

乳头状甲状腺癌差异表达基因的筛选及生存分析

刘中娇 窦龙涛 庄振 刘玲 周永维 刘曼 李晶 张红梅*

(德州学院生命科学学院,山东省功能性生物资源利用高校重点实验室,山东省生物物理学重点实验室,山东 德州 253023)

[摘要] 目的 利用生物信息学方法筛选乳头状甲状腺癌(PTC)的关键基因及其所在信号通路,探讨其致癌机制。方法 从基因表达综合数据库(GEO)的两个测序平台的7个GSE芯片中获得PTC和癌旁组织样本的数据。首先利用R语言分别筛选出两个测序平台样本的差异基因,然后通过Metascape和STRING对差异基因进行生物学功能、信号通路分析和蛋白质-蛋白质相互作用分析,最后利用Cytoscape 3.5.1软件筛选出关键基因。结果 两个测序平台的样本求交集共获得302个差异表达基因,其中149个基因上调,153个基因下调,利用Cytoscape 3.5.1软件筛选出15个关键基因,其中12个关键基因位于细胞外基质受体相互作用信号通路中。利用UALCAN数据库对15个关键基因进行生存分析,其中4个基因的表达水平变化与患者的生存时间紧密相关。结论 利用生物信息学技术对来自7个PTC基因芯片数据集的信息进行分析,弥补了小样本结果的不一致性,提高了结果的可靠性和稳定性,并且筛选出了15个关键基因,发现了细胞外基质受体相互作用信号通路在甲状腺癌的发生发展中的重要作用。

[关键词] 乳头状甲状腺癌;生物信息学;差异基因;生存分析;人

[中图分类号] R736.1 **[文献标志码]** A **[DOI]** 10.16098/j.issn.0529-4356.2020.01.009

Screening and survival analysis of differentially expressed genes in papillary thyroid carcinoma

LIU Zhong-jiao, DOU Long-tao, ZHUANG Zhen, LIU Ling, ZHOU Yong-wei, LIU Man, LI Jing, ZHANG Hong-mei*

(College of Life Science, Dezhou University, Shandong Key Laboratory in University of Functional Bioresource Utilization, Shandong Provincial Key Laboratory of Biophysics, Shandong Dezhou 253023, China)

[Abstract] **Objective** Bioinformatics method was used to analyze gene expression microarrays of papillary thyroid cancer (PTC) and adjacent tissues. The key genes of PTC and their signal pathways were screened to understand their carcinogenic mechanisms. **Methods** Data on PTC and paracancerous tissue samples were obtained from seven GSE series on two sequencing platforms in the Gene Expression Omnibus Database (GEO). Firstly, the differential genes of the two sequencing platform samples were screened by R language. Then biological function, signal pathway analysis and protein-protein interaction analysis were performed on differential genes by Metascape and STRING. Finally, the key gene were selected by Cytoscape 3.5.1 software. **Results** A total of 302 differential genes were obtained from the intersection of the two sequencing platform samples, of which 149 genes were up-regulated and 153 genes were down-regulated. Using the Cytoscape 3.5.1 software to screen out 15 key genes, 12 of them are involved in the extracellular matrix receptor interaction signal pathway. Survival analysis of 15 key genes was performed using the UALCAN database, and the changes in the expression levels of 4 genes were closely related to the survival time of patients. **Conclusion** This study uses bioinformatics technology to analyze the data from seven PTC gene chips, making up for the inconsistency of small sample result and improving the reliability and stability of the result. In addition, 15 key genes are screened out and found that the matrix extracellular receptor interactions pathway plays an important role in the development of thyroid cancer. The result of this experiment provides guidance for the further study of PTC molecular mechanism, diagnosis and screening of prognostic molecular markers.

[Key words] Papillary thyroid carcinoma; Bioinformatics; Differentially expressed gene; Survival analysis; Human

[收稿日期] 2018-12-26 **[修回日期]** 2019-01-23

[基金项目] 德州学院人才引进基金(320107)

[作者简介] 刘中娇(1998—),女(汉族),山东省临沂市人,大学本科。

* 通讯作者(To whom correspondence should be addressed)

E-mail: dzxy7678@163.com Tel: (0534) 8985840

甲状腺癌是常见的恶性肿瘤之一,属于内分泌腺肿瘤,多见于女性^[1]。美国癌症研究机构通过分析近三十年内的癌症数据,认为甲状腺癌是所有恶性实体肿瘤发病中增长最快的,并且研究发现,甲状腺癌在近三十年来发病率增长了 300%^[2-4]。根据甲状腺癌的起源不同,分为乳头状甲状腺癌(papillary thyroid cancer, PTC)、滤泡状甲状腺癌(follicular thyroid carcinoma, FTC)、未分化型甲状腺癌(anaplastic thyroid carcinoma, ATC)和髓样甲状腺癌(medullary thyroid carcinoma, MTC),其中发病率和死亡率最高的为 PTC^[5]。高通量测序技术和基因芯片技术的发展,为研究 PTC 组织在特定状态下的基因表达情况和差异基因变化规律提供技术支持。目前对 PTC 的研究不少,但局限于小样本,导致不同研究的结果不一致,本研究收集 7 个 PTC 基因芯片基因表达综合数据库(Gene Expression Omnibus Database, GEO)相关数据,筛选差异基因,并且对差异基因做进一步分析,弥补了小样本结果的不一致性,提高了结果的可靠性和稳定性。希望通过本研究能够发现 PTC 的关键基因、发生机制和信号通路,对 PTC 的诊断、预后进行指导,在一定程度上可以减少 PTC 由于不能及时发现带来的治疗困难,同时也能够为 PTC 的研究提供实验数据。

材料和方法

1. 材料

PTC 和癌旁组织基因表达谱数据来自于美国国立生物技术中心公共数据平台 GEO(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)。选择了 7 个 GSE 芯片(表 1)中 PTC 和癌旁组织的基因表达谱。这些基因表达谱来自 2 个测序平台,其中 GPL570 测序平台(Affymetrix 人类基因组 U133 Plus 2.0 阵列)共 132 组正常样本、95 组 PTC 样本,GPL96 测序平台(Affymetrix 人类基因组 U133 A 阵列)共 22 组正常样本、77 组 PTC 样本。

2. 方法

2.1 数据处理及差异基因筛选: 在 GEO 中获得 PTC 和癌旁组织基因芯片表达谱数据,然后用 R 语言的 affy、limma、impute、sva、pamr 等软件包分别对两个测序平台的基因表达谱数据去除批间差和标准

化后进行筛选,获得 PTC 样本与癌旁样本的差异表达基因。筛选条件:(1) $P < 0.05$; (2) $|\log FC| \geq 1$ 。将两个测序平台的差异基因筛选结果通过 VENN2.1 绘制 Venn 图。

2.2 差异表达基因的功能富集分析: 为了了解差异表达基因的生物学功能及参与的信号通路,我们利用 Metascape 3.0 软件对基因进行基因本体论(Gene Ontology, GO <http://www.geneontology.org/>)和京都基因和基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes Genomes, KEGG <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>)分析。Metascape (<http://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>)是一个在线生物学信息分析工具,可为大规模基因或蛋白质提供生物信息注释,筛选条件为:(1) $P < 0.01$; (2) count > 5。

2.3 差异表达基因的蛋白质-蛋白质相互作用分析: STRING 10.5 (<https://string-db.org/>)是包含有大量已知或预测的蛋白质相互作用数据的数据库。它可以提供蛋白之间的直接作用和间接作用关系的数据。将共同差异基因上传到 STRING10.5 进行蛋白质-蛋白质相互作用网络分析,并删除没有蛋白质相互作用的节点。

2.4 关键基因的筛选: 将 STRING10.5 分析得到的结果导入 Cytoscape 3.5.1,通过 cytoHuba 1.6 软件包中的 12 种筛选标准分别选出位于前 30 的基因。将不同筛选标准筛选出的差异基因,利用 Excel 2007 选择出现频率大于 8 次的基因。

2.5 关键基因的生存分析: 利用 UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu/index.html>)数据库,我们在甲状腺癌中,通过对 59 个正常组织样本和 505 个癌组织样本(样本来源于 TCGA 数据库)分析筛选出的关键基因的表达水平,并对其进行生存分析。生存曲线采用 Kaplan-Meier (<http://kmplot.com/analysis/>)分析 *log-ranktest* 进行统计学检验。

结 果

1. 差异基因筛选结果

通过对比正常组与 PTC 组的表达差异基因筛选结果,GPL570 测序平台样本获得 801 个差异基因,GPL96 测序平台样本获得 457 个差异基因,用 Venn 图求交集获得 302 个共同差异基因(图 1),其

表 1 GEO 中 7 个数据系列
Table 1 Seven datasets in GEO

GSE 系列 GSE series	测序平台 sequencing platform	乳头状甲状腺癌样本数 number of papillary thyroid cancer samples	正常组织样本数 number of normal tissue samples
GSE35570、GSE3464、GSE33630、GSE3678、 (C)182-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net	GPL570 GPL96	95 77	132 22

中上调基因 149 个,下调基因 153 个。

2. 差异基因 GO 分析

利用 Metascape 3.0 软件对 302 个差异基因进行 GO 富集分析,图 2~4 分别列出了差异基因的细胞学组分 (cellular component)、生物学过程 (biological process) 以及分子功能 (molecular function) 的富集分析结果。结果显示,差异基因表达产物主要分布在外泌体、胞外基质和内质网腔中 (图 2),参与了细胞外结构组建,创伤反应,轴突发育以及调控细胞黏附等生物学过程 (图 3),主要执行结合硫化物,二聚化同源蛋白质以及结合蛋白酶等生物学功能 (图 4)。



图 1 两个 GPL 平台的韦恩图
Fig.1 Venn diagrams for two GPL

function) 的富集分析结果。结果显示,差异基因表达产物主要分布在外泌体、胞外基质和内质网腔中 (图 2),参与了细胞外结构组建,创伤反应,轴突发育以及调控细胞黏附等生物学过程 (图 3),主要执行结合硫化物,二聚化同源蛋白质以及结合蛋白酶等生物学功能 (图 4)。

3. 差异表达基因 KEGG 通路分析

利用 Metascape 3.0 软件对 302 个差异基因进行 KEGG 通路分析 (图 5),具体结果见表 2。主要涉及的信号通路有细胞外基质受体相互作用 (ECM-receptor interaction)、肿瘤中转录失调、补体和凝血级联、酪氨酸代谢、肿瘤中的 microRNA 调控和过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferators-activated receptors, PPARs) 等信号通路。

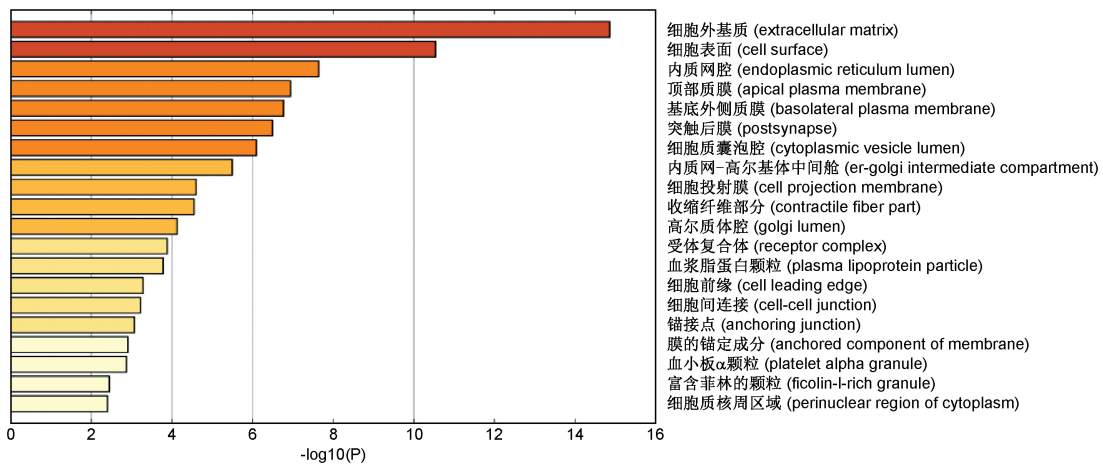


图 2 差异表达基因的细胞组分富集分析 X 坐标轴表示错误发现率 (false discovery rate, FDR) 值,值越高,柱的颜色越深

Fig.2 Significantly enriched cellular components of differentially expressed genes; The X-coordinate axis presents the false discovery rate (FDR) value; FDR value is more highly, the color of the bar is more deeply

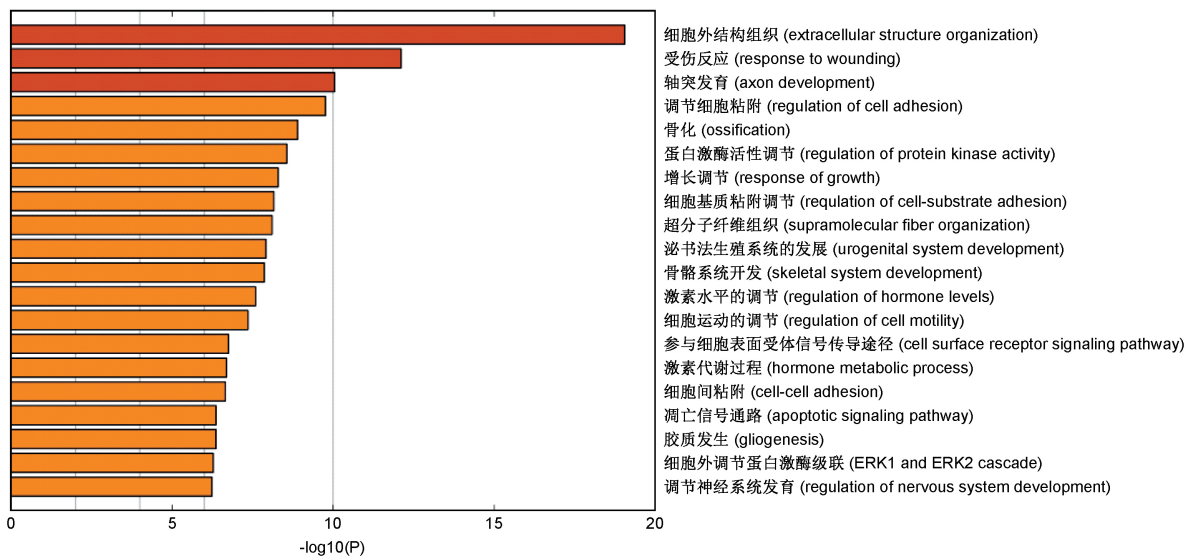


图 3 差异表达基因的生物学过程富集分析 X 坐标轴表示 FDR 值,值越高柱的颜色越深

Fig.3 Significantly enriched biological process of differentially expressed genes; The X-coordinate axis presents the FDR value; FDR value is more highly, the color of the bar is more deeply

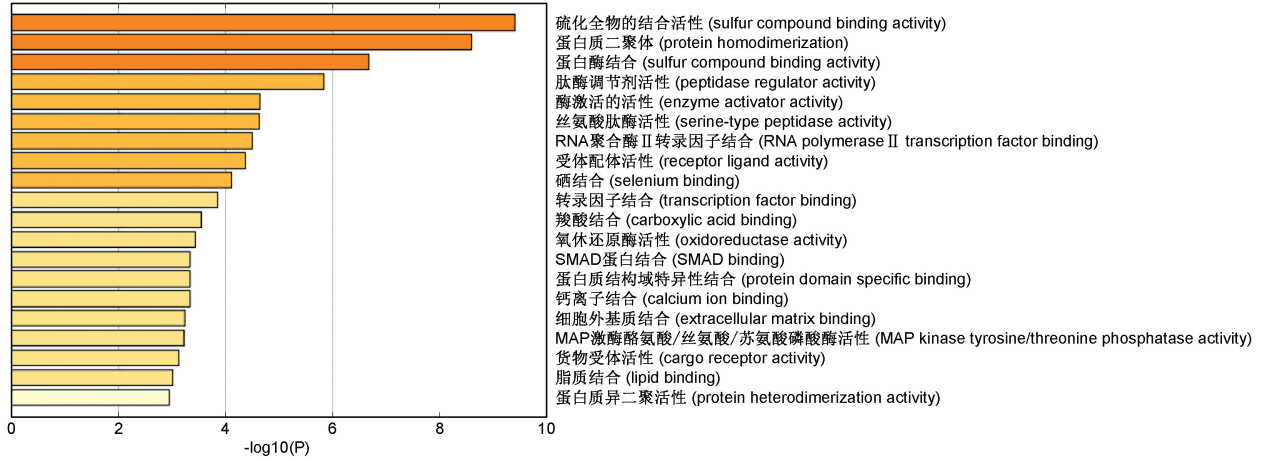


图 4 差异表达基因的分子功能分析 X 坐标轴表示 FDR 值 ,值越高 柱的颜色越深

Fig.4 Significantly enriched molecular functions of differentially expressed genes; The X-coordinate axis presents the FDR value; FDR value is more highly , the color of the bar is more deeply

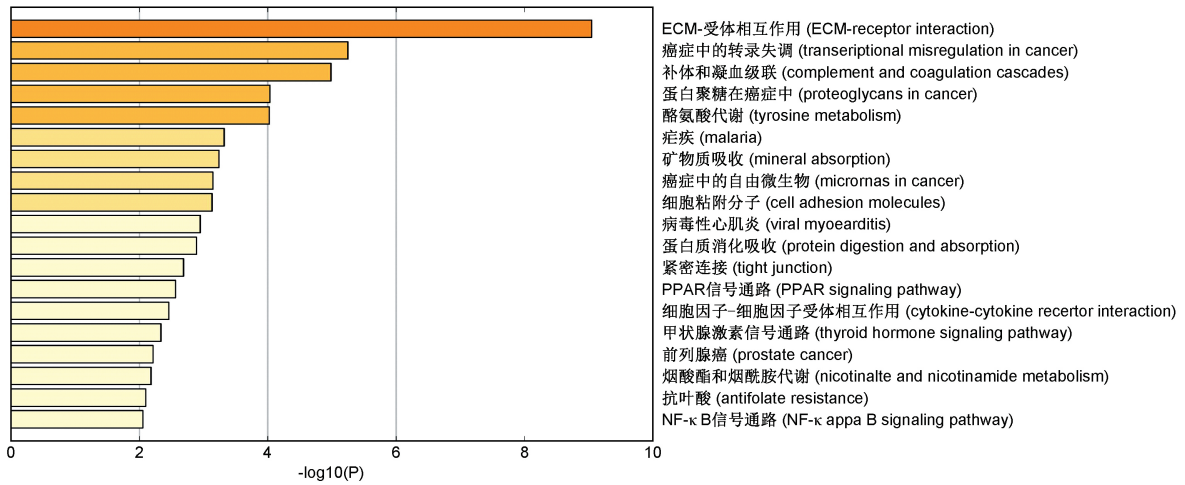


图 5 差异表达基因的 KEGG 分析 X 坐标轴表示 FDR 值 ,值越高 柱的颜色越深

Fig.5 Significantly enriched KEGG pathway of differentially expressed genes The X-coordinate axis presents the FDR value; FDR value is more highly , the color of the bar is more deeply

表 2 差异表达基因的 KEGG 信号通路

Table 2 The KEGG enrichment signal pathways of differentially expressed genes

ID 号 KEGG ID	功能描述 description	P 值对数 log P	基因列表 gene list
hsa04512	ECM-receptor interaction	-9.047	CD36 ,COL1A1 ,COL1A2 ,COMP , <u>FN1</u> , <u>TNC</u> ,ITGA3 ,LAMA2 , LAMB3 ,LAMC2 ,SDC4 , <u>SPP1</u> ,AGTR1 , <u>CCND1</u> , <u>BCL2</u> , <u>BID</u> , <u>BMP2</u> ,RUNX1 ,CKS2 ,LPAR1 ,FCGR2 , <u>JUN</u> , <u>KIT</u> , <u>MET</u> , <u>RXRG</u> , <u>CXCL12</u> ,TGFA ,DAPK2 ,TCF7L1 ,GHR , <u>JRS1</u> , <u>ICAM1</u>
hsa05202	transcriptional misregulation in cancer	-5.248	RUNX1 ,DUSP6 ,ETV1 ,ETV5 , <u>MET</u> ,MLLT3 ,PLAU ,RXRG ,SPINT1 ,TSPAN7 ,HMGA2 ,PROM1
hsa05205	Proteoglycans in cancer	-4.033	ANK2 , <u>CCND1</u> ,ERBB3 , <u>FN1</u> ,GPC3 ,ITPR1 , <u>MET</u> ,PLAU ,SDC2 ,SDC4 ,TIAM1
hsa00350	tyrosine metabolism	-4.024	H1B ,ALDH1A3 ,AOX1 ,HGD ,TPO ,CYP1B1 ,AKR1C1 ,GSTM3 ,AKR1C2
hsa05144	malaria	-3.321	CD36 ,COMP , <u>ICAM1</u> , <u>MET</u> ,SDC2
hsa04978	mineral absorption	-3.240	MT1F ,MT1G ,MT1H ,MT1M ,SLC34A2
hsa04514	cell adhesion molecules (CAMs)	-3.13	CDH3 , <u>ICAM1</u> , <u>NCAM1</u> , <u>NRCAM</u> ,SDC2 ,SDC4 ,CLDN10 ,CLDN1
hsa05416	viral myocarditis	-2.94	<u>CCND1</u> , <u>BID</u> , <u>CD55</u> , <u>ICAM1</u> ,LAMA2 ,SFN ,PERP ,ZMAT3
hsa04974	protein digestion and absorption	-2.88	COL1A1 ,COL1A2 ,COL13A1 ,DPP4 ,KCNN4 ,SLC1A1

有下划线基因是关键基因(underlined gene is the key gene)

4. 差异表达基因蛋白质-蛋白质相互作用分析

用 STRING 10.5 对 302 个差异表达基因的蛋白质进行蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 分析, 共获得 546 个相互作用关系, 去除孤立节点后获得 252 个基因, 546 个相互作用关系, 相互作用最小值 (minimum required interaction score) confidence 设置为 0.95 (图 6)。

5. 关键基因筛选

将蛋白质-蛋白质相互作用分析结果用 Cytoscape3.5.1 分析软件中的 cytoHubba 程序包进行分析, 将 cytoHubba 中 12 种算法各自获得的前 30 个关键基因求交集, 选定在 12 种算法中出现 8 次及以上的基因, 共获得 15 个基因, 分布在 6 个信号通路中 (见表 2 有下划线基因), 其中上调的基因有 9 个, 分别是 SPP1、TIMP1、CCND1、FN1、ICAM1、MMP-7、APOE、TNC、MET, 下调的基因有 6 个, 分别是 JUN、BCL2、CXCL12、KIT、BMP2、IRS1。

6. 关键基因的生存分析

利用 UALCAN 数据库, 分析 59 个正常组织样

本和 505 个甲状腺癌组织样本进行关键基因的表达水平和生存分析。结果表明 (图 7), 基于 APOE、BCL2、BMP2 和 KIT 的表达水平的变化, 甲状腺癌患者生存率的差异较为明显, 均 $P < 0.1$ (APOE $P = 0.013$ 、BCL2 $P = 0.0045$ 、BMP2 $P = 0.079$ 、KIT $P =$

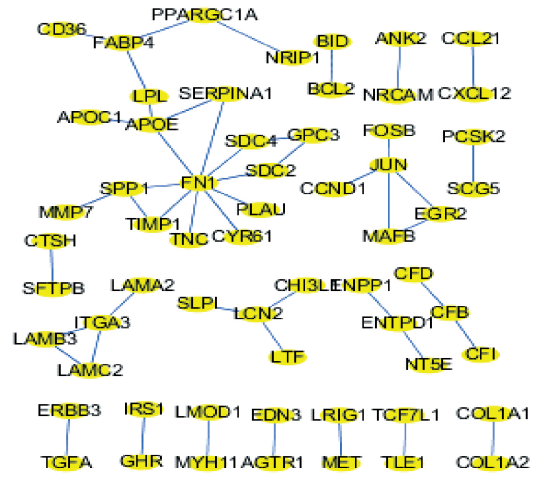


图 6 差异表达基因的蛋白质互作网络

Fig.6 The PPI networks of differentially expressed genes

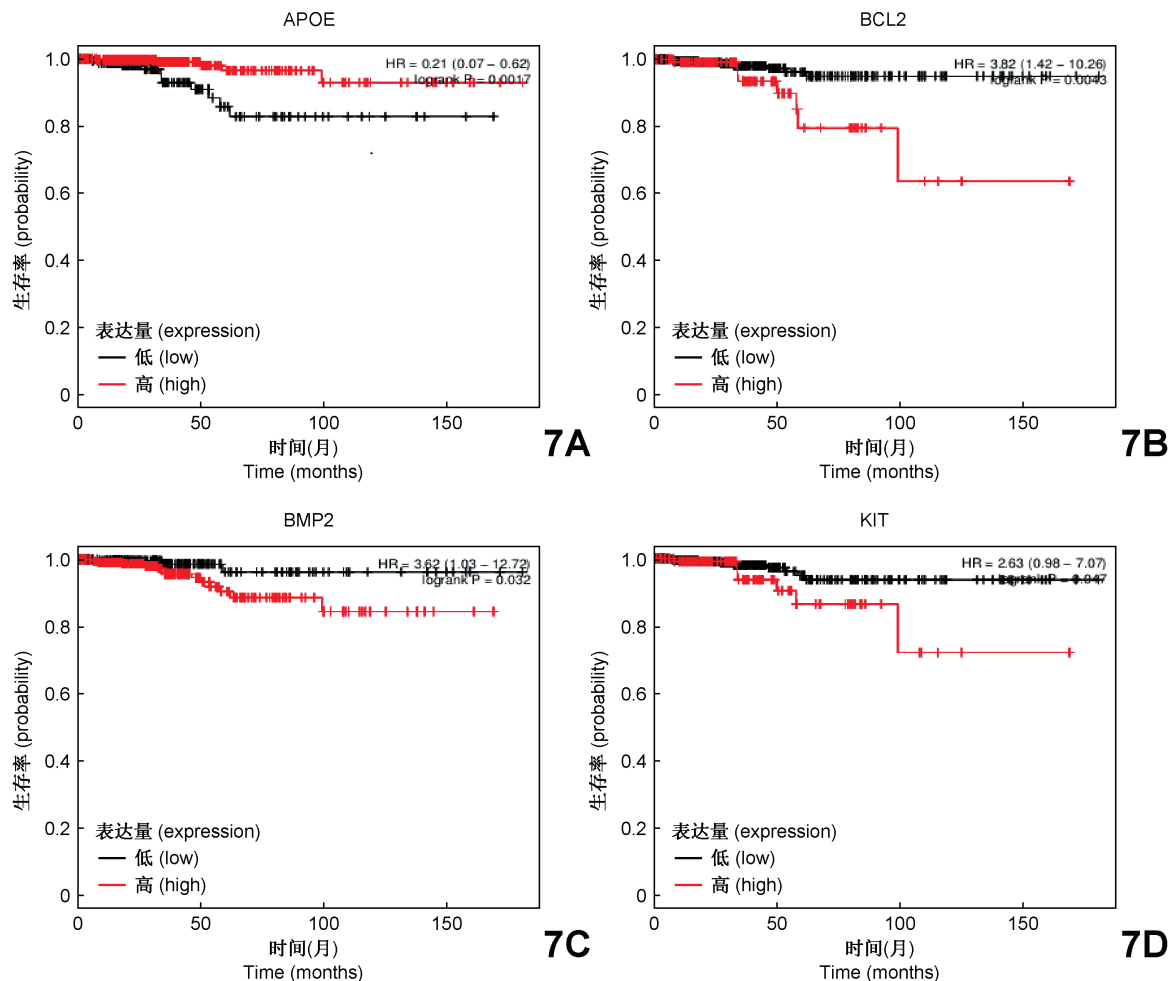


图 7 A、B、C 和 D 分别表示甲状腺癌 APOE、BCL2、BMP2 和 KIT 基因表达变化与预后生存率的关系

Fig.7 A, B, C and D respectively indicate the relationship between the expression of gene (APOE, BCL2, BMP2, KIT) and prognosis

0.064)。从这 4 个基因的生存曲线结果可以看出,除 APOE 外随着基因的表达增高患者的生存率明显下降,说明这些基因的高表达促进了甲状腺癌的发展,而且从生存曲线可以看出,4 个基因对肿瘤的影响程度不一致,其中 BCL2 与 KIT 短期低表达时的生存曲线与高表达时相贴近,生存率均较高,但长期随访则在低表达时患者生存率较高,说明这些基因对甲状腺癌的发展影响较大,对患者生存时间影响较大。

讨 论

甲状腺癌是全球增长最快的癌症之一,PTC 是最常见的甲状腺癌类型,占有甲状腺恶性肿瘤 89.9%^[6]。然而,PTC 的生物学机制仍不清楚。高通量基因组技术加强了我们对癌症发展与基因组背景之间复杂相互作用的理解,但是,研究结果的可重复性和稳定性并不一致^[7]。将来自多个微阵列数据集的信息相结合可以提高结果的可靠性。在本研究中,我们整合了来自 GEO 数据库的 7 个合格微阵列,以确定 PTC 相对于正常甲状腺组织的差异表达基因。据我们所知,这是目前 PTC 研究的第 1 次尝试。

本研究整合的 GEO 数据库中 7 个 GSE 系列中的 PTC 和癌旁组织样本,共筛选出 302 个差异基因,其中包括上调基因 149 个,下调基因 153 个。根据筛选基因的结果进行通路分析,我们发现,在 KEGG 分析中,差异基因主要富集在细胞外基质受体相互作用、肿瘤中转录失调、补体和凝血级联、酪氨酸代谢、肿瘤中的 microRNA 调控和 PPAR 与甲状腺癌有关的通路中。通过 Cytoscape3.5.1 分析软件筛选出的 15 个关键基因中有 12 个基因位于细胞外基质受体相互作用 (ECM-receptor interaction) 信号通路中。细胞外基质由基底膜和细胞间质组成,为肿瘤转移的重要组织屏障。肿瘤细胞通过其表面受体与 ECM 中的各种成分黏附后激活或分泌蛋白降解酶类来降解基质,从而形成局部溶解区,构成了肿瘤细胞转移运行通道,协助肿瘤细胞穿过 ECM 进入血管,然后在某些因子的作用下运行并穿过血管壁外渗到继发部位,继续增殖、形成转移灶。在本实验中细胞外基质相互作用信号通路高表达,表明细胞连接作用在肿瘤组织浸润、转移过程中发挥着重要作用。另外,通过 GO 生物学组分分析,发现 82 个差异基因表达的蛋白分布在外泌体中,外泌体在细胞间通讯中起重要作用,可能是癌症转移性级联的介质。

15 个关键基因中 9 个基因表达上调,已有研究表明,分泌型磷蛋白 1 (secretory phosphoprotein 1,

SPP1)^[8]、金属蛋白酶抑制剂 1 (tissue inhibitor of metalloproteinases-1, TIMP1)^[9,10]、细胞周期素 D1 (cyclin D1, CCND1)^[11]、细胞间黏附分子 1 (intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM1)、纤维连接蛋白 1 (fibronectin 1, FN1)^[12] 和间质表皮转化因子 (mesenchymal to epithelial transition factor, MET)^[13] 6 个基因可作为 PTC 的诊断和预后的分子标记,这些基因在甲状腺癌患者中高表达,激活了信号通路,导致 PTC 的发生。其中 SPP1 是一种骨桥蛋白,在 PTC 细胞中过表达,可增强甲状腺癌的侵袭能力。CCND1 是细胞周期蛋白,与细胞周期 G₁/S 转换有关^[11],参与了细胞周期调控。TIMP1 属于 TIMP 基因家族,该基因家族编码的蛋白质能够在广泛的细胞类型中促进细胞增殖,并且还可以具有抗凋亡功能^[9,10]。Zhang 等^[14] 研究发现,ICAM1 是检测桥状甲状腺炎 (hashimoto thyroiditis, HT) 中 PTC 样本的敏感标记。FN1 参与细胞的黏附和迁移过程。MET 是一个原癌基因。基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP-7)、TNC、APOE 也均表现出甲状腺癌有较高相关性。MMP-7 属于基质金属蛋白酶 M10 家族,Buergy 等^[15] 研究发现,M10 家族的 MMP-4 和 MMP-9 可作为区分甲状腺瘤和甲状腺癌分子标志物。Qiu 等^[16] 研究表明,TNC 可能通过与 FN1 相互作用在 PTC 中发挥作用。APOE 主要在脂蛋白代谢中起作用,Ito 等^[17] 研究发现,APOE 的高表达是未分化甲状腺癌生物学特征之一。

在 6 个下调的关键基因中,KIT^[18]、BCL2^[11] 和 CXCL12^[19] 可作为 PTC 的诊断和预后的分子标记。其中 KIT 和 BCL2 基因在细胞外基质受体相互作用信号通路中,通过生存分析发现,这两个基因的表达与患者的生存时间息息相关,推测 KIT 和 BCL2 通过细胞外基质受体相互作用信号通路影响甲状腺癌的发展。KIT 又被称为原癌基因受体酪氨酸激酶,在调节细胞存活和增殖、迁移等方面起重要作用,而 BCL2 又被称为细胞凋亡调节剂,可以阻断细胞的凋亡。CXCL12 又被称为趋化因子 (CXC 基序) 配体,是一种 G 蛋白耦联受体 (G protein-coupled receptors, GPCRs) 的配体,可能通过甲基化来调控基因表达调控 PTC 发展^[19]。有关胰岛素受体底物 1 (insulin receptor substrate 1, IRS 1),Law 等^[20] 研究显示,GPCRs 通过蛋白激酶 A (protein kinase, PKA) 与 IRS1 的相互作用,激活磷脂酰肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B (phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B, PI3K/Akt) 途径。骨形态发生蛋白 2 (bone morphogenetic protein 2, BMP2) 主要在骨和软骨的形成中起作用,Takeda 等^[21] 研究发现,具有异位骨

化的 PTC 作为一种新亚型,比没有异位骨化的甲状腺癌患者具有更高的淋巴转移,它们之间区分的 1 个重要标志就是 BMP2 的差异表达。JUN 又被称为 AP-1 转录因子亚基,在激活细胞生长和分化、凋亡、细胞转化等方面起重要作用^[22],Luo 等^[23]研究发现, JUN 在食管鳞状细胞癌调节分化相关基因,并且显著减少,我们推测 JUN 在 PTC 中同样起重要作用。

综上所述,我们利用生物信息学技术对来自 7 个 PTC 微阵列数据集的信息进行分析,采用了大样本分析,提高了结果的可靠性和稳定性。筛选出 302 个差异基因,利用这些基因进行 GO 和 KEGG 富集分析,揭示了这些基因的生物学功能和主要涉及的信号通路;利用蛋白质-蛋白质相互作用分析筛选出了 15 个关键基因,发现 12 个位于细胞外基质相互作用信号通路中,说明此信号通路在甲状腺癌的发生发展中具有重要的作用,而此通路在甲状腺癌的研究中还未引起重视,这一发现可为 PTC 潜在分子标志物的筛选以及进一步研究 PTC 分子机制、诊断和预后提供参考。

参 考 文 献

- [1] Davies L, Welch HG. Current thyroid cancer trends in the United States [J]. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*, 2014, 140(4): 317-322.
- [2] Brito JP, Hay ID, Morris JC. Low risk papillary thyroid cancer [J]. *BMJ*, 2014, 348: g3045
- [3] Nix P, Nicolaides A, Coatesworth AP. Thyroid cancer review I: presentation and investigation of thyroid cancer [J]. *Int J Clin Pract*, 2005, 59(11): 1340-1344.
- [4] 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.
- [5] Lalami Y, Awada A. Recurrent thyroid cancer: a molecular-based therapeutic break-through [J]. *Curr Opin Oncol*, 2011, 23(3): 235-240.
- [6] Gao M, Zheng XQ. Thyroid cancer over the past decade and the next decade [J]. *Chinese Journal of Clinical Oncology*, 2018, 45(1): 2-6. (in Chinese)
高明, 郑向前. 甲状腺癌过去与未来十年 [J]. *中国肿瘤临床*, 2018, 45(1): 2-6.
- [7] Michiels S, Koscielny S, Hill C. Prediction of cancer outcome with microarrays: a multiple random validation strategy [J]. *Lancet*, 2005, 365(9458): 488-492.
- [8] Guarino V, Faviana P, Salvatore G, et al. Osteopontin is overexpressed in human papillary thyroid carcinomas and enhances thyroid carcinoma cell invasiveness [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(9): 5270-5278.
- [9] Gubała E, Wieniec M, Oczko-Wojciechowska M, et al. Gene expression analysis by DNA microarray in papillary thyroid cancer. *Endokrynol Pol [J]*. *Endokrynol Pol*, 2005, 56(5): 752-727.
- [10] Hawthorn L, Stein L, Varma R, et al. TIMP1 and SERPIN-A overexpression and TFF3 and CRABP1 underexpression as biomarkers for papillary thyroid carcinoma [J]. *Head Neck*, 2004, 26(12): 1069-1083.
- [11] Lamba Saini M, Bouzin C, Weyand B, et al. An appraisal of proliferation and apoptotic markers in papillary thyroid carcinoma: an automated analysis [J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0148656.
- [12] da Silveira Mitteldorf CA, Juliana Moreira, de Sousa-Canavez, et al. FN1, GALE, MET, and QPCT overexpression in papillary thyroid carcinoma: molecular analysis using frozen tissue and routine fine-needle aspiration biopsy samples [J]. *Diagn Cytopathol*, 2011, 39(8): 556-561
- [13] Koo BS, Kim JM, Seo ST, et al. Upregulation of HGF and c-MET is associated with subclinical central lymph node metastasis in papillary thyroid microcarcinoma [J]. *Ann Surg Oncol*, 2014, 21(7): 2310-2317
- [14] Zhang KE, Ge SJ, Lin XY, et al. Intercellular adhesion molecule 1 is a sensitive and diagnostically useful immunohistochemical marker of papillary thyroid cancer (PTC) and of PTC-like nuclear alterations in Hashimoto's thyroiditis [J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(3): 1722-1730.
- [15] Buergy D, Weber T, Maurer GD, et al. Urokinase receptor, MMP-1 and MMP-9 are markers to differentiate prognosis, adenoma and carcinoma in thyroid malignancies [J]. *Int J Cancer*, 2009, 125(4): 894-901.
- [16] Qiu J, Zhang W, Xia Q, et al. Investigating the mechanisms of papillary thyroid carcinoma using transcriptome analysis [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(5): 5954-5964.
- [17] Ito Y, Takano T, Miyauchi A. Apolipoprotein E expression in anaplastic thyroid carcinoma [J]. *Oncology*, 2006, 71(5-6): 388-393.
- [18] Chitikova Z, Pusztaszeri M, Makhlof AM. Identification of new biomarkers for human papillary thyroid carcinoma employing NanoString analysis [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(13): 10978-10993.
- [19] Zhang S, Wang Y, Chen M, et al. CXCL12 methylation-mediated epigenetic regulation of gene expression in papillary thyroid carcinoma [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 44033.
- [20] Law NC, White MF, Hunzicker-Dunn ME. G protein-coupled receptors (GPCRs) that signal via protein kinase A (PKA) cross-talk at insulin receptor substrate 1 (IRS1) to activate the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT pathway [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(53): 27160-27169.
- [21] Takeda M, Mikami T, Numata Y, et al. Yoshiko numata papillary thyroid carcinoma with heterotopic ossification is a special subtype with extensive progression [J]. *Am J Clin Pathol*, 2013, 139(5): 587-598.
- [22] Ip YT, Davis RJ. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)—from inflammation to development. [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1998, 10(2): 205-219.
- [23] Luo A, Yu X, Li G. Differentiation-associated genes regulated by c-jun and decreased in the progression of esophageal squamous cell carcinoma [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e96610.