

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201805025

· 综述 ·

新一代测序在甲状腺肿瘤诊断中的应用及其临床意义

裴 达^{1,2}, 薛 刚², 吴靖芳¹

(1. 河北北方学院, 河北 张家口 075000; 2. 河北北方学院附属第一医院耳鼻咽喉头颈外科, 河北 张家口 075000)

摘要: 新一代测序技术(next-generation sequencing, NGS)的应用不仅可以对甲状腺癌(thyroid carcinoma, TC)遗传变异进行高通量分析,也为全面理解甲状腺相关肿瘤生物学特性提供可能,为具有不确定特征的甲状腺结节细针穿刺细胞学检查(fine needle aspiration, FNA)提供诊断改进意见,并有助于患者管理,依据肿瘤的恶性程度为患者提供危险分层。此外,NGS已应用于癌症的全面研究,如用于肿瘤分子分类、甲状腺癌复发转移的分子预测等。本综述涵盖了迄今为止源于不同类型甲状腺癌组织的NGS分析,其中包括FNA细胞学检查、新鲜冷冻组织和石蜡包埋组织。此外,本文还阐述了使用NGS研究和治疗甲状腺癌的实验研究及临床意义。

关键词: 新一代测序;细胞学;甲状腺癌

中图分类号:R739.91;Q291 文献标识码:C [中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2018,24(5):492-496]

Application and significance of next-generation sequencing in the diagnosis and treatment of thyroid carcinoma

PEI Da^{1,2}, XUE Gang², WU Jing-fang¹

(1. Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China; 2. Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

Abstract: The application of next-generation sequencing (NGS) not only enables high-throughput analysis of genetic variation in thyroid carcinoma, but also provides a comprehensive understanding of the biological characteristics of thyroid-associated tumors. NGS provides diagnostic suggestions for fine needle aspiration (FNA) cytology of thyroid nodules with indeterminate characteristics. It can also facilitate patient management by providing risk stratification according to the degree of malignancy. Furthermore, NGS has been applied in cancer research, e. g., molecular tumor classification, molecular prediction of recurrence and metastasis in papillary thyroid carcinoma. This review covers NGS analyses on different types of thyroid cancer tissues, including fresh frozen tissue, FNA tissue, and paraffin-embedded tissue. Additionally, this article expounds the significances of NGS in the treatment and experiment research of thyroid carcinoma.

Key words: Next-generation sequencing; Cytology; Thyroid carcinoma

[Chinese Journal of Otorhinolaryngology-Skull Base Surgery, 2018, 24(5):492-496]

众所周知,了解肿瘤形成的分子机制对于疾病的诊断和个性化治疗非常必要。测序技术历经一到四代的技术革新,二代之后的测序技术被称为新一代测序技术(next-generation sequencing, NGS),具有低成本、时间短、高通量的特点,能够快速、准确地获取生物体的遗传信息,最重要的是开发出了更多的

遗传位点。利用靶向测序板对数百个感兴趣的基因进行同步分析^[1]。因此,基于NGS的肿瘤学研究和临床分子检测得以迅速发展。甲状腺癌是内分泌系统最常见的恶性肿瘤,其发病率正在逐年上升,近30年增长了3倍以上^[2]。甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)是甲状腺癌最常见的病理类型,其次分别是滤泡状癌(follicular carcinoma, FC),髓样癌(medullary carcinoma, MC),低分化癌(poorly differentiated carcinoma, PDC),未分化癌(anaplastic carcinoma, AC)。甲状腺癌具有特征性

基金项目:河北省自然科学基金(H2018205054);张家口市科技支撑计划项目(1712006D)。

作者简介:裴 达,男,在读硕士研究生。

通信作者:薛 刚,Email:xgwj@163.com

的遗传学改变,包括原癌基因(BRAF、NRAS、HRAS、KRAS)和染色体重排(RET/PTC1、RET/PTC3、PAX8/PPARG)在内的点突变,这些突变因组织学亚型不同也有差异^[3]。而NGS检测的兴起,可以为临床医生提高疾病的诊断准确性,以便为患者提供精确的个性化治疗。

1 NGS在细胞学诊断不确定的甲状腺癌中的应用

前期使用NGS对甲状腺癌的研究主要是针对不同的标本样本类型和组织学亚型。FNA是评估甲状腺结节的一种高灵敏度和高特异性的方法。然而,20%~30%的FNA样本属于细胞学不确定的甲状腺结节(indeterminate cytology, IC)类型,这部分甲状腺结节成为FNA应用的瓶颈。IC包括意义不明的异型性/意义未明的滤泡性病变(atypia of undetermined significance/follicular lesion of undetermined significance, AUS/FLUS, III类),滤泡性或嗜酸细胞性(Hurthle细胞)肿瘤/可疑滤泡性或嗜酸细胞性(Hurthle细胞)肿瘤[follicular or oncocyctic (Hurthle cell) neoplasm/suspicious for a follicular or oncocyctic (Hurthle cell) neoplasm, FN/SFN, IV类]以及可疑的恶性细胞(suspicious for malignant cells, SUSP)^[4-5]。这些类别的癌症平均风险为:AUS/FLUS为15.9%, FN/SFN为26.1%, SUSP为75.2%^[6]。Nikiforov等^[7]使用ThyroSeq v2.1测序板(包括甲状腺癌14个公认基因的点突变和42种基因融合以及用于评估FNA样品细胞组成的8个基因)对465个细胞学诊断为AUS/FLUS的FNA样本进行了分子检测。结果显示ThyroSeq v2.1能够正确分类20/22例癌症,灵敏度为90.9%,特异性为92.1%,阳性预测值为76.9%,阴性预测值为97.2%,总体准确率为91.8%。因而,Nikiforov等认为NGS为AUS/FLUS细胞学检测甲状腺结节提供了高灵敏度和高特异性的检测方法,可以改善这些患者的治疗效果。Nikiforov研究表明在临床实践中,NGS检测已被用于不确定性甲状腺结节的细胞学诊断,可为不确定性细胞学的类型提供决策性诊断依据。

2 甲状腺癌的遗传变异和NGS

2.1 甲状腺乳头状癌

甲状腺乳头状癌(PTC)是最常见的甲状腺癌,

占甲状腺癌的80%左右^[8]。Nikiforov和Leeman-Neill等使用NGS分别分析了不同亚型的PTC,而Picarsic和Ballester等选择对小儿PTC使用NGS分析,他们均得到了各自不同的结论。Nikiforov等^[7]使用Ion Torrent PGM测序仪和ThyroSeq NGS测序板分析了来自27例经典PTC和30例滤泡型甲状腺乳头状癌(follicular variant papillary thyroid carcinoma, FVPTC)的石蜡包埋组织或冷冻组织的34个扩增子的12个基因,结果显示,70%经典PTC和83%的FVPTC携带不同的突变基因,最常见的分别是:BRAF(59%)、RAS(73%)。Smallridge等^[9]使用Illumina HiSeq 2000平台对12个BRAF V600E突变的PTC和8个BRAF野生型的PTC的冷冻组织进行RNA测序。其中560个基因在BRAF V600E突变和BRAF野生型的PTC之间存在差异性表达,包括:67个与免疫功能通路有关,51个在BRAF V600E突变的PTC中低表达,HLA-G、CX-CL14、TIMP1和IL1RAP过表达等。在BRAF野生型的PTC中,4种免疫功能基因(IL1B、CCL19、CCL21和CXCR4)差异表达最为显著,并且显示它们与淋巴细胞浸润高度相关。Leeman-Neill等^[10]分析62例与辐射相关的PTC和151例散发PTC的新鲜冷冻组织,发现14.5%辐射相关的PTC和2%散发性PTC存在基因ETV6-NTRK3重排,认为ETV6-NTRK3重排可能是辐射诱导致癌作用的关键机制。

Picarsic等^[11]使用实时PCR和Ion Torrent PGM测序仪ThyroSeq v2分析了17例儿童PTC的FNA的新鲜冷冻组织和FFPE的样本的7个基因突变组合。突变分析显示:①ThyroSeq v2 NGS测定分子改变的检测率显著高于实时PCR法对7个基因突变组合检测的结果(87% vs 60%);②小儿甲状腺癌染色体重排比例高于点突变比例(53% vs 33%);③18%的样本中鉴定出ETV6-NTRK3融合与侵袭性的组织学特征如非囊化,固体/岛状/小梁模式,广泛的腺体受累和肿瘤的厚纤维化相关。Ballester等^[12]使用Ion Torrent PGM测序仪分析了25例儿童PTC的FFPE和FNA样品中50个肿瘤热点基因突变情况。对于BRAF V600E突变,RET/PTC1/3融合和TERT启动子突变阴性的儿童PTC,使用NGS未检测到其他的突变。

此外,NGS在癌症基因组图谱(the cancer genome atlas, TCGA)中的应用也为甲状腺乳头状癌的基因诊断提供了依据。TCGA在NGS平台上通过SNP阵列,DNA甲基化和反相蛋白质阵列等多平台

分析,描述了496个PTC的基因组特征,并使用全基因组测序产生了大量数据。对缺乏已知突变基因的PTC,EIF1AX、PPMID和CHEK2的突变可能导致甲状腺肿瘤的发生。与此同时,TCGA项目鉴定出约占PTC总数的1%的TERT启动子突变与高复发风险度有关。基于多层次的生物分子数据,按照不同的下游信号通路,PTC被分成两组: BRAF V600E组和RAS组。两组之间在基因组学,表观遗传学和蛋白质组学中均表现出差异,并且大多数RAS组是滤泡变异型甲状腺乳头状癌(FVPTC)。

2.2 滤泡状癌

甲状腺滤泡癌(follicular carcinoma, FC)是一种分化良好的甲状腺癌,约占甲状腺癌的10%,是继PTC后的第二种常见的甲状腺癌。Delellis等^[13]根据肿瘤显微病理结构,将其分为微小浸润型滤泡癌和广泛浸润型滤泡癌;Kushchayeva等^[14]根据细胞类型将其分为常规型和嗜酸细胞型(Hurthle细胞型),但其分型均尚未获得广泛认可。Nikiforova等^[15]根据上述分型回顾性地收集了来自36个FC的石蜡包埋组织或新鲜冷冻组织样品,使用Ion Torrent PGM测序仪上的ThyroSeq平台研究12个癌症基因和34个扩增子的变异。检测到突变基因分别为:NRAS(9例),TSHR(4例),TP53(4例),KRAS(2例),HRAS(1例)和PTEN(1例)^[15]。有趣的是经典型(18例)和嗜酸细胞型(18例)样品显示出显著的遗传学改变。在经典型FC中, NRAS是影响最大的基因,其次是TSHR和KRAS。而在嗜酸细胞FC中TP53是最常见的突变基因,其次是HRAS, KRAS和PTEN^[16]。

Swierniak等^[17]使用Illumina HiSeq 1500平台分析了22例FC,26例滤泡型腺瘤和34例正常甲状腺组织样品的372个基因。NGS结果显示:①体细胞在致癌基因(MDM2、FLI1),转录因子和阻遏物(MITF、FLI1、ZNF331),表观遗传酶(KMT2A、NSD1、NCOA1、NCOA2)和蛋白激酶(JAK3、CHEK2、ALK)中发生了改变;②最常见的突变类型是单核苷酸变异,而广泛的突变变异频率最低;③发现一种新型的DERL/COX6C易位;④受非编码基因区域改变影响的体细胞,表现出较高的外显率。因为FC比PTC显示出具有更复杂的体细胞改变,并且每种亚型涉及到不同的体细胞改变,所以FC表现出显著的分子异质性。

2.3 低分化癌和未分化癌

甲状腺低分化癌(PDC)和未分化癌(AC)是罕

见的甲状腺癌类型,占有甲状腺癌中的1%~2%。PDC和AC预后较差,5年生存率分别为51%和0%^[18]。由于这些类型的癌症对常规治疗选择(放射性碘治疗、化学疗法和放射疗法)的反应不敏感,为加强对肿瘤细胞的杀伤作用,许多研究和临床试验开始瞄准分子靶向治疗,同时尝试将分子靶向治疗同免疫治疗、基因工程、纳米技术等联合起来,力求新的突破^[19]。而NGS的开展,有可能通过测定靶向的基因改变采用“精准治疗”的方式来改善患者治疗过程。为此,Nikiforova, Sykorova和Landa等在PDC和AC领域开展了各自的研究。

Nikiforova等^[15]使用Ion Torrent PGM测序仪的ThyroSeq平台,对来自10例PDC和27例AC的新鲜冷冻组织和FFPE分析了12个基因的34个扩增子。该研究显示30%的PDC和74%的AC存在突变。在PDC中突变的基因分别是NRAS、PIK3CA、GNAS和BRAF,而在AC中的分别是TP53、BRAF、RAS、PIK3CA、PTEN和CTNNB1。Sykorova等^[20]分析来自3例PDC和5例AC的新鲜冷冻组织样品,在Illumina MiSeq测序仪靶向94个癌症相关基因,NGS显示:所有PDC和AC均表现出一个以上的基因突变,除2例外均检出TP53基因突变。在PDC中CDH1、FANCD2、CHECK2、ADH1B、GPC3、TP53和PTEN基因发生突变,在AC中ATM、HNF1A、MET、NF1、TP53、PTEN、MSH2、RB1、NBN、NF1、MUTYH、TSC2、HRAS和EGFR基因发生突变^[20]。然而,该研究无法评估94个已知癌症基因组中的较大基因或染色体重排的突变,也不能在所检测到的基因变化中区分生殖细胞突变。

Landa等^[21]使用MSK-IMPACT肿瘤外显子平台分析了来自34例PDC和33例AC患者的80个石蜡包埋和37个鲜冷冻组织样品的341个基因,NGS结果显示:①AC的突变数高于PDC,并且在TP53、TERT启动子、PI3K/AKT/mTOR通路效应子、SWI/SNF亚基和组蛋白甲基转移酶中具有较高的突变频率;②PDC的临床病理特征因基因改变而不同:在PDC中92%的RAS突变符合Turin标准,81%的BRAF突变符合Memorial Sloan-Kettering癌症中心(MSKCC)标准。携带BRAF突变的PDC显示肿瘤体积较小并且具有频繁的淋巴结转移,而RAS突变的PDC显示肿瘤体积较大和远处转移率较高;③EIF1AX和RAS的突变在PDC和AC中都显示出相关性。并且,已知对于BRAF和RAS突变是相互排斥的前提下,大约1%的PTC仍报道出了

EIF1AX 突变。然而,在 11% 的 PDC 和 9% 的 AC 中发现 EIF1AX 突变,且 93% 与 RAS 突变相关;④在 14% 的 PDC 中发现染色体重排(包括 RET / PTC, ALK 和 PAX8-PPARG 融合),但在 AC 中没有。

2.4 髓样癌

甲状腺髓样癌(medullary carcinoma, MC)是一种起源于 C 细胞的神经内分泌肿瘤,约占甲状腺癌的 5%。75% 的 MTC 以散发形式存在,而 25% 的 MTC 有遗传倾向,后者是由 RET 原癌基因突变导致^[22]。

Nikiforov 等^[7]使用 Ion Torrent PGM 测序仪的 ThyroSeq 平台分析了来自 15 个散发 MTC 的石蜡包埋或新鲜冷冻组织样品的 12 个基因和 34 个扩增子。73% (11 个) MTC 中鉴定出存在基因突变,其中 47% (7 个)是 RET 突变,20% (3 个)是 HRAS 突变,7% (1 个)是 KRAS 突变。Simbolo 等^[23]使用 Ion Torrent PGM 测序仪的 Ion AmpliSeq Hot Spot Cancer Panel v2 分析了 20 例 MTC 的 FFPE 样本的 50 个癌症相关基因,发现 85% 的 MTC 具有以下基因突变:13 例 RET 突变(60%),3 例 HRAS 突变(15%),1 例 KRAS 突变(5%),1 例 STK11 突变(5%)和 3 例未检测到突变的样本(15%)。同时使用 NGS 和 Sanger 两种测序方法评估 RET 状态,NGS 比 Sanger 方法显示出更高的灵敏度。而且 NGS 发现 Sanger 法没有检测到的另外 3 个 RET 突变。尽管在 MTC 中发现了多个突变位点,但尚未找到合适的治疗靶点,因此需要进一步的研究来优化甲状腺髓样癌的治疗。

3 NGS 技术的局限性

应用 NGS 诊断甲状腺癌有其局限性。表现在:①现有使用 NGS 分析甲状腺癌的研究数量不足 15 个。而且,以前的大部分研究都是在单一研究所针对小样本量的甲状腺癌特定亚型进行的,而不是所有类型的甲状腺癌;②样品制备不充分、质量差和数量少的前提下,NGS 检测的甲状腺结节可能导致错误的结果。在肿瘤纯度较差,DNA 含量较少的样本中,低等位基因频率较低,仪器可能无法检测到低覆盖率^[12]。相反,RAS 突变可在 FVPTC 和滤泡性肿瘤中检测到,需要手术切除,同时也存在于不需要手术切除的良性腺瘤结节中^[24];③尚缺乏大规模的综合基因组和表型数据库来解释 NGS 结果以及一个阐述甲状腺癌病因的 NGS 报告系统;④对于热点

突变而言,NGS 对选定基因的有限区域的评估有着高度敏感性,但缺乏适当的对照可能导致相关的突变点丢失;⑤由于样本类型多样、平台和基因测序板多样化以及变量分析程序的不同,NGS 也存在局限性,每个方案都能对结果产生混淆。因此,需要严格的质量控制和数据分析过程的标准化,以尽量减少分析之间的差异;⑥目前 NGS 测序已经由原来的第一、二、三代正在向第四代(纳米孔技术)转变,目前的相关研究和临床试验还停留在前三代,其较第四代测序而言仍面临着成本高昂、测序时间较长、大量的洗脱过程导致容易出现错误积累、普遍读长 150 ~ 400 bp、分析过程耗时耗力等问题。

4 展望

快速发展的 NGS 技术为癌症基因组学以及甲状腺癌的诊断提供了经济高效的方法。①NGS 可用于检测循环肿瘤细胞或无细胞血浆 DNA 以鉴别早期复发和(或)肿瘤残余体,为未来 NGS 应用指明了方向;②NGS 可以检测肿瘤特异性基因改变,用于随访患者监测。在甲状腺癌中,BRAF V600E 是 PTC 中最常见和最早发现的遗传基因,可以作为一个很好的监测基因^[25];③在甲状腺癌的放射性碘和(或)药物治疗期间,NGS 分析可以识别循环肿瘤细胞或无细胞血浆 DNA 中原发肿瘤以外的新的突变体;④NGS 分析也可用于检测临床放疗或化疗过程中耐受相关的遗传改变;⑤获得第四代测序美誉的纳米孔测序技术正迅速发展,相信其一旦投入市场,全基因组测序有望以几百美元的成本在几小时内完成。此外,基于系统生物学方法发现基因和蛋白质的相互作用及其因果关系,使得引入甲状腺癌生物学成为可能。

总之,新一代测序技术的发展为甲状腺癌筛查、诊断、预后评价和靶向治疗提供了有效的方案,从而达到对甲状腺癌“精确治疗”的目的。

参考文献:

- [1] LeBlanc VG, Marra MA. Next-generation sequencing approaches in cancer: where have they brought us and where will they take us [J]. *Cancers (Basel)*, 2015, 7(3):1925-1958.
- [2] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2008, 58(2):71-96.
- [3] Hunt J. Understanding the genotype of follicular thyroid tumors [J]. *Endocr Pathol*, 2005, 16(4):311-321.

- [4] Baloch ZW, LiVolsi VA, Asa SL, et al. Diagnostic terminology and morphologic criteria for cytologic diagnosis of thyroid lesions; a synopsis of the National Cancer Institute Thyroid Fine-Needle Aspiration State of the Science Conference[J]. *Diagn Cytopathol*, 2008, 36(6):425-437.
- [5] Lewis CM, Chang KP, Pitman M, et al. Thyroid fine-needle aspiration biopsy: variability in reporting[J]. *Thyroid*, 2009, 19(7):717-723.
- [6] Bongiovanni M, Spitale A, Faquin WC, et al. The Bethesda system for reporting thyroid cytopathology: a meta-analysis[J]. *Acta Cytol*, 2012, 56(4):333-339.
- [7] Nikiforov YE, Carty SE, Chiosea SI, et al. Highly accurate diagnosis of cancer in thyroid nodules with follicular neoplasm/suspicious for a follicular neoplasm cytology by ThyroSeq v2 next-generation sequencing assay [J]. *Cancer*, 2014, 120(23):3627-3634.
- [8] 田薇, 薛刚, 吉建敏, 等. HIF-1 α 、ER α 和 MMP-9 在甲状腺乳头状癌中的表达及临床意义[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2017, 23(6):559-562.
- Tian W, Xue G, Ji JM, et al. Expressions and clinical significances of HIF-1 α , ER α and MMP-9 in papillary thyroid carcinoma [J]. *Chinese Journal Otorhinolaryngology-Skull Base Surgery*, 2017, 23(6):559-562.
- [9] Smallridge RC, Chindris AM, Asmann YW, et al. RNA sequencing identifies multiple fusion transcripts, differentially expressed genes, and reduced expression of immune function genes in BRAF (V600E) mutant vs BRAF wild-type papillary thyroid carcinoma [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014, 99(2):E338-347.
- [10] Leeman-Neill RJ, Kelly LM, Liu P, et al. ETV6-NTRK3 is a common chromosomal rearrangement in radiation-associated thyroid cancer[J]. *Cancer*, 2014, 120(6):799-807.
- [11] Picarsic JL, Buryk MA, Ozolek J, et al. Molecular characterization of sporadic pediatric thyroid carcinoma with the DNA/RNA ThyroSeq v2 next-generation sequencing assay [J]. *Pediatr Dev Pathol*, 2016, 19(2):115-122.
- [12] Ballester LY, Sarabia SF, Sayeed H, et al. Integrating molecular testing in the diagnosis and management of children with thyroid lesions[J]. *Pediatr Dev Pathol*, 2016, 19(2):94-100.
- [13] DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU. Tumours of the thyroid and parathyroid, in WHO classification of tumours: pathology and genetics of tumours of endocrine organs [M]. Lyon: IARC Press, 2004.
- [14] Kushchayeva Y, Duh QY, Kebebew E, et al. Comparison of clinical characteristics at diagnosis and during follow-up in 118 patients with Hurthle cell or follicular thyroid cancer [J]. *Am J Surg*, 2008, 195(4):457-462.
- [15] Nikiforova MN, Wald AI, Roy S, et al. Targeted next-generation sequencing panel (ThyroSeq) for detection of mutations in thyroid cancer [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013, 98(11):E1852-1860.
- [16] Karunamurthy A, Panebianco F, Hsiao SJ, et al. Prevalence and phenotypic correlations of EIF1AX mutations in thyroid nodules [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2016, 23(4):295-301.
- [17] Swierniak M, Pfeifer A, Stokowy T, et al. Somatic mutation profiling of follicular thyroid cancer by next generation sequencing [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2016, 433:130-137.
- [18] Sywak M, Pasiaka JL, Ogilvie T. A review of thyroid cancer with intermediate differentiation [J]. *J Surg Oncol*, 2004, 86(1):44-54.
- [19] 苗湘琬, 谢民强. 头颈肿瘤分子靶向治疗研究进展 [J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2017, 23(3):290-294.
- Miao XW, Xie MQ. Progress in molecular targeting therapy for head and neck tumors [J]. *Chinese Journal Otorhinolaryngology-Skull Base Surgery*, 2017, 23(3):290-294.
- [20] Sykorova V, Dvorakova S, Vcelak J, et al. Search for new genetic biomarkers in poorly differentiated and anaplastic thyroid carcinomas using next generation sequencing [J]. *Anticancer Res*, 2015, 35(4):2029-2036.
- [21] Lancia I, Ibrahimasic T, Boucai L, et al. Genomic and transcriptomic hallmarks of poorly differentiated and anaplastic thyroid cancers [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(3):1052-1066.
- [22] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2012, 62(1):10-29.
- [23] Simbolo M, Mian C, Barollo S, et al. High-throughput mutation profiling improves diagnostic stratification of sporadic medullary thyroid carcinomas [J]. *Virchows Arch*, 2014, 465(1):73-78.
- [24] Medici M, Kwong N, Angel TE, et al. The variable phenotype and low-risk nature of RAS-positive thyroid nodules [J]. *BMC Med*, 2015, 13:184.
- [25] Le Mercier M, D'Haene N, De Nève N, et al. Next-generation sequencing improves the diagnosis of thyroid FNA specimens with indeterminate cytology [J]. *Histopathology*, 2015, 66(2):215-224.

(收稿日期:2018-02-11)