基因肿瘤异质性（mutant-allele tumor heterogeneity，MATH）在甲状腺乳头状癌的临床预测价值。

资料与方法

一、数据收集

2018 年 12 月从 TCGA 数据库（https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/）下载并预处理 PTC 测序数据集，同时下载临床资料数据，进行临床病理相关性分析和预后分析，分期使用分化型甲状腺癌 UICC 第七版。

二、数据集的筛选

对下载的 TCGA PTC 数据集根据可否获取Ⅲ级 WES 数据行 MATH 分析及临床数据筛选，剔除无法分级及临床病理参数不详或不完整的病例以及缺乏预后随访资料的病例，选取可进行异质性分析、同时包含完整临床参数和生存资料的 352 例患者。

三、统计学分析

使用 R 语言 3.53 版本 maftools R 包进行 MATH 计算：（1）计算每个位点的突变等位基因分数（mutation annotation format，MAF），作为突变体读取量与总读取量的比值；（2）从 MAF 中位数中求出每个 MAF 的绝对差异，将这些绝对值的中位数乘以 1.4826，从而生成中位绝对偏差（median absolute deviation，MAD）；（3）MATH=100×MAD/中位数。MATH 可有效代表肿瘤特异性突变位点 MAF 值的分布偏差，即 MAF 偏离该样本的 MAF 整体分布程度，MATH 值越大，则肿瘤异质性越高[13]。

高 MATH 组与低 MATH 组的临床指标比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法；用 survival、survminer 包行 Kaplan-Meier 生存分析。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结　果

一、PTC 患者 MATH 值分布

352 例患者中，MATH 为 2.57~93.72，平均 29.45±16.19，MATH 值的分布见图 1。选取 MATH=29.45 为界值，≥ 29.45 纳入高 MATH 组，认为肿瘤异质性较高；< 29.45 纳入低 MATH 组，认为肿瘤异质性较低。高 MATH 组 147 例、低 MATH 组 205 例。

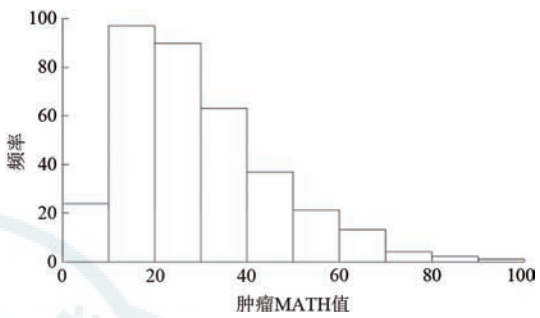

图 1　甲状腺乳头状癌突变等位基因肿瘤异质性值的分布

二、2 组临床病理指标的比较

高 MATH 组与低 MATH 组年龄、性别、临床分期、BRAF 基因型差异均无统计学意义（$P > 0.05$，表 1）。

三、MATH 与 PTC 患者预后的相关性

Kaplan-Meier 生存分析示，MATH 值不是 PTC 患者总体生存期（overall survival，OS）的显著预测因素（P=0.4595，图 2）。在 TCGA 数据集中最常见单基因突变为 BRAF 突变（突变率为 63.6%），其次为 TRET 启动子突变（突变率为 9.4%）；由于 TRET 启动子突变患者数量较少，故仅选取 BRAF 突变型、野生型行亚组分析，BRAF 基因型对 PTC 患者的生存率无显著影响（P=0.9364，图 3）。在 BRAF 突变型 PTC 患者中，高 MATH 者的 OS 低于低 MATH 者（P=0.0252，图 4），而在 BRAF 野生型 PTC 患者中，高 MATH 者的 OS 高于低 MATH 者（P=0.0495，图 5）。

讨　论

肿瘤异质性可分为肿瘤间异质性和肿瘤内异质性，前者指不同肿瘤细胞间的基因与表型不同，而常见关于肿瘤异质性的研究是指肿瘤内异质性（intra-tumor heterogeneity，ITH）。ITH 是指在同一肿瘤内以及在特定原发肿瘤与其转移之间存在不同的遗传、表型或行为特征的癌细胞亚群[14]。肿瘤内癌细胞间的差异在疾病进展、转移和治疗耐药中具有重要意义，异质性肿瘤更有可能发展成具有耐药性或转移性的亚群。研究[15]证明，特定组织

表 1　2 组甲状腺乳头状癌患者临床病理特征比较

	例数	年龄		性别		临床分期				BRAF 基因型	
		＜ 45 岁	≥ 45 岁	男	女	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	野生型	突变型
高 MATH 组	147	63	84	36	111	83	17	37	10	55	92
低 MATH 组	205	80	125	57	148	99	23	50	33	73	132
χ^2 值		0.521		0.484		7.19				0.121	
P 值		0.47		0.487		0.066				0.728	

注：MATH：突变等位基因肿瘤异质性

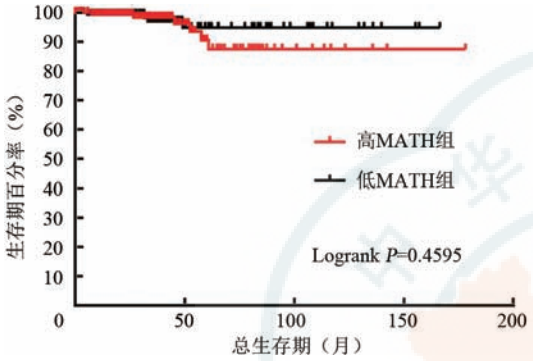

图 2　突变等位基因肿瘤异质性值与甲状腺乳头状癌患者预后的关系

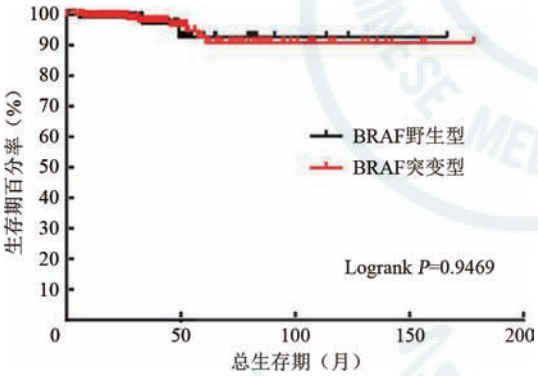

图 3　BRAF 基因型与甲状腺乳头状癌患者预后的关系

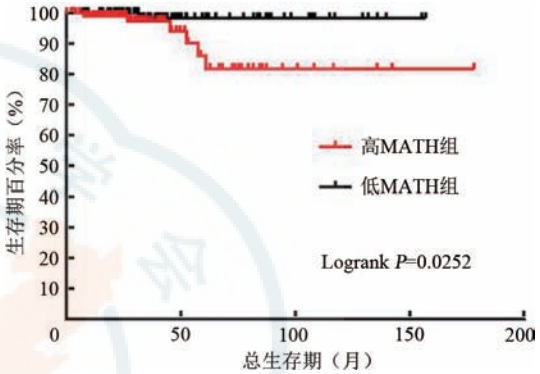

图 4　BRAF 突变型甲状腺乳头状癌患者中突变等位基因肿瘤异质性值与预后的关系

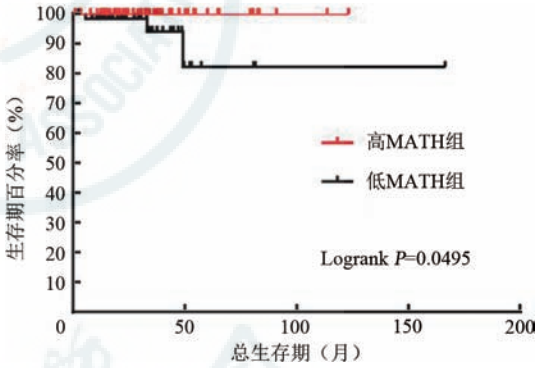

图 5　BRAF 野生型甲状腺乳头状癌患者中突变等位基因肿瘤异质性值与预后的关系

学类型的异质性可存在于多灶性 PTC，同时在分子水平上，PTC 肿瘤内亦存在异质性。随着 PTC 的不断进展，其癌细胞分裂后的子代细胞呈现出与同代细胞或者父细胞的不同，最终导致肿瘤的生长、侵袭、预后等指标的差异[16]。MATH 来源于肿瘤的全外显子测序数据（whole-exome sequencing，WES），已被证明是一种简单、定量和普遍适用的评估 ITH 程度的方法[16]。多项研究[17-19]表明，在头颈部鳞癌、乳腺癌中异质性的程度可以作为临床上有用的生物标记。然而，MATH 可否评估甲状腺乳头状癌患者的预后，目前尚缺乏研究。

本研究中采用 R 语言 maftools 数据包提供的 MATH 数学算法和从 PTC TCGA 数据集中获得的公共数据，探讨了 MATH 预测 PTC 预后的潜在临床意义，证实 MATH 可在 BRAF 突变型和野生型亚组中可预测 PTC 患者的预后。

目前 PTC 中常见的分子改变为 BRAF、TERT 突变。BRAF 基因编码蛋白激酶依赖性激酶，常见突变为 BRAF V600E，该突变持续激活 BRAF 激酶，造成 MAPK 通路持续活化，细胞无限分裂、增殖，肿瘤形成。目前报道[20-23]在 PTC 中 BRAF 突变率为 40%~60%。端粒酶反转录酶（telomerase

reverse transeriptase，TERT）突变将启动子活性提高了 2~4 倍，其可通过维持端粒长度使增殖癌细胞无限增殖，导致 PTC 发生。目前 TERT 启动子突变的发生率约为 10%[24-26]，在出现远处转移病例或低分化癌中更常见。

分子标记物在 PTC 预后中的作用一直是争论焦点，单基因突变或联合多基因突变已被多项研究用于预测 PTC 的预后，但结果仍存在争议。仅考虑单基因突变的研究中，Tufano 等[20-21, 27]认为存在 BRAF 突变的 PTC 患者预后更差，而 Shen 等[7, 23, 28]则认为 BRAF 突变与肿瘤多中心性、淋巴血管侵犯、淋巴结外扩张、远处转移无明显相关性，突变并不影响预后。同时在目前热门的 TERT 启动子突变中也存在类似的结果，Kim 等[25-26, 29]认为 TERT 启动子突变与 PTC 远处转移、复发及死亡率的增加相关，而 She 等[7, 27, 30]研究则认为该突变与临床特征无关或并不能导致更差的临床预后。多基因预测模型中，BRAF 突变、TERT 启动子突变成为近期研究热点，二重突变发生率约 10%，与单纯携带 BRAF 或 TERT 启动子突变的 PTC 相比，同时伴有 BRAF 和 TERT 启动子突变者具有更强的肿瘤侵袭性，BRAF 和 TERT 启动子突变组合可将 PTC 分为 4 个不同的危险组，即疾病特异性死亡风险顺序为 BRAF 突变、TERT 启动子突变“二重奏”＞TERT 启动子突变 =BRAF 突变＞无突变[7, 10, 30-31]。无常见基因突变者约占 PTC 患者的 30%~40%，对其分子风险评估目前缺少进一步研究，而 BRAF 突变患者中是否存在高复发风险的亚群目前也缺乏分析。

本研究使用的 MATH 数学算法是肿瘤内异质性的一种直观测量方法，利用肿瘤细胞基因组上不同的亚群导致突变基因座在显示突变等位基因的序列片段读取方面的差异计算 ITH。与常见的异质性研究中广泛使用的肿瘤微切割或单细胞分析相比，数学在常规应用中具有独特的优势组合，无需新鲜组织，只需对肿瘤和配对的正常组织 DNA 进行二代测序；同时 MATH 数学算法代表了肿瘤中多个细胞群的结果，避免了直接识别或描述细胞亚群的困难[14, 17]。ITH 反映了基因组的不稳定性，因此当发现高 MATH 值的 BRAF 突变型 PTC 患者预后更差。而在 BRAF 野生型患者中，高 MATH 者的 OS 反而优于低 MATH 者。同样利用 TGCA 数据集进行分析，Yoo 等[32]根据基因表达图谱将 PTC 分为非 BRAF/RAS 型（Non–BRAF–Non–RAS，NBNR）、类 BRAF 型、类 RAS 型 3 大亚型，类 BRAF 型中常见染色体拷贝数扩增，其他类型中则存在较多的染色体拷贝数缺失。染色体拷贝数扩增常见于甲状腺癌较高危组，染色体拷贝数缺失常见于甲状腺癌低危组[33]，高 MATH 是否反应染色体缺失片段较多导致较好的预后仍待进一步探讨。

本研究是采用 TCGA 数据库提供的全外显子测序数据进行的分析，纳入的样本量大，临床资料客观完整，具有一定的可信度，但仍存在以下局限性：（1）由于 PTC 预期生存期较长，TCGA 数据库中生存数据仍欠完善；（2）未对体细胞拷贝数改变与 ITH 之间的关系、高 MATH 组中基因表达的差异进行进一步的分析，后续研究将探索与 ITH 相关的分子特征，可能会为 PTC 中肿瘤异质性的规律提供线索。

参 考 文 献

1 Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.

2 杨雷 , 郑荣寿 , 王宁 . 2010 年中国甲状腺癌发病与死亡情况 [J]. 中华预防医学杂志 , 2014, 48(8): 663-668.

3 俞敏 , 龚巍巍 , 罗胜兰 . 甲状腺癌的流行现况及其危险因素 [J]. 中国预防医学杂志 , 2013, (4): 317-322.

4 Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes [J]. Nature, 2013, 499(7457): 214-218.

5 Leite AKN, Cavalheiro BG, Kulcsar MA, et al. Deaths related to differentiated thyroid cancer: a rare but real event [J]. Arch Endocrinol Metab, 2017, 61(3): 222-227.

6 Robenshtok E, Nachalon Y, Benbassat C, et al. Disease severity at presentation in patients with disease-related mortality from differentiated thyroid cancer: implications for the 2015 ATA Guidelines [J]. Thyroid, 2017, 27(9): 1171-1176.

7 Shen X, Liu R, Xing M. A six-genotype genetic prognostic model for papillary thyroid cancer [J]. Endocr Relat Cancer, 2017, 24(1): 41-52.

8 Song YS, Park YJ. Genomic characterization of differentiated thyroid carcinoma [J]. Endocrinol Metab (Seoul), 2019, 34(1): 1-10.

9 Colombo C, Muzza M, Proverbio MC, et al. Impact of mutation density and heterogeneity on papillary thyroid cancer clinical features and remission probability [J]. Thyroid, 2019, 29(2): 237-251.

10 Liu R, Bishop J, Zhu G, et al. Mortality risk stratification by combining BRAF V600E and TERT promoter mutations in papillary thyroid cancer: genetic duet of BRAF and TERT promoter mutations in thyroid cancer mortality [J]. JAMA Oncol, 2017, 3(2): 202-208.

11 Bournaud C, Descotes F, Decaussin-Petrucci M, et al. TERT promoter mutations identify a high-risk group in metastasis-free advanced thyroid carcinoma [J]. Eur J Cancer, 2019, 108: 41-49.

12 Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma [J]. Cell, 2014, 159(3):

676-690.
13 Mayakonda A, Lin DC, Assenov Y, et al. Maftools: efficient and comprehensive analysis of somatic variants in cancer [J]. Genome Res, 2018, 28(11): 1747-1756.
14 Chmielik E, Rusinek D, Oczko-Wojciechowska M, et al. Heterogeneity of thyroid cancer [J]. Pathobiology, 2018, 85(1-2): 117-129.
15 Schopper HK, Stence A, Ma D, et al. Single thyroid tumour showing multiple differentiated morphological patterns and intramorphological molecular genetic heterogeneity [J]. J Clin Pathol, 2017, 70(2): 116-119.
16 Mroz EA, Rocco JW. MATH, a novel measure of intratumorV genetic heterogeneity, is high in poor-outcome classes of head and neck squamous cell carcinoma [J]. Oral Oncol, 2013, 49(3): 211-215.
17 Ma D, Jiang YZ, Liu XY, et al. Clinical and molecular relevance of mutant-allele tumor heterogeneity in breast cancer [J]. Breast Cancer Res Treat, 2017, 162(1): 39-48.
18 Pereira B, Chin SF, Rueda OM, et al. Erratum: The somatic mutation profiles of 2, 433 breast cancers refine their genomic and transcriptomic landscapes [J]. Nat Commun, 2016, 7: 11908.
19 Mroz EA, Tward AD, Pickering CR, et al. High intratumor genetic heterogeneity is related to worse outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma [J]. Cancer, 2013, 119(16): 3034-3042.
20 Tufano RP, Teixeira GV, Bishop J, et al. BRAF mutation in papillary thyroid cancer and its value in tailoring initial treatment: a systematic review and meta-analysis [J]. Medicine (Baltimore), 2012, 91(5): 274-286.
21 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.
22 Colombo C, Muzza M, Proverbio MC, et al. Impact of mutation density and heterogeneity on papillary thyroid cancer clinical features and remission probability [J]. Thyroid, 2019. 29(2): 237-251.
23 Colombo C, Muzza M, Proverbio MC, et al. Lack of association of BRAF mutation with negative prognostic indicators in papillary thyroid carcinoma: the University of California, San Francisco, experience [J]. JAMA Otolaryngol Head Neck Surg, 2013, 139(11): 1164-1170.
24 Yin DT, Yu K, Lu RQ, et al. Clinicopathological significance of TERT promoter mutation in papillary thyroid carcinomas: a systematic review and meta-analysis [J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2016, 85(2): 299-305.
25 Kim TH, Kim YE, Ahn S, et al. TERT promoter mutations and long-term survival in patients with thyroid cancer [J]. Endocr Relat Cancer, 2016, 23(10): 813-23.
26 Penna GC, Pestana A, Cameselle JM, et al. TERTp mutation is associated with a shorter progression free survival in patients with aggressive histology subtypes of follicular-cell derived thyroid carcinoma [J]. Endocrine, 2018. 61(3): 489-498.
27 Insilla AC, Proietti A, Borrelli N, et al. TERT promoter mutations and their correlation with BRAF and RAS mutations in a consecutive cohort of 145 thyroid cancer cases [J]. Oncol Lett, 2018, 15(3): 2763-2770.
28 Vuong HG, Duong UN, Altibi AM, et al. A meta-analysis of prognostic roles of molecular markers in papillary thyroid carcinoma [J]. Endocr Connect, 2017, 6(3): R8-R17.
29 Kim TH, Ki CS, Kim HS, et al. Refining dynamic risk stratification and prognostic groups for differentiated thyroid cancer with tert promoter mutations [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2017, 102(5): 1757-1764.
30 Moon S, Song YS, Kim YA, et al. Effects of coexistent BRAF(V600E) and TERT promoter mutations on poor clinical outcomes in papillary thyroid cancer: A meta-analysis [J]. Thyroid, 2017, 27(5): 651-660.
31 Vuong HG, Altibi AMA, Duong UNP, et al. Prognostic implication of BRAF and TERT promoter mutation combination in papillary thyroid carcinoma-A meta-analysis [J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2017. 87(5): 411-417.
32 Yoo SK, Lee S, Kim SJ, et al. Comprehensive analysis of the transcriptional and mutational landscape of follicular and papillary thyroid cancers [J]. PLoS Genet, 2016, 12(8): e1006239.
33 曹星月，武晓泓．基因拷贝数异常在甲状腺癌诊断和预后判断中的应用进展 [J]. 国际内分泌代谢杂志，2019, 39(1): 29-33.

（收稿日期：2019-04-06）
（本文编辑：史晓娟）

陈思远，胡夏荣，谢楚平．甲状腺乳头状癌突变等位基因肿瘤异质性的临床及其与预后相关性研究［J/CD］. 中华临床医师杂志 (电子版), 2019, 13(11): 832-836.