

· 论著 ·

TM7SF4 对人甲状腺乳头状癌细胞 IHH-4 增殖、凋亡和侵袭的作用研究

周秦毅 陈隽 冯嘉麟 王家东

【摘要】 目的 探讨树突表达特异性 7 跨膜蛋白(TM7SF4)的低表达对人甲状腺乳头状癌细胞 IHH-4 增殖、凋亡和侵袭的作用及其相关机制。**方法** 选取甲状腺乳头状癌患者的手术标本(癌组织及癌旁组织)及甲状腺乳头状癌细胞系 IHH-4 为对象。qRT-PCR 法检测病理组织和细胞系 IHH-4 中 TM7SF4 的 mRNA 表达量。分别用 MTT 法、流式细胞分析和 Transwell 法检测 TM7SF4 表达量对 IHH-4 细胞增殖、凋亡和侵袭的影响。Western 印迹检测 IHH-4 细胞中磷酸化与非磷酸化磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)、蛋白激酶 B(Akt)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)的表达。**结果** 与癌旁组织相比,甲状腺癌组织中 TM7SF4 的 mRNA 表达水平显著升高($t=52.31, P<0.05$)。与正常甲状腺细胞系 Nthy-ori 3-1 相比, IHH-4 细胞系中 TM7SF4 的表达水平也显著上升($t=34.35, P<0.05$)。与对照组细胞相比,沉默 TM7SF4 的表达后,可诱导 IHH-4 细胞凋亡,而细胞增殖和侵袭能力受到显著抑制($F=8.32, 7.55, 846.40; P$ 均 <0.05)。此外,沉默 TM7SF4 的表达后可显著降低磷酸化 PI3K、磷酸化 Akt、磷酸化 mTOR mRNA 及蛋白的表达($F=1\ 014.88, 1\ 121.29, 985.22, 720.14, 854.63, 4\ 563.12; P$ 均 <0.05)。**结论** 低表达的 TM7SF4 可能通过下调 PI3K/Akt/mTOR 通路而抑制 IHH-4 细胞增殖、诱导凋亡并抑制侵袭。

【关键词】 甲状腺乳头状癌;树突表达特异性 7 跨膜蛋白;细胞增殖;细胞凋亡;细胞侵袭

Effects of TM7SF4 on proliferation, apoptosis and invasion of human papillary thyroid cancer IHH-4 cells Zhou Qinyi, Chen Jun, Feng Jialin, Wang Jiadong. Department of Head and Neck Surgery, Renji Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200001, China

Corresponding author: Wang Jiadong, Email: drjiadongw@aliyun.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects and mechanisms of dendrocyte expressed seven transmembrane protein (TM7SF4) on proliferation, apoptosis and invasion of human papillary thyroid cancer (PTC) cell IHH-4. **Methods** PTC tumor tissues and the adjacent normal tissues, as well as the human PTC IHH-4 cells were used in this study. TM7SF4 mRNA in tissues and in IHH-4 cells were analyzed using qRT-PCR analysis. The effects of TM7SF4 on proliferation, apoptosis and invasion of IHH-4 cells were analyzed using MTT assay, flow cytometry and Transwell assay, respectively. Furthermore, Western blotting was used to detect the expression of TM7SF4, phosphorylated and non-phosphorylated phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), protein kinase B (Akt), mammalian target of rapamycin (mTOR) protein. **Results** Compared with adjacent normal tissues, TM7SF4 mRNA and protein were significantly increased IHH-4 in PTC tissues ($t=52.31, P<0.05$). TM7SF4 was also significantly increased in cells compared with that in Nthy-ori 3-1 cells ($t=34.35, P<0.05$). Consequently, silencing TM7SF4 significantly induced IHH-4 cells apoptosis, inhibited proliferation and suppressed invasion compared with controls ($F=8.32, 7.55, 846.40; all P<0.05$). Moreover, the mRNA and protein levels of phosphorylated-PI3K, phosphorylated-Akt and phosphorylated-mTOR were significantly decreased by silencing TM7SF4 ($F=1\ 014.88, 1\ 121.29, 985.22, 720.14, 854.63, 4\ 563.12, all P<0.05$). **Conclusion** Down-regulated TM7SF4 may be an inhibitor of PTC development and metastasis through suppressing PI3K/Akt/mTOR pathway.

【Key words】 Papillary thyroid cancer; Dendrocyte expressed seven transmembrane protein; Cell proliferation; Cell apoptosis; Cell invasion

甲状腺癌是一种起源于甲状腺的常见恶性肿瘤,近年来的发病率呈增加趋势^[1]。分化型甲状腺乳头状癌(PTC)是甲状腺癌多种临床分型中最主要的分型,其发病率较高,占有甲状腺癌的80%左右^[2-3]。已有报道表明化学治疗、放射治疗和手术切除是PTC的常规治疗方法,但由于其发病机制复杂,各类治疗效果都不够理想^[4-5]。近年来,很多研究致力于PTC的致病基因研究,以期从分子角度找到治疗甲状腺癌的有效手段。

树突表达特异性7跨膜蛋白(Dendrocyte Expressed Seven Transmembrane Protein, DCSTAMP; 又名 Transmembrane 7 Superfamily Member 4, TM7SF4)是一种由TM7SF4基因编码的主要存在于树突状细胞内的7次跨膜蛋白,参与细胞融合、细胞分化和免疫稳态等生物学过程^[6]。前期报道证明TM7SF4在人破骨细胞发生、融合与再吸收和骨Paget病等中发挥关键作用^[7-8]。但在甲状腺癌中的报道却很少。目前,已有学者利用生物信息学方法预测到TM7SF4在甲状腺癌组织中的表达会发生异常^[9-10]。新近研究中,Lan等^[11]利用基因组测序法检测到TM7SF4在PTC组织中的表达量显著增加。但尚未有研究证明TM7SF4与PTC发病机制的关系。本研究利用人PTC细胞系IHH-4,研究了TM7SF4基因在该细胞系中的作用及其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 病例样本信息、细胞培养 选取2013年9月至2015年1月在上海交通大学医学院附属仁济医院入院并被诊断为PTC的32对病理及其癌旁组织作为实验材料。PTC病理组织及邻近正常组织置于-80℃中保存备用。PTC细胞株IHH-4及正常细胞株Nthy-ori 3-1(购自中国科学院上海细胞生物研究所)置于含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中,在37℃,5%CO₂的条件下培养。本研究已被上海交通大学医学院附属仁济医院伦理道德委员会批准,所有患者都知情同意。

1.2 材料 RPMI-1640培养基、胎牛血清、抗生素G418、TM7SF4抗体和磷酸化与非磷酸化的磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/哺乳动物雷帕酶素靶蛋白(mTOR)抗体均购自美国Sigma公司; pcDNA3.1过表达载体和siRNA沉默载体购自生工生物工程(上海)股份有限公司; Lipofectamine 2000、细

胞MTT增殖试剂盒、Annexin V-FITC/PI凋亡试剂盒与Transwell小室购自美国Invitrogen公司; qRT-PCR试剂盒和蛋白浓度检测试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.3 细胞转染 将浓度为 $5 \times 10^7/L$ 的IHH-4细胞接种于6孔板中,培养24 h后(细胞贴壁生长),按照Lipofectamine 2000试剂盒的操作步骤进行细胞转染。用10 μ l的Lipofectamine 2000包被4 μ g质粒(含TM7SF4编码序列的沉默siRNA载体或过表达pcDNA-TM7SF4载体)转入IHH-4细胞。6~8 h后更换新鲜的含抗生素G418的RPMI-1640培养基进行后续培养。转入的空siRNA载体作为对照组。

1.4 MTT法检测细胞增殖 按照MTT试剂盒操作步骤检测TM7SF4基因沉默或过表达对细胞增殖的影响。转入不同类型载体的细胞经过抗生素筛选并继续培养24 h后,将该细胞接种于96孔板上并用新鲜培养基稀释至细胞浓度为 2×10^5 个/孔。在不同观察时间点,每孔加入10 μ l MTT,将细胞置于含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中继续培养4 d。在波长为450 nm处测定吸光度A值,然后以时间为横坐标,A值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.5 流式细胞法检测细胞凋亡 用流式细胞法检测TM7SF4基因沉默或过表达对细胞凋亡的影响。将1 ml的IHH-4培养液平铺到24孔板上并调节细胞浓度约至 1×10^5 个/孔。用含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基培养至对数生长期,然后用胰蛋白酶消化收集贴壁细胞,于12 000 g离心5 min收集细胞体。接着调整细胞浓度为 1×10^9 个,使用凋亡试剂盒进行避光染色,染色1 h后在流式细胞仪上进行检测。计算活细胞的早期凋亡率和晚期凋亡率。细胞总凋亡率(%) = 早期凋亡率(%) + 晚期凋亡率(%)。

1.6 Transwell检测细胞侵袭 用Transwell法检测TM7SF4基因沉默或过表达对细胞侵袭的影响。取对数期的IHH-4细胞用无血清的RPMI-1640培养基稀释制成浓度为 $1 \times 10^9/L$ 的单细胞悬液。用100 μ l/孔上室凝胶液(融化的Matrigel原液和预冷的RPMI-1640培养基混合液)包被24孔板的Transwell上室,37℃下放置2 h使其凝固。每孔加入200 μ l IHH-4单细胞悬液。将500 μ l含血清的RPMI-1640培

培养基加入 Transwell 下室,置于含 5% CO₂的培养箱中培养。48 h 后,取出 Transwell 小室,去除液体培养基,用 PBS 缓冲液漂洗后置于 4% 的甲醛中固定 15 min, PBS 漂洗 2 min,结晶紫染色 5 min。于 400 倍显微镜下观察并计数(选取 5 个视野计算平均值)。

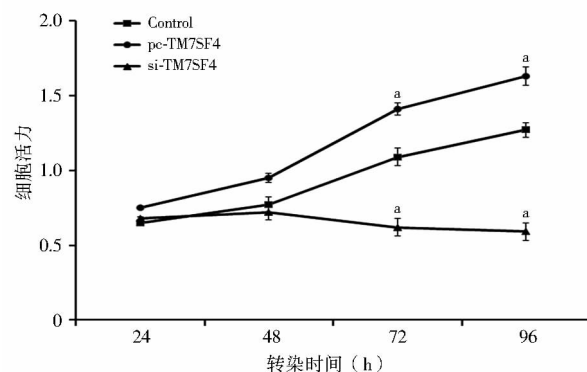
1.7 qRT-PCR 检测 TM7SF4 基因及细胞凋亡信号通路蛋白 PI3K、Akt 和 mTOR mRNA 的表达用 Trizol 法从甲状腺癌组织及 IHH-4 细胞系中分别提取总 RNA,具体操作参照试剂盒说明书。提取的总 RNA 经过 RNase-free Dnase I 处理后,用紫外分光光度计检测纯度和浓度。用不含核酸降解酶的双蒸水调节 RNA 浓度为 0.5 μg/μl,作为 cDNA 合成的模板,具体操作参照 PrimerScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒。参考 SYBR ExScript RT-qPCR Kit 试剂盒操作步骤进行目的基因的扩增,反应体系为 20 μl (1 μl cDNA, 10 μl SYBR Premix EX Taq, 1 μl primer, 7 μl ddH₂O)。PCR 反应程序为:50℃ 预变性 2 min; 95℃ 变性 10 min; 退火 10 s, 60℃ 延伸 1 min, 45 个循环。 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示 mRNA 的表达水平。选择 GAPDH 作为内参(表 1)。

1.8 Western 印记检测 TM7SF4 蛋白及细胞凋亡信号通路蛋白 PI3K、Akt 和 mTOR 蛋白磷酸化和非磷酸化的表达 收集培养 24 h 后的 IHH-4 细胞溶解于 RIPA 裂解液中,于 4℃ 下以 12 000 g 离心 5 min。收集离心后上清以获得总蛋白,利用二喹啉甲酸 (BCA) 试剂盒检测总蛋白浓度。将 50 μg 的总蛋白上样至 12% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE),电泳后将蛋白转移到聚偏氟乙烯膜 (PVDF) 上,置于含 5% 牛血清蛋白的 TBST 缓冲液中室温下封闭 1 h。然后加入兔抗人抗 (TM7SF4, 磷酸化 PI3K, 磷酸化 Akt, 磷酸化 mTOR, 1:100) 4℃ 下过夜孵育。加入二抗 (1:1 000) 室温下孵育 1 h。ECL 检测蛋白条带。选择 GAPDH 作为内参。

1.9 统计学处理 本研究中所有实验均重复 3 次。正态分布的计量数据采用均数 ± 平均标准误,所有数据均用 Graph Prism 5.0 软件进行统计分析。两组间差异性统计分析采用独立样本 *t* 检验法,多组间比较采用方差分析法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TM7SF4 对 IHH-4 细胞增殖的影响 与对照组相比,当 IHH-4 细胞转入 pcDNA-TM7SF4 载体时,细胞活力 (OD 值) 随培养时间增加而显著升高 ($F = 6.62, P < 0.05$)。但是当 IHH-4 细胞转入 si-TM7SF4 载体时,细胞活力随着培养时间增加而显著下降 ($F = 8.32, P < 0.05$, 图 1)。



注: Control: 转入 siRNA 空载体的 IHH-4 细胞; pc-TM7SF4: 转入 pcDNA-TM7SF4 载体的 IHH-4 细胞; si-TM7SF4: 转入 siRNA-TM7SF4 载体的 IHH-4 细胞; TM7SF4: 树突表达特异性 7 跨膜蛋白; 与对照组相比, $^a P < 0.05$

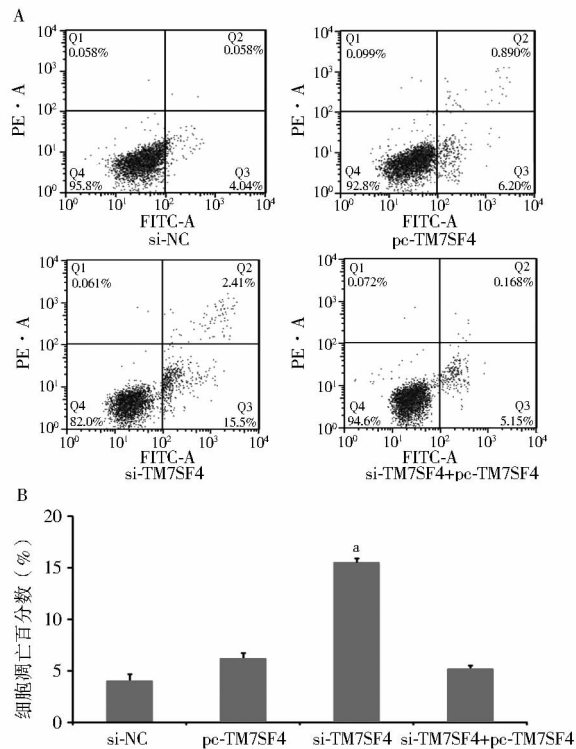
图 1 TM7SF4 对 IHH-4 细胞增殖能力的影响

2.2 TM7SF4 对 IHH-4 细胞凋亡的影响 与对照组相比,转入 pcDNA-TM7SF4 的细胞凋亡率没有显著变化 (6.20% vs. 4.04%), 而转入 si-TM7SF4 的 IHH-4 细胞凋亡百分数显著升高 (15.5%, $F = 6.87, P < 0.05$), 而且同时转入沉默和过表达载体后的 IHH-4 细胞凋亡百分数 (5.15%) 与对照组相比没有显著差异 (图 2A, 2B)。

表 1 qRT-PCR 引物序列及产物

基因	引物	退火温度	产物长度 (bp)
TM7SF4	上游引物: 5'-CCTGGTTATGCCTCCTTTCA-3'	56℃	334 bp
	下游引物: 5'-TGCTTGTGAGGCTGTGCTAG-3'		
PI3K	上游引物: 5'-CTCCACGACCATCATCAG-3'	56℃	546 bp
	下游引物: 5'-TTCTTCACGGTTGCCTAC-3'		
Akt	上游引物: 5'-GTATGCTGGCAGAGTAGGAGAAC-3'	60℃	1 450 bp
	下游引物: 5'-CAGGTAACATCAGACAGACACA-3'		
mTOR	上游引物: 5'-CTGGGGCTTTGTGCTACGAG-3'	60℃	160 bp
	下游引物: 5'-GGCCATTGACAGACAGACA-3'		
GAPDH	上游引物: 5'-GGGTGGACCAACGGCTC-3'	65℃	452 bp
	下游引物: 5'-GGAGTTGCTGTGAAGTCGCA-3'		

注: TM7SF4: 树突表达特异性 7 跨膜蛋白; PI3K: 磷脂酰肌醇 3 激酶; Akt: 丝/苏氨酸蛋白激酶; mTOR: 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白; GAPDH: 磷酸甘油醛脱氢酶

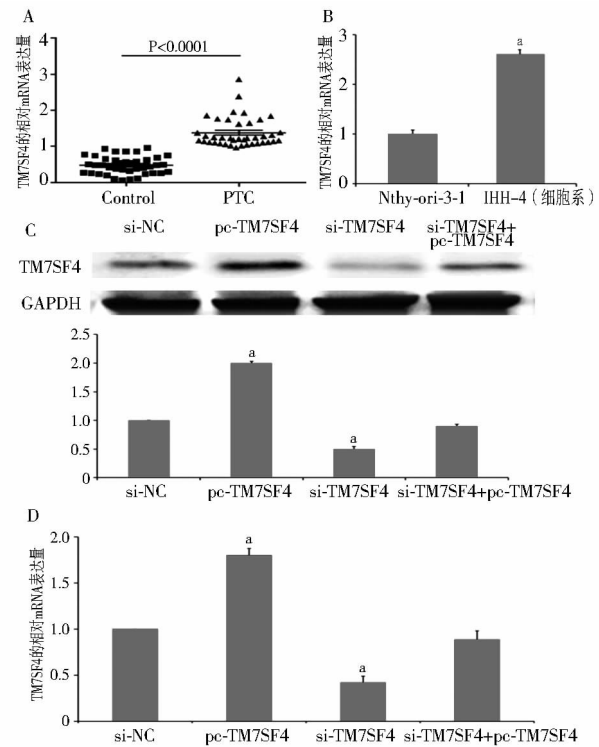


注: A: 流式细胞分析法检测各组细胞凋亡结果; si-NC: 转入 siRNA 空载体的 IHH-4 细胞; pc-TM7SF4: 转入 pcDNA-TM7SF4 载体的 IHH-4 细胞; si-TM7SF4: 转入 siRNA-TM7SF4 载体的 IHH-4 细胞; TM7SF4: 树突表达特异性 7 跨膜蛋白; B: 各组细胞凋亡的百分数; 与对照组相比, $^a P < 0.05$

图 2 TM7SF4 对 IHH-4 细胞凋亡的影响

2.3 TM7SF4 对 IHH-4 细胞侵袭的影响 与对照组相比, 转入 pcDNA-TM7SF4 的 IHH-4 细胞侵袭的数目显著增加, 而转入 siRNA-TM7SF4 载体的 IHH-4 细胞侵袭的数目显著下降 ($F = 846.40, P < 0.01$)。同时转入沉默和过表达载体的组中, 侵袭细胞数目与对照组相比没有显著性差别 (图 3A, 3B, 封 3)。

2.4 TM7SF4 在甲状腺癌组织和细胞系中的表达 qRT-PCR 方法检测 TM7SF4 在 PTC 组织和癌旁临近正常组织中的表达水平 (图 4A)。与临近正常组织相比, TM7SF4 在癌组织中的表达显著上升 ($t = 52.31, P < 0.01$)。与正常细胞株 Nthy-ori-3-1 相比, TM7SF4 在 IHH-4 细胞系中的表达量显著上升 ($t = 34.35, P < 0.01$)。见图 4B。分别构建 TM7SF4 基因沉默和过表达载体并转入 IHH-4 细胞系中 (图 4C, 4D)。与对照组相比, 转入 siRNA-TM7SF4 载体的 IHH-4 细胞中的 TM7SF4 相对 mRNA 和蛋白表达量显著下降, 而转入 pcDNA-TM7SF4 的 IHH-4 细胞中其相对 mRNA 和蛋白表达量显著升高 ($F = 49.00, 42.25, P$ 均 < 0.05)。当沉默和过表达载体同时转



注: A: 与甲状腺癌旁组织相比, TM7SF4 在乳头状甲状腺癌组织中的相对 mRNA 表达水平; B: TM7SF4 在甲状腺癌细胞系 IHH-4 和正常细胞系 Nthy-ori-3-1 中的相对 mRNA 水平, 与对照组 (正常细胞系 Nthy-ori-3-1) 相比, $^a P < 0.05$; C-D: TM7SF4 沉默与过表达后在不同组中的 mRNA 和蛋白水平检测; si-NC: 转入 siRNA 空载体的 IHH-4 细胞; pc-TM7SF4: 转入 pcDNA-TM7SF4 载体的 IHH-4 细胞; si-TM7SF4: 转入 siRNA-TM7SF4 载体的 IHH-4 细胞; PTC: 甲状腺乳头状癌; GAPDH: 三磷酸甘油醛脱氢酶; 与对照组相比, $^a P < 0.05$; TM7SF4: 树突表达特异性 7 跨膜蛋白

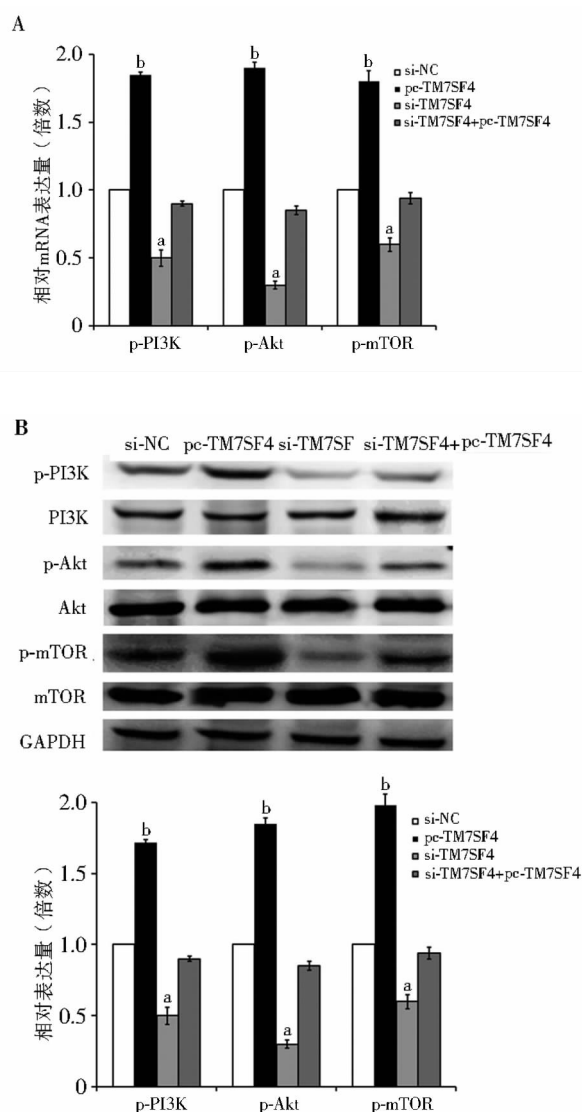
图 4 TM7SF4 在 PTC 病理组织及 IHH-4 细胞系中的表达

入 IHH-4 细胞中时, TM7SF4 的 mRNA 和蛋白表达量与对照组相比没有显著性差异。

2.5 TM7SF4 基因沉默对细胞凋亡信号通路的影响 与对照组相比, 当 IHH-4 细胞转入 pcDNA-TM7SF4 过表达载体时, 磷酸化的 PI3K、Akt 和 mTOR 的相对 mRNA 和蛋白表达水平均显著升高, 但当细胞转入 si-TM7SF4 载体时, 磷酸化的 PI3K、Akt、mTOR 的相对 mRNA 和蛋白表达水平均显著下降 ($F = 1\ 014.88, 1\ 121.29, 985.22, 720.14, 854.63, 4\ 563.12; P$ 均 < 0.05 ; 图 5A, 5B)。同时转入沉默和过表达载体的细胞中, 磷酸化的因子水平则与对照组没有显著性差异。

3 讨论

利用生物信息学方法预测 TM7SF4 在甲状腺癌中发生异常表达^[9-10]。但关于 TM7SF4 对 PTC 细胞生物学过程的影响及其生物学机制未见报道。只有



注: PI3K: 磷脂酰肌醇 3 激酶; p-PI3K: 磷酸化 PI3K; Akt: 蛋白激酶 B; p-Akt: 磷酸化 Akt; mTOR: 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白; p-mTOR: 磷酸化 mTOR; A: 经过不同 TM7SF4 表达水平处理后, p-PI3K, p-Akt 和 p-mTOR 的相对 mRNA 表达水平; 与对照组相比, $^a P < 0.05$; $^b P < 0.01$; B: 不同处理组中 p-PI3K, p-Akt 和 p-mTOR 的蛋白表达水平; si-NC: 转入 siRNA 空载体的 IHH-4 细胞; pc-TM7SF4: 转入 pcDNA-TM7SF4 载体的 IHH-4 细胞; si-TM7SF4: 转入 siRNA-TM7SF4 载体的 IHH-4 细胞; TM7SF4: 树突表达特异性 7 跨膜蛋白

图 5 TM7SF4 对 IHH-4 细胞 PI3K/Akt/mTOR mRNA 及蛋白表达的影响

Nikolova 等^[10] 采用生物信息预测法和 RT-PCR 法报道了 TM7SF4 在甲状腺癌发生中高表达, 可能是甲状腺癌发生的一个重要靶基因。本研究结果显示, TM7SF4 在 PTC 组织和 IHH-4 细胞系中表达量显著上升 ($P < 0.05$), 与前期研究结果一致^[10-11]。表明 TM7SF4 与 PTC 的发病存在密切关系。

已有研究证实细胞增殖、凋亡和侵袭与肿瘤的发生、发展和转移密切相关^[12-14]。前期研究证明 TM7SF4 在骨形成或骨炎性反应相关疾病中都呈高表达, 但在肿瘤中的作用报道较少^[15-16]。在 Tu 等^[17] 研究中, TM7SF4 高表达通过促进细胞增殖与侵袭, 参与前列腺癌的骨转移。Kim 等^[9] 采用基因组测序的方法证明了 TM7SF4 参与 PTC 的细胞凋亡、转移和侵袭。本研究结果显示 TM7SF4 低表达 (基因沉默后) 可以显著抑制 IHH-4 细胞增殖和侵袭并诱导细胞凋亡, 因此推测低表达的 TM7SF4 可能在 PTC 的发生、发展和转移中起抑制作用。

PI3K/Akt/mTOR 信号通路参与多种肿瘤的发生和发展^[18-20]。PI3K 是一种胞内磷脂酰肌醇激酶, 而 Akt 是其下游关键蛋白^[21]。PI3K/Akt/mTOR 被激活时可以转变为磷酸化的 PI3K/Akt/mTOR, Akt 能够导致肿瘤的发生、发展和侵袭。mTOR 可以直接或间接被磷酸化 Akt 激活而发生磷酸化, 进而促进细胞增殖和凋亡, 在肿瘤发生中起促进作用^[22]。另一方面, Santarpia 等^[23] 证明在甲状腺癌中, Akt 被激活后, 可以促进甲状腺癌细胞的增殖和凋亡, 进而促进肿瘤的发展。同时, Miyakawa 等^[24] 研究证明, 磷酸化 Akt 在 PTC 组织中的表达量显著上升, 而且 100% 的 PTC 中都能检测到高表达水平的磷酸化 Akt。与前人研究结果一致, 本研究中 TM7SF4 高表达时, 磷酸化 PI3K、磷酸化 Akt 和磷酸化 mTOR 的水平都显著上升。然而, 当 TM7SF4 基因表达被沉默时, 上述 3 种因子的磷酸化水平则显著下降, 表明低表达的 TM7SF4 参与抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的激活。

本研究表明, TM7SF4 低表达可能通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的激活进而抑制 PTC 细胞增殖、诱导凋亡并抑制其侵袭。TM7SF4 可能是 PTC 的一个潜在治疗靶点, 但其具体机制及其临床应用潜在能力尚有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Cho BY, Choi HS, Park YJ, et al. Changes in the clinicopathological characteristics and outcomes of thyroid cancer in Korea over the past four decades [J]. *Thyroid*, 2013, 23 (7): 797-804. DOI: 10.1089/thy.2012.0329.
- [2] McLeod DS, Cooper DS, Ladenson PW, et al. Prognosis of differentiated thyroid cancer in relation to serum thyrotropin and thy-

- roglobulin antibody status at time of diagnosis[J]. *Thyroid*, 2014, 24(1):35-42. DOI: 10.1089/thy.2013.0062.
- [3] Sacks W, Braunstein GD. Papillary thyroid carcinoma//Braunstein GD, eds. *Thyroid Cancer*[M]. Springer, 2012: 133-153.
- [4] Wójcicka A, Czetwertyńska M, Wierniak M, et al. Variants in the ATM-CHEK2-BRCA1 axis determine genetic predisposition and clinical presentation of papillary thyroid carcinoma[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2014, 53(6):516-523. DOI: 10.1002/gcc.22162.
- [5] Hay ID, Lee RA, Davidge-Pitts C, et al. Long-term outcome of ultrasound-guided percutaneous ethanol ablation of selected "recurrent" neck nodal metastases in 25 patients with TNM stages III or IV A papillary thyroid carcinoma previously treated by surgery and ¹³¹I therapy[J]. *Surgery*, 2013, 154(6):1448-1454; discussion 1454-1455. DOI: 10.1016/j.surg.2013.07.007.
- [6] Beauregard M, Gagnon E, Guay-Bélanger S, et al. Identification of rare genetic variants in novel loci associated with Paget's disease of bone[J]. *Hum Genet*, 2014, 133(6):755-768. DOI: 10.1007/s00439-013-1409-x.
- [7] Chiu YH, Mensah KA, Schwarz EM, et al. Regulation of human osteoclast development by dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP)[J]. *J Bone Miner Res*, 2012, 27(1):79-92. DOI: 10.1002/jbmr.531.
- [8] Zeng Z, Zhang C, Chen J. Lentivirus-mediated RNA interference of DC-STAMP expression inhibits the fusion and resorptive activity of human osteoclasts[J]. *J Bone Miner Metab*, 2013, 31(4):409-416. DOI: 10.1007/s00774-013-0434-0.
- [9] Kim HS, Kim DH, Kim JY, et al. Microarray analysis of papillary thyroid cancers in Korean[J]. *Korean J Intern Med*, 2010, 25(4):399-407. DOI: 10.3904/kjim.2010.25.4.399.
- [10] Nikolova DN, Zembutsu H, Sechanov T, et al. Genome-wide gene expression profiles of thyroid carcinoma: Identification of molecular targets for treatment of thyroid carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2008, 20(1):105-121.
- [11] Lan X, Zhang H, Wang Z, et al. Genome-wide analysis of long noncoding RNA expression profile in papillary thyroid carcinoma[J]. *Gene*, 2015, 569(1):109-117. DOI: 10.1016/j.gene.2015.05.046.
- [12] Hoelting T, Siperstein AE, Clark OH, et al. Epidermal growth factor enhances proliferation, migration, and invasion of follicular and papillary thyroid cancer *in vitro* and *in vivo*[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1994, 79(2):401-408.
- [13] Basolo F, Pollina L, Fontanini G, et al. Apoptosis and proliferation in thyroid carcinoma: correlation with bcl-2 and p53 protein expression[J]. *Br J Cancer*, 1997, 75(4):537-541.
- [14] Rivera M, Ricarte-Filho J, Knauf J, et al. Molecular genotyping of papillary thyroid carcinoma follicular variant according to its histological subtypes (encapsulated vs infiltrative) reveals distinct BRAF and RAS mutation patterns[J]. *Mod Pathol*, 2010, 23(9):1191-1200. DOI: 10.1038/modpathol.2010.112.
- [15] Matsubara R, Kukita T, Ichigi Y, et al. Characterization and identification of subpopulations of mononuclear preosteoclasts induced by TNF- α in combination with TGF- β in rats[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10):e47930. DOI: 10.1371/journal.pone.0047930.
- [16] Herbert BA, Valerio MS, Gaestel M, et al. Sexual dimorphism in MAPK-activated protein kinase-2 (MK2) regulation of RANKL-induced osteoclastogenesis in osteoclast progenitor subpopulations[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5):e0125387. DOI: 10.1371/journal.pone.0125387.
- [17] Tu SM, Som A, Tu B, et al. Effect of Paget's disease of bone (osteitis deformans) on the progression of prostate cancer bone metastasis[J]. *Br J Cancer*, 2012, 107(4):646-651. DOI: 10.1038/bjc.2012.315.
- [18] Janku F, Tsimberidou AM, Garrido-Laguna I, et al. PIK3CA mutations in patients with advanced cancers treated with PI3K/AKT/mTOR axis inhibitors[J]. *Mol Cancer Ther*, 2011, 10(3):558-565. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0994.
- [19] Yap TA, Garrett MD, Walton MI, et al. Targeting the PI3K-AKT-mTOR pathway: progress, pitfalls, and promises[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2008, 8(4):393-412. DOI: 10.1016/j.coph.2008.08.004.
- [20] Slomovitz BM, Coleman RL. The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in endometrial cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(21):5856-5864. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0662.
- [21] Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(8):550-562. DOI: 10.1038/nrc2664.
- [22] Wan X, Helman LJ. The biology behind mTOR inhibition in sarcoma[J]. *Oncologist*, 2007, 12(8):1007-1018.
- [23] Santarpia L, El-Naggar AK, Cote GJ, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase/akt and ras/raf-mitogen-activated protein kinase pathway mutations in anaplastic thyroid cancer[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008, 93(1):278-284.
- [24] Miyakawa M, Tsushima T, Murakami H, et al. Increased expression of phosphorylated p70S6 kinase and Akt in papillary thyroid cancer tissues[J]. *Endocr J*, 2003, 50(1):77-83.

(收稿日期:2015-08-29)