

LncRNA BANCR表达与TSHR甲基化在 BRAF^{V600E}突变的甲状腺乳头状癌中的研究

于波, 徐宁*, 杨博, 孙玺媛, 姚佳兴, 樊伟业, 李松埔, 窦福林, 李扬

齐齐哈尔市第一医院甲状腺外科, 黑龙江 齐齐哈尔

收稿日期: 2023年12月2日; 录用日期: 2024年1月2日; 发布日期: 2024年1月11日

摘要

目的: 探讨长链非编码RNA BANCR表达及TSHR甲基化与BRAF^{V600E}突变的甲状腺乳头状癌的关系。方法: 收集60例BRAF^{V600E}突变的甲状腺乳头状癌(PTC)患者癌组织样本60例和癌旁正常甲状腺组织样本60例(简称癌旁组织), 上述所有PTC患者已采用荧光定量PCR(QPCR)检测分析上述各样本BANCR基因的表达水平, 并应用甲基化特异性聚合酶链反应(Methylation-Specific Polymerase chain reaction, MSP)法检测上述各样本中TSHR基因启动子甲基化情况, 并分析上述癌组织和癌旁组织中各样本基因表达水平和TSHR甲基化情况与BRAF^{V600E}突变的PTC患者的临床病理特征之间的关系。结果: 癌组织组: BANCR相对表达量为(1.55 ± 1.62), 高表达率为66.67%, 癌旁组织组分别为(0.74 ± 0.63和30%), 癌组织显著高于癌旁组织(P < 0.05)。癌组织中, BANCR高表达与肿瘤的颈部淋巴结转移存在显著相关性(P < 0.05)。癌组织组中TSHR甲基化的发生率为93.3% (56/60), 癌旁组织组中TSHR甲基化的发生率为18.3% (11/60), TSHR甲基化PTC患者例数显著高于非甲基化PTC患者, 差异均具有统计学意义(P均 < 0.01)。癌组织中BANCR的表达水平及TSHR甲基化以及两者联合检测阳性例数均显著高于癌旁组织, 差异具有统计学意义(P均 < 0.05), BANCR高表达联合TSHR甲基化对BRAF^{V600E}突变的PTC诊断的灵敏度、特异性和准确性较单项检测均出现上升趋势, 但仅灵敏度与单一检测相比差异具有统计学意义(P < 0.05)。结论: BANCR高表达和TSHR甲基化均与BRAF^{V600E}突变的PTC患者颈部淋巴结转移密切相关, 与肿瘤的进展相关并提示不良预后。且BANCR高表达联合TSHR甲基化对BRAF^{V600E}突变的PTC临床诊断具有较佳的灵敏度。

关键词

BANCR高表达, TSHR甲基化, 基因突变, BRAF^{V600E}突变

The Study of LncRNA BANCR Expression and TSHR Methylation in BRAF^{V600E} Mutated PTC

Bo Yu, Ning Xu*, Bo Yang, Xiyuan Sun, Jiaying Yao, Weiye Fan, Songpu Li, Fuling Dou, Yang Li

*通讯作者。

文章引用: 于波, 徐宁, 杨博, 孙玺媛, 姚佳兴, 樊伟业, 李松埔, 窦福林, 李扬. LncRNA BANCR 表达与 TSHR 甲基化在 BRAF^{V600E} 突变的甲状腺乳头状癌中的研究[J]. 世界肿瘤研究, 2024, 14(1): 13-19. DOI: 10.12677/wjcr.2024.141003

Abstract

Objective: To investigate the relationship between long non-coding RNA BANCR expression and TSHR methylation and BRAF^{V600E}-mutated papillary thyroid carcinoma (PTC). **Methods:** Collecting 60 cancer tissue samples and 60 adjacent normal thyroid tissue samples (adjacent tissue) from 60 patients with BRAF^{V600E} mutation in PTC, the expression levels of BANCR genes were analyzed for each of the above samples by fluorescence quantitative PCR (QPCR), and applied the methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) for promoter methylation of the TSHR gene in these samples, and analyzed the relationship between gene expression levels and TSHR methylation of each sample in both cancerous and adjacent tissues and the clinicopathological characteristics of patients with PTC with BRAF^{V600E} mutations. **Results:** The cancer tissue group: the relative expression level of BANCR was (1.55 ± 1.62), the high expression rate was 66.67%, and the adjacent tissue group was (0.74 ± 0.63 and 30%, respectively), and the cancer tissue was significantly higher than the adjacent tissue (P < 0.05). There is significant correlation between high BANCR expression and cervical lymph node metastasis in cancer tissues (P < 0.05). The incidence of TSHR methylation was 93.3% (56/60) in the cancer tissue group and 18.3% (11/60) in the paracancer tissue group, the number of TSHR methylated PTC patients was significantly higher than non-methylated PTC patients, and the differences were statistically significant (P < 0.01). The expression level of BANCR, TSHR methylation and the number of positive cases were significantly higher than that of carcinoma tissue and statistically different (P < 0.05). The sensitivity, specificity and accuracy of BANCR high expression combined with TSHR methylation for PTC diagnosis of BRAF^{V600E} mutation showed an increasing trend compared with individual detection, but the sensitivity was statistically different compared with the single test (P < 0.05). **Conclusion:** High BANCR expression and TSHR methylation are closely related with cervical lymph node metastasis in PTC patients with BRAF^{V600E} mutation, which is associated with tumor progression and indicates poor prognosis. Moreover, high expression of BANCR combined with TSHR methylation has better sensitivity for clinical diagnosis of PTC with BRAF^{V600E} mutation.

Keywords

BANCR High Expression, TSHR Methylation, Gene Mutation, BRAF^{V600E} Mutation

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

PTC 是甲状腺癌中最常见的病理组织学亚型, 占 85%~90%, 发病率也有在逐年上升[1]。PTC 的治疗以手术和碘 131 治疗为主, 甲状腺激素抵抗或碘 131 治疗无效是复发、转移的主要因素, 也是增加死亡率的重要因素[2] [3] [4]。因此, 寻找影响 PTC 转移及预后的分子标志物, 能够为 PTC 的诊断和治疗提供新思路。

长链非编码 RNA-BANCR (BRAF-activated long noncoding RNA, LncRNA BANCR)由 BRAF 突变激活, 研究发现 BANCR 基因在不同的恶性肿瘤中有特异性的表达和功能, 其在甲状腺癌中主要作为致癌

基因, 它通过改变细胞增殖、迁移来影响肿瘤的发生[5] [6] [7]。同时我们还发现多个基因启动子超甲基化在甲状腺癌中起重要作用, 其中最突出的是促甲状腺激素受体(thyroid-stimulating hormone receptor, TSHR)基因启动子甲基化, 特别是与 BRAF 基因改变状态密切相关。因此, 本研究的目的是在一系列 PTC 恶性组织 BRAF^{V600E} 基因突变状态的背景下, 分析 LncRNA BANCR 表达及 TSHR 基因启动子的高甲基化与 PTC 的关系。

2. 材料和方法

2.1. 材料

PTC 癌组织和癌旁组织标本均为新鲜样本, 选自 2022 年 1 月~2022 年 12 月在齐齐哈尔市第一医院甲状腺外科经手术病理和基因检测证实为 PTC 并伴有 BRAF^{V600E} 突变的患者 60 例, 并分为癌组织组 60 例, 癌旁组织组 60 例。60 例患者中男 16 例, 女 44 例; 年龄 18~69 岁, 平均(50.81 ± 7.61)岁; 侵及被膜 51 例, 无侵及 9 例; 淋巴结转移 49 例, 无转移 11 例; 肿瘤直径 ≤ 1 cm 26 例, >1 cm 34 例; 单发病灶 22 例, 多发病灶 38 例。术前未接受放化疗等治疗。

2.2. 方法

2.2.1. 荧光定量

PCR (quantitative real-time PCR, QPCR)检测采用 TRIzol 试剂提取 PTC 组织和细胞总 RNA, 通过逆转录酶逆转录成 cDNA (complementary DNA)后, 制备标准曲线样品, 标准曲线样品和待测样品分别加入到含 SG 的 RealTime PCR 反应液中(其中 TaqBead 热启动聚合酶来自 Promega 公司), 进行 RealTime PCR 扩增和检测。结果采用 2- $\Delta\Delta C_t$ 法计算目的基因相对表达量, 相对表达量 > 0.01 为高表达。

2.2.2. 甲基化特异性

PCR (Methylation specific PCR, MSP)法检测 TSHR 甲基化[8], 采用 MSP 法检测 PTC 癌组织及癌旁组织中 TSHR 甲基化情况。采用 DNA 亚硫酸氢盐处理试剂盒(购自 ZYMO RESEARCH, 型号 D5006)对癌组织及癌旁组织样本中提取的 DNA 进行修饰, 将其作为模板, 在 PCR 仪(厂家: 赛默飞世尔科技公司 Thermo Fisher, 型号: TCA4848)中利用甲基化和非甲基化特异性引物进行 PCR 扩增, 根据试剂盒说明进行设置和操作, 然后通过凝胶成像仪和电泳仪进行鉴定。

2.3. 统计学方法

采用 SPSS26.0 统计学软件对本研究的计量数据和计数数据进行分析。数据以平均数 ± 标准差、率(%)等进行表示, 采用卡方检验对计数数据进行分析, 采用 t 检验对计量数据进行分析, P ≤ 0.05 为差异有统计学意义。

3. 结果

3.1. TSHR 甲基化程度和 BANCR 表达水平在 BRAF^{V600E} 突变的 PTC 癌组织和癌旁组织中比较

通过 QPCR 实验及 MSP 法在 60 例成对 BRAF^{V600E} 突变的 PTC 癌组织和癌旁组织中检测 TSHR 甲基化情况及 BANCR 的表达水平, 癌组织 TSHR 甲基化率 93.30% (56/60), 癌旁组织 35% (21/60), TSHR 甲基化 BRAF^{V600E} 突变的 PTC 患者例数显著高于非甲基化 BRAF^{V600E} 突变的 PTC 患者, 差异均具有统计学意义(P 均 < 0.01)。癌组织 BANCR 相对表达量为(1.55 ± 1.62), 高表达率为 66.67% (40/60), 癌旁组织 BANCR 相对表达量(0.74 ± 0.63), 高表达率 30% (18/60), 相比于对应的癌旁组织, PTC 癌组织内 BANCR 表达上调明显, 差异有统计学意义(t = 2.192, P < 0.05, X² = 16.151, P < 0.001), 癌组织中 TSHR 甲基化和

BANCR 的表达水平以及两者结合分别检测出的阳性例数均显著高于癌旁组织, 差异具有统计学差异(P 均 < 0.001), 见表 1。

Table 1. Comparison of methylation and high expression levels of TSHR and BANCR in cancer tissues (example, %) **表 1.** 各组 TSHR 和 BANCR 在癌组织中甲基化程度与高表达水平比较(例, %)

组织	例数	TSHR		BANCR		BANCR + TSHR	
		甲基化	非甲基化	高表达	低表达	阳性	阴性
癌组织	60	56 (93.30)	4 (6.70)	40 (66.67)	20 (33.33)	57 (95.00)	3 (5.0)
癌旁组织	60	21 (35.00)	39 (65.00)	18 (30.00)	42 (70.00)	12 (20.00)	48 (80.00)
X^2		44.397		16.151		69.054	
P		< 0.001		< 0.001		< 0.001	

3.2. TSHR 甲基化和 BANCR 高表达与患者主要临床病理特征的关系

BRAF^{V600E} 突变的 PTC 肿瘤组织内 BANCR 表达水平与性别、侵及被膜、多灶癌、肿瘤直径 > 1 cm 无显著性差异, 本研究中, 颈部淋巴结转移 BRAF^{V600E} 突变的 PTC 患者 BANCR 高表达例数显著高于低表达 PTC 患者。本研究认为, 癌组织中 TSHR 基因分别在侵及被膜、多灶癌、淋巴结转移中表现出显著的高甲基化(P 均 < 0.05), 而在不同性别、肿瘤直径 > 1 cm 组间甲基化率差异无统计学意义, 见表 2。

Table 2. Correlation analysis of high BANCR expression and TSHR methylation and major clinicopathological factors of patients (example, %) **表 2.** BANCR 高表达和 TSHR 甲基化与患者主要临床病理因素的相关性分析(例, %)

临床病理因素	例数	BANCR 高表达 [例(%)]	X^2	P	TSHR 甲基化 [例(%)]	X^2	P
性别							
男	16	10 (62.5)	0.17	0.68	15 (93.75)	0.006	0.938
女	44	30 (68.2)			41 (93.2)		
直径							
≤ 1 cm	26	17 (65.4)	0.034	0.854	23 (88.5)	1.75	0.186
> 1 cm	34	23 (67.6)			33 (97.1)		
颈淋巴结转移							
是	49	39 (79.6)	20.093	< 0.001	48 (98)	9.192	0.002
否	11	1 (9.1)			8 (72.2)		
侵及被膜							
是	51	32 (62.7)	2.353	0.125	49 (96.1)	4.118	0.042
否	9	8 (88.9)			7 (77.8)		
病灶数量							
多灶	38	25 (65.8)	0.036	0.85	38 (100)	7.403	0.007
单灶	22	15 (68.2)			18 (81.8)		

3.3. 两项指标对 PTC 诊断的特异性、灵敏度和准确性比较分析

TSHR 甲基化联合 BANCR 高表达对 BRAF^{V600E} 突变的 PTC 诊断的特异性和准确性与单项检测数据相比均表现升高趋势, 但差异无统计学意义($P < 0.05$), 而 TSHR 甲基化联合 BANCR 高表达可明显提高 BRAF^{V600E} 突变的 PTC 诊断的灵敏度, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 见表 3。

Table 3. Comparative analysis of specificity, sensitivity and accuracy of two indicators/%
表 3. 两项指标对 PTC 诊断的特异性、灵敏度和准确性比较分析/%

检测指标	特异性	灵敏度	准确性
BANCR 高表达	70	66.67	68.97
TSHR 甲基化	65	93.33	72.73
BANCR 高表达 + TSHR 甲基化	80	95	82.61
X^2	3.447	23.791	5.617
P	0.178	<0.001	0.06

4. 讨论

甲状腺癌的发病率居内分泌系统恶性肿瘤之首,我国的甲状腺癌的发病率也呈上升的趋势,甲状腺癌的 5 年存活率为 67.5% [9]。虽然高分化 PTC 预后较好,但复发和淋巴结转移的情况不可忽视,因此其早期诊断对癌症的治疗及生存率的提升至关重要[10] [11] [12]。鼠类肉瘤滤过性毒菌致癌同源体 B (BRAF)基因突变在甲状腺乳头癌患者中最常见,50%~60%的 PTC 患者中存在 BRAF^{V600E} 突变,并且在其他类型的甲状腺癌如未分化癌中也发现 BRAF^{V600E} 突变[13]。研究[14] [15] [16]提示,PTC 甚至 PTMC 出现较高的复发风险与 BRAF^{V600E} 基因突变密切相关,而且与患者复发后的摄碘能力下降相关,导致术后 I¹³¹ 放射治疗效果不佳, BRAF^{V600E} 基因突变参与 PTC 的发生发展,且影响肿瘤的浸润、转移和复发。但仅通过 BRAF^{V600E} 突变基因评判甲状腺肿瘤性质及 PTC 预后还存在一些不足,因此我们将研究 BRAF^{V600E} 突变的 PTC 患者,结合其他基因改变情况是否可以进一步提高 BRAF^{V600E} 突变 PTC 术前诊断和预后预测的特异性、灵敏度和准确性。

我们发现术前基因检测有助于甲状腺癌的早期诊治,但目前尚缺乏用于甲状腺癌检测的理想遗传基因标记物。近年来, lncRNA 作为甲状腺癌发病机制中的新兴分子,研究发现长链非编码 RNA-BANCR 在不同的恶性肿瘤中有特异性的表达和功能,它通过改变细胞增殖、迁移来影响肿瘤的发生,为诊断和预后预测提供了新的思路,其作为新的分子治疗靶点,有望为 PTC 的全面治疗提供更好的方案。

另一热点研究是基因甲基化,它是一种表观遗传修饰, DNA 高甲基化可引起染色体结构改变,不能与转录因子结合,进而导致基因失活。正常组织的肿瘤抑制基因不发生甲基化,当抑癌基因发生甲基化后,就不能正常转录、翻译合成抑癌蛋白及发挥抑癌作用,细胞就有可能发生单克隆增生形成肿瘤。TSHR 基因是甲状腺特异性基因,也是甲状腺癌的抑制基因, BRAF 基因突变与 TSHR 的表达密切相关, TSHR 的高甲基化是 PTC 发生、发展的关键因素。

已有研究示:患者病理为多发癌灶、肿瘤最大径 > 1 cm 及年龄小于 45 岁与 PTC 淋巴结转移情况密切相关[17] [18],另有研究提示:导致甲状腺癌转移及进展的机制可能与 PTC 癌组织中 TSHR 基因启动子区频繁发生甲基化相关[19] [20]。结合以上研究情况,我们课题组选择 60 例 BRAF^{V600E} 突变的 PTC 患者的癌组织及癌旁组织样本,采用 QPCR 和 MSP 法分别检测患者 BRAF^{V600E} 突变的 PTC 癌组织及癌旁组织中 TSHR 甲基化程度和 BANCR 表达水平,并进一步对 TSHR 甲基化和 BANCR 表达的两项指标在 PTC 中的诊断价值及临床意义进行讨论分析,希望其对我们今后的 PTC 相关研究提供实验依据。

本课题结果显示在 60 例成对 BRAF^{V600E} 突变的 PTC 癌组织和癌旁组织中检测 BANCR 的表达水平及 TSHR 甲基化情况,相比于对应的癌旁组织,PTC 肿瘤组织内 BANCR 表达上调明显,差异有统计学意义($X^2 = 16.151, P < 0.001$), TSHR 甲基化 BRAF^{V600E} 突变的 PTC 患者例数显著高于非甲基化 BRAF^{V600E} 突变的 PTC 患者,差异均具有统计学意义(P 均 < 0.01)。与其他学者的研究结论的 34%~87% [21] [22] [23] 相近。癌组织中 TSHR 甲基化和 BANCR 的表达水平以及两者结合分别检测出的阳性例数均显著高于癌

旁组织, 差异具有统计学差异(表 1, P 均 < 0.001)。表明 BRAF^{V600E} 突变的 PTC 癌组织中 TSHR 甲基化程度上调趋势且伴有 BANCRCR 呈现高表达, 与以往学者研究结果一致[21] [22] [24]。

另外, 我们研究发现 BRAFV600E 突变的 PTC 患者肿瘤组织内 BANCRCR 表达水平与不同性别、是否侵犯被膜、是否多灶癌及不同肿瘤直径等病理特征无显著性差异, 但 BRAF^{V600E} 突变的 PTC 伴有颈部淋巴结转移患者 BANCRCR 高表达例数与低表达 BRAF^{V600E} 突变的 PTC 患者相比明显升高, 同时癌组织中 TSHR 基因分别在侵犯被膜、多灶癌、淋巴结转移的 PTC 患者中表现出显著的高甲基化(P 均 < 0.05), 表明 TSHR 的甲基化和 BANCRCR 高表达预示着 BRAF^{V600E} 突变的 PTC 患者发生淋巴结转移风险较高且预后相对较差, 从而对该癌症的临床诊断及术后复发风险评估具有一定价值。

同时 BANCRCR 高表达联合 TSHR 甲基化对 BRAF^{V600E} 突变的 PTC 诊断的特异性、灵敏度和准确性与单项检测数据相比均表现升高趋势, 但差异无统计学意义($P < 0.05$), 而仅灵敏度与两项指标单一检测相比差异具有统计学意义($P < 0.05$), 表明 BANCRCR 表达联合 TSHR 甲基化检测在 BRAFV600E 突变的 PTC 的诊断中具有较高灵敏度, 目前术前 FNAC 检查联合基因检测指标是术前诊断 PTC 的研究热点, 因此可以将我们研究的两种基因结论作为术前诊断 PTC 的分子生物学指标, 但目前仍存在不足, 后续将增加样本量对该应用进行深入研究。

5. 结论

综上, 与癌旁正常组织相比, BRAF^{V600E} 突变的 PTC 中 TSHR 甲基化程度明显升高, 同时 TSHR 甲基化与原发性灶数量、被膜侵犯、淋巴转移有关, BANCRCR 表达和 TSHR 甲基化与 BRAF^{V600E} 突变的 PTC 患者颈部淋巴结转移情况密切相关, 且对 PTC 临床诊断具有较佳的灵敏度。因此 BANCRCR 高表达和 TSHR 基因的甲基化失活可能促进 PTC 进展和转移复发, 并预示了不良预后。同时, 该基因的甲基化与 BRAF^{V600E} 突变之间的关系值得大样本临床研究进一步深入探讨。

基金项目

黑龙江省自然科学基金项目(合同编号 LH2021H115)。

参考文献

- [1] Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., *et al.* (2010) Cancer Statistics, 2010. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **60**, 277-300.
- [2] Jendrzewski, J., Thomas, A., Liyanarachchi, S., *et al.* (2015) PTCSC3 Is Involved in Papillary Thyroid Carcinoma Development by Modulating S100A4 Gene Expression. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **100**, E1370-E1377. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-2247>
- [3] 滕理送, 许泽杭, 王伟斌. 碘难治性分化型甲状腺癌靶向治疗新进展[J]. 肿瘤防治研究, 2023, 50(5): 452-457.
- [4] Karapanou, O., Simeakis, G., Vlassopoulou, B., *et al.* (2022) Advanced RAI-Refractory Thyroid Cancer: An Update on Treatment Perspectives. *Endocrine-Related Cancer*, **29**, R57-R66. <https://doi.org/10.1530/ERC-22-0006>
- [5] 李艳娜, 王智雄, 曹丹萍, 等. 长链非编码 RNA CASC10 在胃癌中的表达及对胃癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响[J]. 皖南医学院学报, 2023, 42(4): 307-311.
- [6] 崔鹤, 居晓斌, 叶琴, 潘猛, 周惠英. 长链非编码 RNA BANCRCR 在胃癌中表达及其对胃癌细胞迁移、侵袭的影响[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2018, 38(12): 1674-1678.
- [7] Wang, Y., Guo, Q., Zhao, Y., *et al.* (2014) BRAF Activated Long Non Coding RNA Contributes to Cell Proliferation and Activates Autophagy in Papillary Thyroid Carcinoma. *Oncology Letters*, **8**, 1947-1952. <https://doi.org/10.3892/ol.2014.2487>
- [8] 唐建东, 栗夏莲. 甲状腺乳头状癌组织中 TSHR 基因启动子甲基化研究[J]. 医学研究杂志, 2010, 39(4): 77-79.
- [9] 田文, 郗洪庆. 甲状腺癌病人生存现状分析[J]. 中国实用外科杂志, 2016, 36(5): 489-493.
- [10] 季振华, 蒋斌, 陈卫贤, 等. 男性甲状腺乳头状癌临床病理特征及颈淋巴结转移危险因素分析[J]. 中国眼耳鼻喉

- 科杂志, 2023, 23(4): 293-297.
- [11] So, Y.K., Kim, M.J., Kim, S., *et al.* (2018) Lateral Lymph Node Metastasis in Papillary Thyroid Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis for Prevalence, Risk Factors, and Location. *International Journal of Surgery*, **50**, 94-103. <https://doi.org/10.1016/j.ijso.2017.12.029>
- [12] 杜静海, 陈春悠, 郭欣, 等. BTG3 在甲状腺乳头状癌组织中的表达及其对细胞增殖、侵袭、迁移的影响[J]. 东南大学学报: 医学版, 2019, 38(6): 984-988.
- [13] Moulana, F.I., Priyani, A.A.H., de Silva, M.V.C., *et al.* (2018) BRAF-Oncogene Induced Senescence and the Role of Thyroid-Stimulating Hormone Signaling in the Progression of Papillary Thyroid Carcinoma. *Hormones & Cancer*, **9**, 1-11. <https://doi.org/10.1007/s12672-017-0315-4>
- [14] Sun, Y., Shi, C.L., Shi, T.F., *et al.* (2015) Correlation between the BRAFv600E Gene Mutation and Factors Influencing the Prognosis of Papillary Thyroid Microcarcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, **8**, 22525-22528.
- [15] Wang, Z., Chen, J.Q., Liu, J.L., *et al.* (2016) Clinical Impact of BRAF Mutation on the Diagnosis and Prognosis of Papillary Thyroid Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *European Journal of Clinical Investigation*, **46**, 146-157. <https://doi.org/10.1111/eci.12577>
- [16] Chen, Y.F., Sadow, P.M., Suh, H., *et al.* (2016) BRAFV600E Is Correlated with Recurrence of Papillary Thyroid Microcarcinoma: A Systematic Review, Multi-Institutional Primary Data Analysis, and Meta-Analysis. *Thyroid*, **26**, 248-255. <https://doi.org/10.1089/thy.2015.0391>
- [17] 刘文, 程若川, 苏艳军, 等. 2015 版美国甲状腺协会指南 cN0 甲状腺乳头状癌手术方案合理性分析[J]. 中国实用外科杂志, 2017, 37(5): 568-571.
- [18] 黄颖, 曾繁余, 杜勇, 等. 多灶性甲状腺乳头状癌颈部中央区淋巴结转移危险因素分析[J]. 中文科技期刊数据库 (全文版)医药卫生, 2023(8): 50-53.
- [19] 许敬, 郭新海, 葛明华. 甲状腺乳头状癌中 TSHR 与 NIS 基因启动子区甲基化状态与侵袭性相关性研究[J]. 中国现代医生, 2016(21): 1-5.
- [20] Stephen, J.K., Chen, K.M., Merritt, J., *et al.* (2018) Methylation Markers Differentiate Thyroid Cancer from Benign Nodules. *Journal of Endocrinological Investigation*, **41**, 163-170. <https://doi.org/10.1007/s40618-017-0702-2>
- [21] Smith, J.A., Fan, C.Y., Zou, C., *et al.* (2007) Methylation Status of Genes in Papillary Thyroid Carcinoma. *Archives of Otolaryngology—Head & Neck Surgery*, **133**, 1006-1011. <https://doi.org/10.1001/archotol.133.10.1006>
- [22] Xing, M., Usadel, H., Cohen, Y., *et al.* (2003) Methylation of the Thyroid-Stimulating Hormone Receptor Gene in Epithelial Thyroid Tumors: A Marker of Malignancy and a Cause of Gene Silencing. *Cancer Research*, **63**, 2316-2321.
- [23] Feng, F., Wang, H., Hou, S., *et al.* (2012) Re-Induction of Cell Differentiation and (131)I Uptake in Dedifferentiated FTC-133 Cell Line by TSHR Gene Transfection. *Nuclear Medicine and Biology*, **39**, 1261-1265. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2012.07.004>
- [24] Liao, T., Qu, N., Shi, R.L., *et al.* (2017) BRAF-Activated LncRNA Functions as a Tumor Suppressor in Papillary Thyroid Cancer. *Oncotarget*, **8**, 238-247. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10825>