

甲状腺癌肿瘤干细胞相关基因分析



谢丽君^{1,*}, 杨桂梅²

¹ 昆明医科大学第一附属医院核医学科, 云南昆明 650032

² 昆明医科大学药学院暨省天然药物药理重点实验室, 云南昆明 650500

摘要: 目的: 临床上不同类型甲状腺癌出现复发和耐药与肿瘤干细胞存在一定联系。通过探讨不同甲状腺癌细胞系的肿瘤干细胞相关基因转录水平的差异及与肿瘤通路的相关性以发现影响甲状腺癌进展的因素。方法: 伤口愈合实验分析细胞迁移; 比较不同甲状腺癌细胞系肿瘤干细胞相关基因 CD133、OCT4、ABCG2、ALDH2、Nanog、CD44、CD24、EMT 及甲状腺特异基因转录水平; 利用 R 软件 GSVA 包结合 TCGA 数据库分析上述基因与肿瘤通路的相关性及基因间的相关性。结果: 伤口愈合结果示甲状腺癌细胞系 TPC-1 和 ATC 的愈合能力较正常的细胞快。qPCR 示与 Nthy-ori 3-1 相比, EGFR、CD44、CD24 和 ABCG2 在 ATC 和 TPC-1 的表达具有显著性差异, EGFR 和 ABCG2 在 ATC 高表达, 而 CD24 基因却在 TPC-1 中高表达; TTF2 在 ATC 和 TPC-1 均显著低表达。相关性分析示在甲状腺癌中 ABCG2 和 OCT4 与炎症反应、ALDH2 与 P53 信号通路、CD24 与 ECM 降解和 P53 信号通路、Nanog 与 MYC 靶基因通路、CD44 与活性氧 (ROS) 基因上调均呈显著负相关; EGFR 与 TGFB 信号通路呈显著正相关。基因 ALDH2、ABCG2、CD44 与 TPO 和 TG 呈显著正相关。结论: 不同类型甲状腺癌的肿瘤干细胞相关基因转录水平差异大且与肿瘤信号通路有显著的联系, 可能与加剧甲状腺癌的进展有关。

关键词: 甲状腺癌; 肿瘤干细胞相关基因; 转录水平; 相关性分析

DOI: [10.57237/j.mrf.2022.01.001](https://doi.org/10.57237/j.mrf.2022.01.001)

Gene Analysis of Cancer Stem Cells in Thyroid Cancer

Xie Lijun^{1,*}, Yang Guimei²

¹Department of Nuclear Medicine, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, China

²School of Pharmacy and Provincial Key Laboratory of Natural Drug Pharmacology, Kunming Medical University, Kunming 650500, China

Abstract: *Objective* Recurrence and drug resistance in different thyroid cancer in the clinic are associated with tumor stem cells. To investigate the differences in transcript levels of tumor stem cell-associated genes in different thyroid cancer cell lines and their correlation with tumor pathways for identifying factors affecting thyroid cancer progression. *Methods* Wound healing assay was performed to analyze cell migration; to compare the transcript levels of tumor stem cell related genes CD133, OCT4, ABCG2, ALDH2, Nanog, CD44, CD24, EMT and thyroid specific genes in different thyroid cancer cell lines; to analyze the correlation between the above genes and tumor pathways and the correlation between genes using R software GSVA package combined with TCGA database. *Results* Wound healing results showed that thyroid cancer cell lines TPC-1 and ATC healed faster than normal cells. qPCR showed significantly different expression of EGFR, CD44, CD24 and ABCG2 in ATC and TPC-1 compared to Nthy-ori 3-1. EGFR and ABCG2 were

*通信作者: 谢丽君, 421894079@qq.com

highly expressed in ATC cell lines, while CD24 gene was highly expressed in TPC -1; TTF2 was significantly low expressed in both ATC and TPC-1 cell lines. Correlation analysis showed that ABCG2 and OCT4 were negatively correlated with inflammatory response, ALDH2 with P53 signaling pathway, CD24 with ECM degradation and P53 signaling pathway, Nanog with MYC target gene pathway, and CD44 with reactive oxygen species (ROS) gene upregulation in thyroid cancer; EGFR was positively correlated with TGFB signaling pathway. The genes ALDH2, ABCG2 and CD44 were significantly and positively correlated with TPO and TG. *Conclusion* The transcriptional levels of tumor stem cell genes differed greatly among different types of thyroid cancer and were significantly associated with tumor signaling pathways. It may be related to signaling pathways that exacerbate the development of thyroid cancer.

Keywords: Thyroid Cancer; Tumor Stem Cell-Associated Gene; Transcript Level; Correlation Analysis

1 引言

甲状腺癌(thyroid cancers, TCs)具有高度异质性, 是内分泌肿瘤中最常见的肿瘤。甲状腺癌按其恶性程度可分为分化良好的甲状腺癌(well differentiated thyroid carcinoma, WDTC)、低分化甲状腺癌(poorly differentiated thyroid cancer, PDTC)和未分化甲状腺癌(undifferentiated thyroid carcinoma, UTC)。近年来甲状腺癌在全球发病率呈快速上升趋势, 但原因不详。目前可通过细针穿刺活检(fine needle aspiration biopsy, FNA), 病理检测进行鉴别诊断, 然而在某些情况下患者仍需要进行手术。尽管通过手术加放射性碘辅助治疗能根除大多数原发性甲状腺癌, 但对晚期和未分化或分化型甲状腺癌在治疗过程中癌细胞的形态和功能均发生退行性改变导致失分化后的治疗仍然是临床一大难题。研究指出肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)的存在影响 TCs 的侵袭和对临床治疗的抵抗性[1]。但仍缺乏甲状腺癌肿瘤干细胞在甲状腺癌发生发展中的重要研究, 因此, 本研究通过观察比较不同类型甲状腺癌细胞系的肿瘤干细胞相关基因转录水平的差异变化, 结合 TCGA 数据库分析本文获得的基因在甲状腺癌发病机制中可能存在的影响, 从而更好地了解甲状腺肿瘤的增殖情况, 为甲状腺癌的诊治提供重要的科学依据。

2 材料和方法

2.1 细胞株和细胞培养

人正常甲状腺细胞株(Nthy-ori 3-1)、人 TPC-1 细胞株和 ATC 细胞株(8305C)购自北京贝纳生物有限公司。所有甲状腺癌细胞株均用 DMEM 培养基

(Hyclone)、10%胎牛血清(Gibco), 以及 100UI/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素(Gibco)组成的完全培养液进行培养, 并在含 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的加湿环境的培养箱(Thermo scientific)培养。Nthy-ori 3-1 则在 RPMI 1640 培养基(Hyclone)、加入 10% FBS、100UI/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素组成的完全培养基培养, 培养条件为 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的加湿环境。所有的细胞均在同一条件下传代至第七代进行实验。

2.2 细胞活力检测

把上述细胞分别稀释为 5000 个细胞/孔, 铺板于 96 孔板, 加入完全培养液(DMEM 或 RPMI 1640 培养液+10%FBS)进行培养 24 小时后, 每孔各加入 10 μ l CCK-8 溶液+90 μ lDMEM 或 RPMI 1640 培养液, 将培养板放入培养箱中孵育 2h。酶标仪测定 450nm 处的吸光值(OD)。只加入培养液的孔为空白对照组, 每种细胞进行 3 个重复。

2.3 细胞愈合实验

细胞铺板之前, 在 6 孔板的底部用笔画出三条具有相同间距的水平线, 贯穿于板的每个孔。将 1 \times 10⁶个 TPC-1、ATC 和 Nthy-ori 3-1 分别均匀地放入 6 孔板中, 过夜后细胞融合度应为 100%。第二天, 用微吸管尖垂直于底部的水平线按尺子的方向划出一道伤口, 枪尖应垂直。然后用 PBS 冲洗细胞, 加入新鲜的完全培养基。随后, 将 6 孔板置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的恒温培养箱中培养。在 0h、4h、8h、24h 取出培养板, 在倒置显微镜下拍摄同一视野下的照片。用 Image J 软件计算细胞间的面积。每种细胞 3 个重复。

2.4 RNA 分离和 qRT-PCR 检测

使用 TRIzol 试剂 (Takara) 从 3 种第七代细胞株样品中分别分离总 RNA。将 200μl 氯仿(Sigma)加入到 TRIzol 匀浆中, 在 4℃ 下, 12,000g/min 的离心机 (赛默飞) 离心 15min, 并将上层水层转移到干净的 Eppendorf 管中, 其中含有等体积的异丙醇(Sigma)。将混合悬浮液在 4℃, 转速为 12,000g/min 的离心机进行离心, 离心 15min, 然后收集沉淀。用 70%乙醇洗涤后, 将总 RNA 溶解在无 RNase 的水中, 并通过凝胶电泳评价 RNA 的质量。用分光光度计 (赛默飞) 分别在

A260 和 A260/280 下用光密度测定 RNA 浓度和纯度, 并将提取的总 RNA 储存在 80℃ 以备后续实验。

使用 TransScript All-in-One First-Strand cDNA Synthesis Kit (天根有限公司) 将 RNA 反转录成第一链 cDNA, cDNA 用于 RT-PCR 和实时荧光定量 PCR 检测, 以人 GADPH 基因为内对照。最终的 qRT-PCR 反应混合液含有 10μL SYBR Green qPCR Master Mix。扩增按以下步骤进行: 94℃ 变性 5 分钟, 然后在 94℃30 秒、58℃30 秒和 72℃30 秒下进行 40 个循环扩增。使用 2^{-ΔΔCt} 法测定相对 mRNA 水平, 所有实验至少进行三次。qPCR 的引物如下:

表 1 甲状腺癌肿瘤干细胞相关基因及特异基因引物设计

基因 (Gene)	引物序列 (Primer sequences of various of PCR)	产物大小 (Product size(bp))
CD133	F:5'- CACTACCAAGGACAAGGCGT -3' R: 5'- TCCAACGCCTCTTTGGTCTC -3'	153
OCT4	F:5'- GGTCCGAGTGTGGTTCTGTA-3' R:5'-GCAGCCTCAAAATCCTCTCG-3'	84
ABCG2	F:5'- GCTACACCACCTCCTTCTGT -3' R: 5'- GGAAGAAGAGAACCCAGCT-3'	195
ALDH2	F: 5'- CTTCGCCCTGTTCTTCAACC -3' R: 5'- CTGAGTTTCATCCACCTGCG 3'	175
Nanog	F:5'- GGCCTCAGCACCTACCTAC-3' R: 5'- GGTTGCTCCAGGTTGAATTGT 3'	122
CD44	F:5'-CTGATGATGACGTGAGCAGC-3' R: 5'- ACTGTCTTCGTCTGGGATGG-3'	107
CD24	F:5'-TGGTCCTAAGCCTAAAAGTGGG3' R: 5'- TCAGTGTGTGACCATGCGAA 3'	123
EMT	F: 5'-ACTTGCTATCCTGCCTTGGT-3' R: 5'- AAGTCATCACGTCCCCTTT-3'	123
EGFR	F:5'- GTGAGCCAAGGGAGTTTGTG-3' R: 5'-AGGTGATGTTTCATGGCCTGA -3'	81
NIS	F:5'- ATGCTAAGTGGCTTCTGGGT-3' R: 5'- CCTCGGGTCAGGGTTAAAGT-3'	126
TPO	F: 5'- CGGACCCCTACGAGTTAGGA -3' R: 5'- TGGATTAGTGCCAGTGCGT 3'	165
TG	F:5'- TCCAGTGCCAGAACGACG -3' R:5'- TGACACTGAGGGAGGTAGGAG3'	181
TTF-2	F: 5'- CACGTTTCATGCAGTGTGGAA -3' R: 5'- ATGCCTGCTTCTGGTGTAGT -3'	142
GADPH	F:5'- TGTTGCCATCAATGACCCCT -3' R: 5'- TCGCCCCACTTGATTTTGGA -3'	177

2.5 基因与信号通路相关性分析以及多基因相关性分析

从癌症基因组图谱 (TCGA) 数据库 (<https://portal.gdc.com>) 获得了甲状腺肿瘤 (n=510 个样品) 的 RNAseq 数据和相应的临床信息。并收集相应通路中包含的基因, 通过 R 软件 GSVA 包进行分析, 选择参数 method='ssGSEA', 最后通过斯皮尔曼

(Spearman) 相关性分析肿瘤干性基因与主要肿瘤相关通路得分的相关性。而肿瘤干性基因与甲状腺特异基因之间的多基因相关性图通过 v4.0.3 版 R 软件包 pheatmap 进行展示并使用 Spearman 的相关分析来描述没有正态分布的定量变量之间的相关性 (https://www.aclbi.com/static/index.html#/functional_analysis), p<0.05 被认为具有统计学意义。

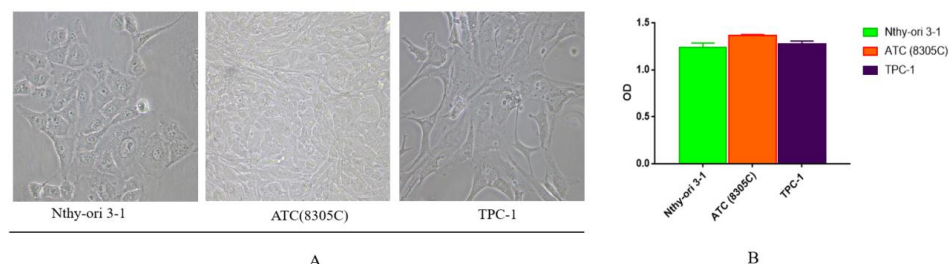
3 统计学处理

统计分析结果均用平均值 \pm 标准差表示，应用 Graphpad prism7.0 软件包进行统计学分析。两组比较采用 t 检验， $P^* < 0.1$ ， $P^{**} < 0.05$ ， $P^{***} < 0.01$ 为差异有统计学意义。

4 结果

4.1 甲状腺癌细胞形态及细胞活力测定

倒置显微镜观察可见贴壁的 Nthy-ori 3-1 呈圆形或椭圆形生长，贴壁的 ATC 细胞呈类圆形生长，贴壁的 TPC-1 细胞呈梭形生长（见图 1A）。对 Nthy-ori 3-1、ATC 细胞和 TPC-1 细胞培养至 24 小时后获得的 OD 值相当，说明三种细胞均处于相似的生长的状态（见图 1B）。

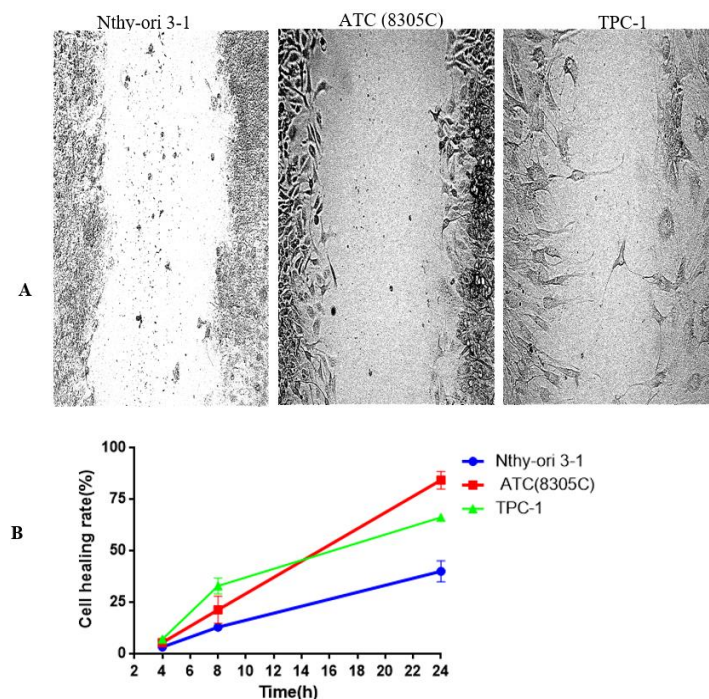


备注：A：细胞在倒置显微镜下的形态；B：细胞 OD 值检测结果

图 1 甲状腺癌细胞形态及细胞状态测定结果。

4.2 甲状腺癌细胞愈合实验

不同细胞株被划痕后分别在 0h、4h、8h 和 24h 测量划痕的面积。结果显示，在 0~8h 之间，各细胞株迁移速度为 TPC-1>ATC>Nthy-ori 3-1，而在 24h 时各细胞株的迁移速度为 ATC>TPC-1>Nthy-ori 3-1，三株细胞株的迁移速度无统计学意义 ($P>0.05$)（图 2）。



备注：A：不同细胞在划痕 8h 的细胞图；B：不同细胞在划痕不同时间点的细胞愈合情况

图 2 甲状腺细胞及甲状腺癌细胞愈合能力比较。

4.3 肿瘤干细胞相关基因和甲状腺特异蛋白相关基因转录水平

肿瘤干细胞相关基因的 qPCR 结果显示：与 Nthy-ori 3-1 相比，EGFR、CD44、CD24 和 ABCG2 在 ATC 和 TPC-1 细胞株的表达具有显著性差异，EGFR 和 ABCG2 在 ATC 细胞株高表达，而 CD24 基因却在

TPC-1 中高表达。在 ATC 和 TPC-1 细胞株相互比较中可见 OCT4、CD24 和 ABCG2 的相对表达量具有统计学意义（见图 3A）。

甲状腺特异蛋白相关基因的 qPCR 结果显示：与 Nthy-ori 3-1 相比，TTF2 在 ATC、TPC-1 细胞株显著低表达。在 ATC 和 TPC-1 细胞株相比较中 TG 和 TTF2 基因表达量则具有统计学意义（见图 3B）。

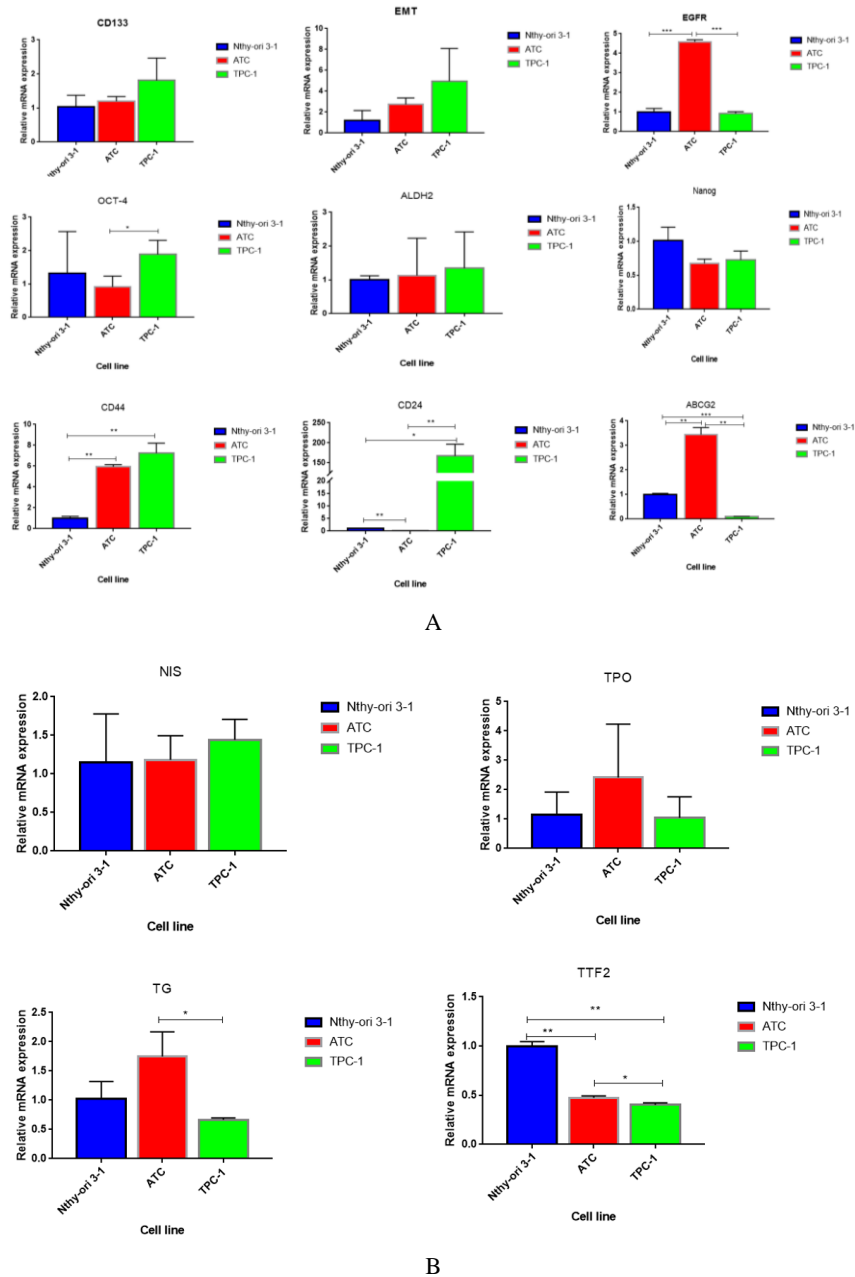


图 3 肿瘤干细胞相关基因以及甲状腺特异基因在三种细胞中的相对表达量比较

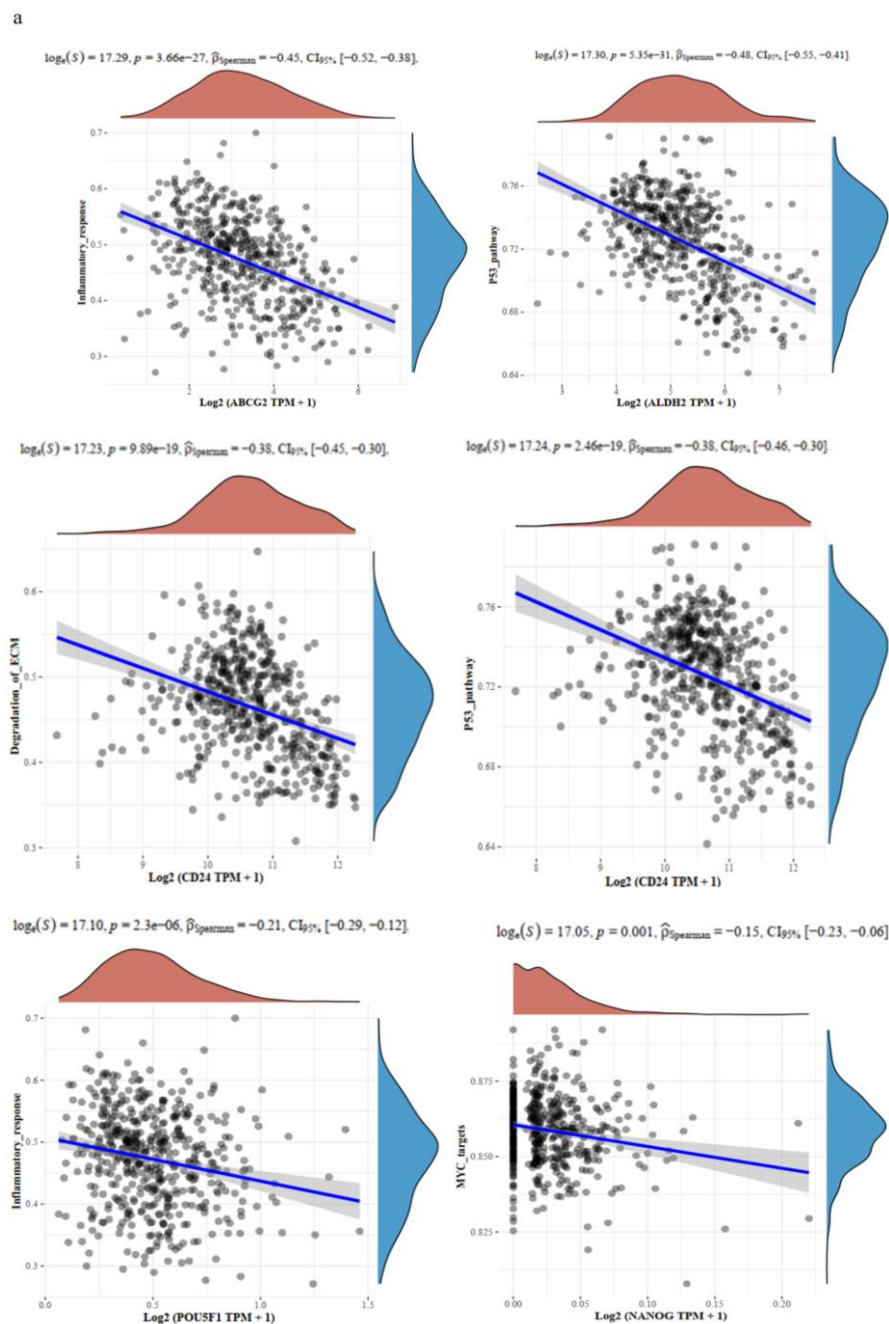
备注：A：肿瘤干细胞相关基因在三种细胞中相对表达量比较；B：甲状腺特异基因在三种细胞中的相对表达量比较，P***<0.01，P**<0.05，P*<0.1。

4.4 肿瘤干细胞相关基因与信号通路相关性分析以及多基因相关性分析

从癌症基因组图数据库通过 R 软件 GSVA 包 (https://www.aclbi.com/static/index.html#/functional_analysis) 对结果 4.3 的基因进行主要肿瘤信号通路相关性分析可见 (见图 4a), 肿瘤干细胞相关基因与 19 种肿瘤信号通路均具有不同程度的正相关和负相关。其中, ABCG2 和 OCT4 (POU5F1) 与炎症反应、ALDH2

与 P53 信号通路、CD24 与 ECM 降解和 P53 信号通路、Nanog 与 MYC 靶基因通路、CD44 与活性氧 (ROS) 基因上调均呈显著负相关; EGFR 与 TGF- β 信号通路呈显著正相关。

热图 (见图 4b) 表示在甲状腺肿瘤干细胞相关基因与甲状腺特异基因之间的相关性, 蓝色代表正相关, 红色代表负相关, 颜色越深代表二者之间相关性越强。肿瘤干细胞相关基因 ALDH2、ABCG2、CD44 与甲状腺特异基因 TPO 和 TG 呈显著正相关。



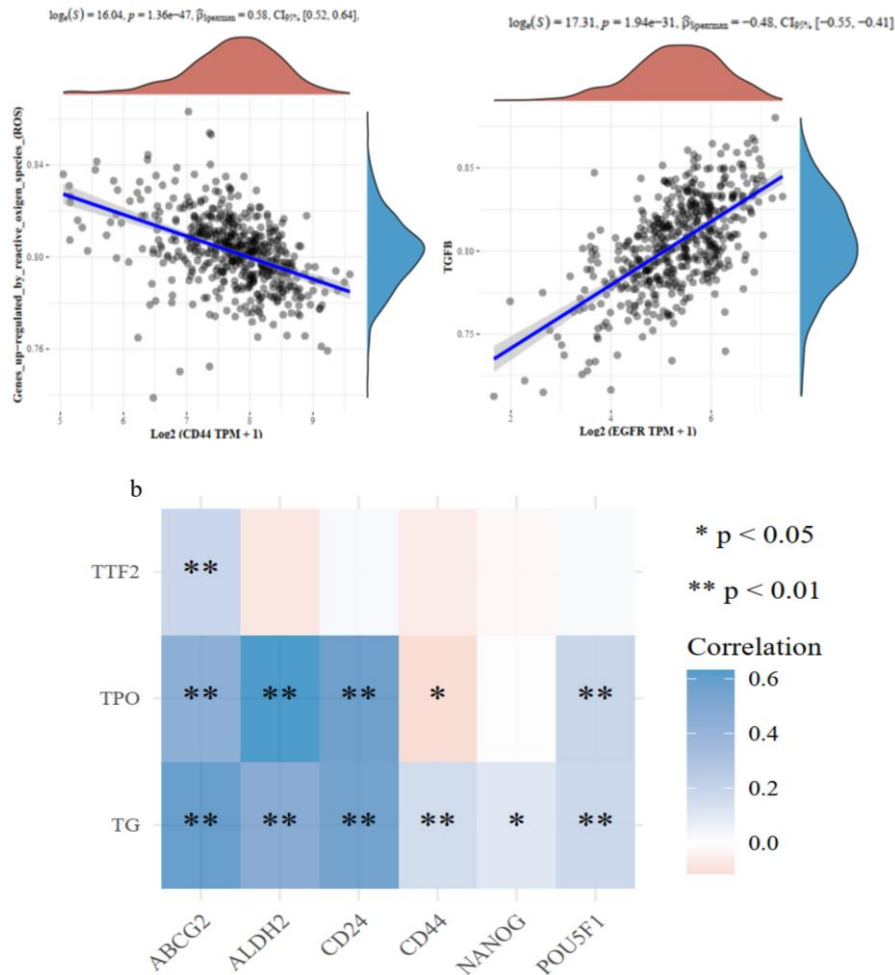


图 4 基因与信号通路相关性多基因相互比较相关系分析结果

备注：a：肿瘤干细胞相关基因与肿瘤信号通路相关性分析结果。
b：肿瘤干细胞相关基因与甲状腺特异基因相关性热图。

5 讨论

恶性肿瘤各个阶段都受到不同因子和相关基因的调控，在其发生发展中可出现多基因参与、多阶段进行。研究指出肿瘤干细胞可能是肿瘤转移的“种子细胞”[2]，在肿瘤转移和复发中起重要作用。甲状腺干细胞/祖细胞可能是甲状腺组织再生和肿瘤形成的起源细胞。这项研究中，我们选取不同类型的甲状腺癌细胞进行肿瘤干细胞相关基因分析以及检测甲状腺特异蛋白基因的表达量研究。TPC-1 和 ATC 细胞相同基因的表达差异较大，CD44 在 TPC-1 和 ATC 细胞中高表达，CD24 在 TPC-1 中高表达，却在 ATC 低表达。研究发现多数肿瘤干细胞表达高水平 CD44 和低水平 CD24，CD44⁺/CD24⁻细胞存在于甲状腺乳头状癌[3-5]。Nanog

也是另一个重要的干细胞标志物，与 CSC 的自我更新有关，而胚胎来源的肿瘤可表达 Nanog 基因[6]，本文 TPC-1 和 ATC 存在 CD24、CD44、Nanog 基因的表达，提示不同类型的甲状腺癌均可能存在部分肿瘤干细胞以影响肿瘤进展。肿瘤组织中高表达 ATP 结合转移蛋白 G 超家族成员 2 (ATP binding transfer protein G superfamily member 2, ABCG2)，该转运体可促进肿瘤细胞将化疗药物泵出胞外导致肿瘤耐药发生，是公认的肿瘤干细胞标记物之一，本研究发现 ABCG2 基因在 ATC 高表达，却低表达于 TPC-1，提示未分化甲状腺癌细胞可能存在耐药的根源，从而使未分化甲状腺癌的治疗效果比高分化甲状腺癌的差。

上皮-间充质转变 (epithelial mesenchymal transformation, EMT) 是肿瘤进展中一个重要标志，对提示细胞的转移和侵袭具有重要作用。多数干细胞

通过 Wnt, Shh, Notch 等增殖信号通路和 TGF- β 等增生抑制性信号通路协调干细胞的分裂和分化, 维持机体干细胞数目的恒定, 诱发 EMT 转换过程并参与肿瘤干细胞样细胞的肿瘤自我更新[7], 增强了肿瘤耐药性[8], 调控肿瘤发生[9]。学者发现 EMT 促进甲状腺滤泡状癌 FTC133 侧群细胞的比例, 肿瘤干细胞的分选效率也明显升高, 分选的肿瘤干细胞出现了典型的自我更新及体外致瘤能力[10]。本研究 ATC 和 TPC-1 均存在 EMT 的表达, 说明甲状腺癌可能存在部分细胞发生了 EMT, 为不同类型的甲状腺癌侵袭能力提供条件。在体外细胞愈合试验中, 甲状腺癌细胞株的迁移能力比正常甲状腺细胞的强, 进一步证实了甲状腺癌因存在肿瘤干细胞参与而表现出明显的迁移能力, 与甲状腺癌细胞高表达 EMT 有关, 也是肿瘤远处转移的根源所在。此外, 表皮生长因子受体(epidermal growth factor, EGFR) 高表达于甲状腺癌组织中, 且与淋巴结转移、肿瘤组织学程度、临床分期有关, 提示肿瘤侵袭力的强弱[11]。而 ATC 细胞 EGFR 基因异常高表达, 其表达水平是经典型 TPC-1 以及正常甲状腺细胞的 5 倍或以上, 提示未分化型甲状腺癌 ATC 的侵袭力比分化良好的 TPC-1 强得多。

炎症被认为是肿瘤发展过程中重要的组成部分, 应激可激活炎症反应, 释放的炎症因子与肿瘤细胞会相互作用, 进一步影响肿瘤微环境从而促进肿瘤形成[12]。MYC 在恶性肿瘤的发生发展和肿瘤干细胞性能维持具有重要作用, 研究指出抑制 MYC 的表达可降低乳腺癌细胞端粒酶的活性, 从而抑制癌细胞的生长期[13]。在本文通过 TCGA 分析获得肿瘤干细胞相关基因 ABCG2、OCT4、ALDH2、CD24、Nanog、CD44 的表达与肿瘤微环境通路、MYC 靶基因通路、P53 通路呈现负相关关系, 说明 ABCG2、OCT4、ALDH2、CD24、Nanog、CD44 基因在甲状腺恶性肿瘤增殖和进展中起着关键的调控作用, 是重要的靶点, 影响甲状腺肿瘤的改变。

6 结论

目前关于甲状腺癌肿瘤干细胞的研究仅处于初始阶段, 仍然存在很多科学问题尚待研究。本文也存在不足之处, 仅初步揭示了在体外高分化甲状腺癌与低分化甲状腺癌肿瘤干细胞相关基因的表达水平差异甚大且与多种肿瘤信号通路密切相关。而对于体内研究甲状腺癌与肿瘤干细胞及其相关信号通路有何关系,

阻断相关信号通路对肿瘤治疗将是未来对于甲状腺癌进行根治的重点内容之一。本文的结果是肿瘤干细胞研究资料积淀的一小部分, 为未来针对体内肿瘤干细胞特异基因蛋白和相关重要信号通路进行特异靶点诊疗提供了创新的思路。

致谢

本文为云南省科技厅-昆医联合专项《双靶点 CD133-C225 抗体联合 131-I 在未分化甲状腺癌的实验研究》(20201AY070001-039) 的阶段成果之一。

参考文献

- [1] Khan A Q, Ahmed E I, Elareer N, *et al.* Curcumin-Mediated Apoptotic Cell Death in Papillary Thyroid Cancer and Cancer Stem-Like Cells through Targeting of the JAK/STAT3 Signaling Pathway [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21 (2): 438.
- [2] Jan Paul Medema. Cancer stem cells: the challenges ahead [J]. *Nat Cell Biol Actions*. 2013, 15 (4): 338-44.
- [3] Mimeault M, Batra SK. Altered gene products involved in the malignant reprogramming of cancer stem/progenitor cells and multitargeted therapies. *Mol Aspects Med*, 2014, 39: 3-32.
- [4] 王晓涛, 杨春伟, 卢伟胜, 等. Oct-4 蛋白在甲状腺肿瘤中的表达及意义 [J]. *世界中医药*, 2016 (B06): 1614-1615.
- [5] Al-Suhaimi E A, Al-Khater K. Functions of stem cells of thyroid glands in health and disease [J]. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 2019, 20 (2): 187-195.
- [6] Xie J, Xiao Y, Zhu XY, *et al.* Hypoxia regulates stemness of breast cancer MDA-MB-231 cells [J]. *Medical Oncology*, 2016, 33 (5): 1-7.
- [7] 朱玉珍, 马雨水, 符达. 肿瘤干细胞在肿瘤转移中作用与相关机制的研究进展[J]. *基础医学与临床*, 2012, 32 (004): 457-460.
- [8] 谢丽君, 朱高红, 赵继华, 等. 甲状腺癌肿瘤干细胞的来源和存活途径 [J]. *基础医学与临床*, 2022, 42 (2): 321-324.
- [9] Chen T, You Y, Jiang H, Wang ZZ. Epithelial-mesenchymal transition (EMT): A biological process in the development, stem cell differentiation, and tumorigenesis [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2017, 232 (12): 3261-3272.
- [10] Gba B, Gga A, Nzzj A. EMT, cancer stem cells and autophagy; The three main axes of metastasis [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 1, 133: 110909.

[11] Wu X, Wen J. ZEB1-AS1/miR-133a-3p/LPAR3/EGFR axis promotes the progression of thyroid cancer by regulating PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Cancer Cell International*, 2020, 20 (29); 20: 94.

[12] 刘建平. 体外模拟肿瘤微环境中致大鼠 MSCs 瘤化因子分析 [J]. *基础医学与临床*, 2012, 32 (4): 375-380.

[13] 史云湘, 史杪, 冯琼,等. 铁过载对人乳腺癌细胞 c-MYC 蛋白表达的影响 [J]. *基础医学与临床*, 2016, 36 (11): 5.