

miR-155-5p 通过调控 hMLH1 促进甲状腺乳头状癌增殖侵袭的研究

张启弘¹, 黄煜庆¹, 兰霞斌², 葛明华², 郑传铭²

(1. 浙江中医药大学第二临床医学院, 浙江 杭州 310053;

2. 浙江省肿瘤医院, 浙江 杭州 310022)

摘要: [目的] 探讨 microRNA-155-5p (miR-155-5p) 在甲状腺乳头状癌 (papillary thyroid carcinoma, PTC) 中的表达及作用, 验证其对靶基因错配修复酶人类 mutL 同系物 1 (human mutL homologue 1, hMLH1) 的调控作用。[方法] 采用实时定量 PCR 法检测 miR-155-5p 在 PTC 组织和细胞中的表达水平。采用 MTT 增殖实验、Transwell 侵袭实验观察 miR-155-5p 对 PTC 细胞增殖和侵袭能力的影响。采用蛋白免疫印迹技术 (Western blot) 和荧光素酶报告实验验证 miR-155-5p 对 hMLH1 的表达调控。[结果] 与癌旁正常组织相比, miR-155-5p 在 PTC 组织中的表达水平明显增加, 差异有统计学意义 ($t=3.492, P=0.002$); 转染 miR-155-5p mimics 的 PTC 细胞中 miR-155-5p 的表达水平相比对照组明显增加, 差异有统计学意义 (TPC-1 细胞株: $t=4.214, P=0.002$; BCPAP 细胞株: $t=4.268, P=0.002$); 转染 miR-155-5p mimics 的 PTC 细胞相比对照组增殖能力明显增强, 差异有统计学意义 (TPC-1 细胞株: 48h $t=4.378, P=0.012$; BCPAP 细胞株: 48h $t=22.106, P<0.001$); 转染 miR-155-5p mimics 组通过 Matrigel 基质胶的细胞数量明显多于对照组, 差异具有统计学意义 (TPC-1 细胞株: $t=3.182, P=0.013$; BCPAP 细胞株: $t=7.872, P<0.001$); 转染 miR-155-5p mimics 的 PTC 细胞中 hMLH1 蛋白表达明显低于对照组, 差异有统计学意义 (TPC-1 细胞株: $t=5.137, P=0.007$; BCPAP 细胞株: $t=3.684, P=0.021$)。[结论] miR-155-5p 促进 PTC 增殖侵袭, 其机制可能是通过调控 hMLH1 实现, 这为 PTC 的治疗提供新的靶点。

关键词: 甲状腺乳头状癌; miR-155-5p; hMLH1

中图分类号: R736.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2019)06-0492-06

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2019.06.B002

MiR-155-5p Promotes Proliferation and Invasion of Papillary Thyroid Carcinoma through Regulation of hMLH1 Expression

ZHANG Qi-hong¹, HUANG Yu-qing¹, LAN Xia-bin², GE Ming-hua², ZHENG Chuan-ming²

(1. The Second Clinical Medical College of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2. Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effect of microRNA-155-5p (miR-155-5p) on proliferation and invasion of papillary thyroid carcinoma (PTC) and its molecular mechanism (hMLH1). [Method] Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression level of miR-155-5p in 20 paired specimens of PTC tissue and its adjacent tissue. The effects of miR-155-5p on the proliferation and invasion of PTC cells were observed by MTT assay and Transwell invasion assay. Western Blot and luciferase reporter assay were used to detect the expression of hMLH1 (mismatch repair enzyme human mutL homologue 1). [Results] Compared with adjacent normal tissues, the expression of miR-155-5p was significantly increased in PTC tissues ($t=3.492, P=0.002$). The expression level of miR-155-5p in PTC TPC-1 cells and BCPAP cells transfected with miR-155-5p mimics was significantly higher than that of the control group ($t=4.214, P=0.002$, and $t=4.268, P=0.002$). The proliferation ability of PTC TPC-1 cells and BCPAP cells transfected with miR-155-5p mimics was significantly higher than that of the control group ($t=4.378, P=0.012$ and $t=22.106, P<0.001$). The number of cells transfected with miR-155-5p mimics crossing through Matrigel was significantly higher than that of the control group ($t=3.182, P=0.013$ and $t=7.872, P<0.001$). The expression of hMLH1 protein in PTC cells transfected with miR-155-5p mimics was significantly lower than that in the control group ($t=5.137, P=0.007$ and $t=3.684, P=0.021$). [Conclusion] miR-155-5p promotes proliferation and invasion of PTC, which may be through the regulation of hMLH1 expression.

Subject words: papillary thyroid carcinoma; miR-155-5p; hMLH1

基金项目: 浙江省医药卫生研究项目(2016KYA054); 国家自然科学基金(81702645)

通信作者: 郑传铭, 主任医师, 硕士; 浙江省肿瘤医院头颈肿瘤外科, 浙江省杭州市拱墅区半山山东路 1 号 (310022); 现工作单位: 浙江省人民医院头颈甲状腺外科, 浙江省杭州市下城区上塘路 158 号 (310014); E-mail: mingdoc@163.com

收稿日期: 2018-11-16; **修回日期:** 2019-02-20

甲状腺癌是内分泌器官中最常见的恶性肿瘤,近几十年来其发病率不断增加^[1,2],目前已成为国内常见恶性肿瘤的第6位^[3]。主要的组织学类型是甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma,PTC),占所有病例的85%~95%^[1]。PTC的发病及进展机制尚未明确,目前已知PTC的发病与遗传以及辐射相关^[4]。有研究表示^[5],PTC的发生、发展与微小RNA(miRNA)密切相关。

miRNA是一组长度为19~22个核苷酸非编码RNA,其结合mRNA的3'非翻译区(3'-UTR),并在转录后调节基因表达^[6]。miRNA在维持细胞正常生理功能中起着关键作用,例如细胞生长、细胞命运决定以及应激反应。miR-155-5p作为炎症相关的miRNA^[7],在多种肿瘤组织及细胞中呈高表达^[8-10],但miR-155-5p在PTC组织的具体表达与临床病理特征的相关性研究较少。

人细胞中的错配修复蛋白(mismatch repair proteins,MMRs)对于识别和修复DNA合成中的错误非常重要。MMR的丢失导致增殖细胞的DNA累积复制错误,这种现象称为微卫星不稳定性(microsatellite instability,MSI)。hMLH1是主要的错配DNA修复基因之一,其失活可导致多种癌症MSI增加^[11]。Guan等^[12]发现hMLH1基因的异常甲基化可能在BRAF基因突变促进的甲状腺肿瘤发生中起作用。

本课题组前期通过生物信息学预测miR-155-5p可结合hMLH1,故本次研究拟检测miR-155-5p在PTC中的表达,了解其对PTC细胞增殖、侵袭能力的影响,进一步分析其与靶基因hMLH1甲基化的调控关系,探索其分子机理。

1 材料与方法

1.1 一般材料

1.1.1 组织标本

本研究选取2016~2017年于浙江省肿瘤医院行初次甲状腺癌手术的PTC及相应的癌旁组织共20例,液氮中储存,均经病理证实。入组病例中男性6例,女性14例,切取部分新鲜癌和癌旁标本组织,迅速放入液氮中,整个留取标本过程均控制在3min内完成,并避免交叉污染,提取RNA前贮存于液氮罐中。

1.1.2 细胞系

来自中科院人PTC细胞(TPC-1细胞株、BCPAP细胞株),分装入多个培养瓶中,置于含5%CO₂的37℃孵箱中培养,传代2~3次至细胞株稳定生长。

1.2 方法

1.2.1 hMLH1基因与miR-155-5p结合位点预测

通过DIANA tools TarBase v.8网站检索miRNA-155的靶基因。

1.2.2 细胞转染

转染前一天将细胞以每孔约20万的数量接种于6孔板内,待第二天细胞生长密度至70%时,利用Lipofectamine™2000(Invitrogen)转染miR-155-5p mimics及对照序列(Negative Control,NC),置于5%CO₂的37℃孵箱中培养,转染后24~48h进行后续实验。

1.2.3 实时定量PCR

采用Trizol法提取各组细胞的总RNA,按试剂盒说明书(Mir-X™ miRNA First-Strand Synthesis Kit, TAKARA, 638313)操作进行反转录将RNA反转录为cDNA。qRT-PCR试剂盒(SYBR® Premix Ex Taq™ II, TAKARA, RR820A)进行定量PCR扩增,qRT-PCR总反应体系为25μl,包括SSYBR® Premix Ex Taq II (2×)12.5μl,PCR Forward引物(10μmol/L)2.0μl,PCR反向引物(10μmol/L)2.5μl,ddH₂O 8.0μl。引物(武汉擎科创新生物科技有限公司)序列如下:miR-155-5p上游引物为CTCAACTGGTGTCTGTG-GAGTCGGCAATTCAGTTGAGAACCCCTA,下游引物为ACACTCCAGCTGGGTTAATGC TAATCGTGATA;U6上游引物为CTCGCTTCGGCAGCACA,下游引物为AACGCTTCACGAATTTGCGT。PCR仪(ABI, Stepone plus),PCR扩增反应条件:95℃ 10min,随后95℃ 15s,60℃ 60s,重复40个循环。计算CT值。miR-155-5p的相对表达量用2^{-ΔΔCT}法计算,每个样本按照相同条件检测3次,求平均值,对所得数据进行计算机软件分析。

1.2.4 MTT法检测miR-155-5p对PTC细胞增殖的影响

选取转染miR-155-5p及对照序列(NC)两组人PTC细胞(TPC-1细胞株、BCPAP细胞株)将转染完后的细胞分别在12h、24h、36h、48h采用MTT法测波长为490nm时的吸光度值(optical density value, OD value),分析细胞增殖活性。实验重复3次。

1.2.5 Transwell 法检测 miR-155-5p 对 PTC 细胞侵袭能力的影响

采用培养基以 1:8 的比例稀释 50ml/L Matrigel 包被 Transwell 小室底部膜的上表面,放置于 37℃ 聚合成凝胶。取转染 miR-155-5p 及对照序列(NC)两组人 PTC 细胞 (TPC-1 细胞株、BCPAP 细胞株),将转染完后的细胞以每孔 50 000 细胞加入小室,放置于含 5% CO₂ 的 37℃ 孵箱中培养 24h。用棉签轻轻擦去 Matrigel 基质胶和上室的细胞,用 0.1% 结晶紫进行细胞染色后于显微镜下观察并拍照。实验重复 3 次。

1.2.6 Western Blot

细胞裂解获得总蛋白溶液,用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。制胶后蛋白样品上样,开始电泳,后湿法转膜,牛奶封闭 1h,加入一抗(三鹰,11697-1-AP)4℃ 孵育过夜次日用 TBST 室温下摇床上清洗 3 次。加二抗,室温孵育 30min 后, TBST 室温下洗 3 次,加入混合好的 ECL 溶液充分反应,开始曝光。将所得图像进行软件处理分析目标带的灰度值。

1.2.7 荧光素酶报告基因检测

选取转染 miR-155-5p 后以及未转染 miR-155-5p 的两组人 PTC 细胞 (TPC-1 细胞株、BCPAP 细胞株),在转染 miR-155-5p 48h 后,裂解细胞,使用双荧光素酶检测试剂盒 (Dual-Luciferase Reporter Assay System, Promega, E1910),在检测仪 (Synergy H1 全功能微孔板检测仪, bio-teck, Synergy H1) 上进行检测。在以萤火虫荧光素酶为内参的情况下,用 Renilla 荧光素酶测定得到的相对光单位 (relative light unit,

RLU) 的值除以萤火虫荧光素酶测定得到的 RLU 值,根据得到比值来比较 miRNA 对靶基因的抑制作用。

1.3 统计学处理

使用 SPSS 20.0 统计学软件分析数据,采用 Student-*t* 检验对组间数据进行差异分析; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 hMLH1 基因与 miR-155-5p 结合位点预测

生物信息学分析预测结果:网站证实 hMLH1 是 miR-155-5p 的靶基因,结合位点如 Figure 1 所示。

2.2 miR-155-5p 在 PTC 组织和细胞中的表达水平

采用实时定量 PCR 实验检测 PTC 组织及癌旁正常组织中 miR-155-5p 的表达水平,结果显示:与癌旁正常组织相比,miR-155-5p 在 PTC 组织中的表达水平明显增加,差异有统计学意义 ($t=3.492$, $P=0.002$)。见 Figure 2A。

采用实时定量 PCR 实验检测 PTC 细胞 (TPC-

ID	Duplex structure	Position	Score	MFE
1	miRNA 3' ugGGGAUAGUGCUAAUCGUAUu 5' : : Target 5' ttgCCT-TC-TGA-TAGTATTcc 3'	125~144	121.00	-8.6
2	miRNA 3' ugGGGAUAGU-GCUA--AUCGU-AAUu 5' : Target 5' accaacATAAGTGTGGTAGCACTTaa 3'	89~115	115.00	-10.10
3	miRNA 3' ugGGGAUAGUGCUA---AUCGUAUu 5' : : :: Target 5' ctCTGTATTCCGATACAAAGTGTGt 3'	39~64	113.00	-8.10

Figure 1 Prediction of binding site of hMLH1 gene to miR-155-5p

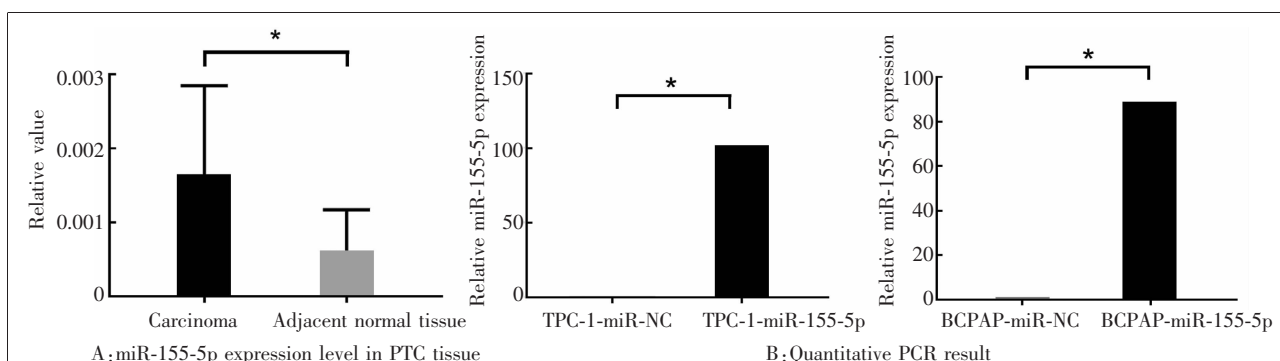


Figure 2 Expression level of miR-155-5p in PTC tissue and cells (* $P < 0.05$)

1、BCPAP) 实验组和对照组中 miR-155-5p 在细胞中的表达水平,结果显示:相较于对照组,转染 miR-155-5p mimics 的 PTC 细胞中 miR-155-5p 的表达水平明显增加,且差异均有统计学意义。(TPC-1 细胞株: $t=4.214, P=0.002$;BCPAP 细胞株: $t=4.268, P=0.002$)。见 Figure 2B。

2.3 miR-155-5p 对 PTC 细胞增殖能力影响

采用 MTT 实验检测 PTC 细胞 (TPC-1、BCPAP) 实验组和对照组的增殖能力,实验结果显示:相较于对照组,转染 miR-155-5p mimics 的 PTC 细胞增殖能力明显增强,且差异具有统计学意义 (TPC-1 细胞株 48h: $t=4.378, P=0.012$,BCPAP 细胞株 48h: $t=22.106, P<0.001$)。见 Figure 3。

2.4 miR-155-5p 对 PTC 细胞侵袭能力影响

采用 Transwell 侵袭实验检测 PTC 细胞 (TPC-1、BCPAP) 实验组和对照组的侵袭能力,结果显示:转染 miR-155-5p mimics 组通过 Matrigel 基质胶的细胞数量明显多于对照组,差异有统计学意义 (TPC-1 细胞株: $t=3.182, P=0.013$,BCPAP 细胞株: $t=7.872, P<0.001$)。见 Figure 4。

2.5 转染 miR-155-5p 模拟剂及对照序列 (NC) 的 PTC 细胞中 hMLH1 蛋白表达

采用 Western Blot 实验检测 PTC 细胞 (TPC-1、BCPAP) 实验组和对照组中 hMLH1 蛋白的相对表达量,结果显示:转染 miR-155-5p mimics 的 PTC 细胞中 hMLH1 蛋白表达明显低于对照组,差异有统计学意义 (TPC-1 细胞株: $t=5.137, P=0.007$,BCPAP 细胞株: $t=3.684, P=0.021$)。见 Figure 5。

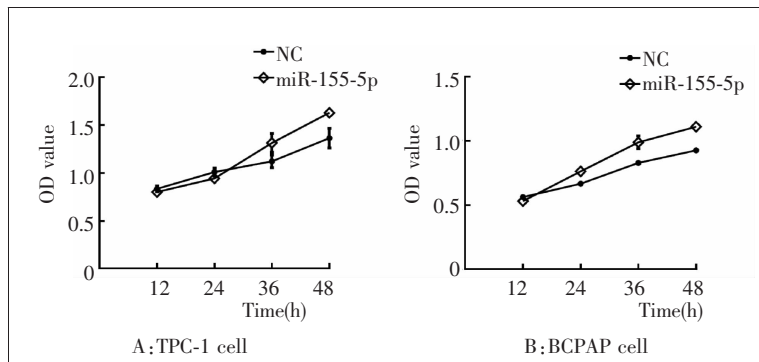


Figure 3 Ability of cell proliferation

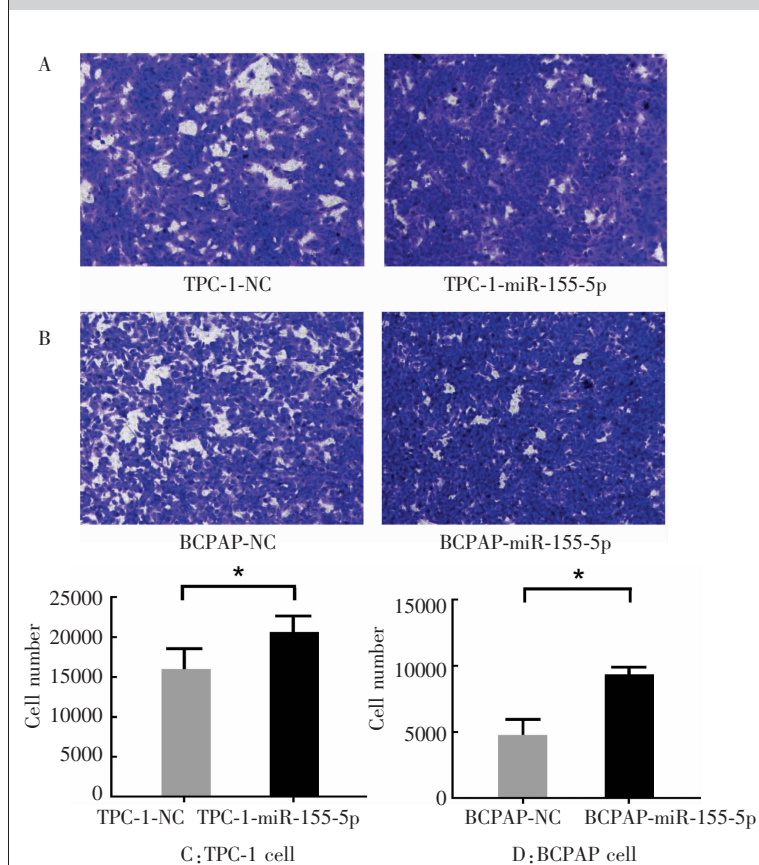


Figure 4 Ability of cell invasion report (* $P<0.05$)

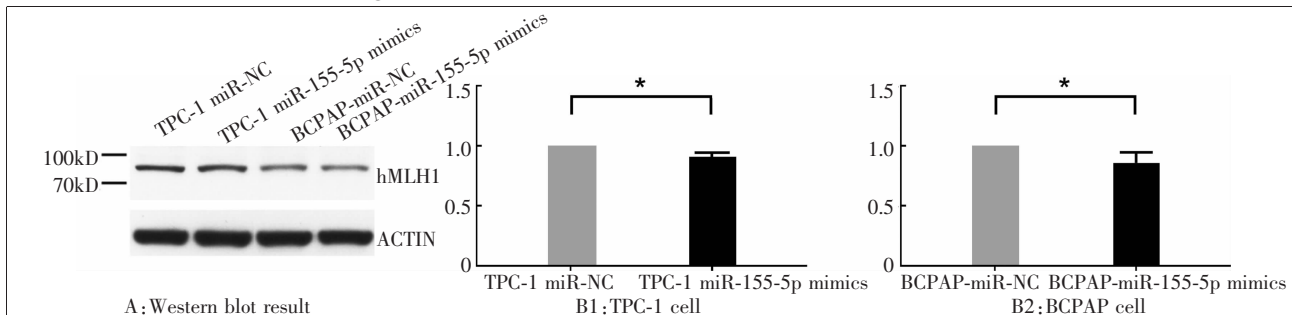


Figure 5 Expression of hMLH1 protein in PTC cell (Grey value ratio) (* $P<0.05$)

2.6 荧光素酶报告结果

采用荧光素酶报告实验检测 293T 细胞实验组和对照组中相对荧光素酶活性,结果显示:与对照组相比,转染 miR-155-5p mimics 的 293T 细胞中相对荧光素酶活性明显低于对照组,差异有统计学意义($t=10.750, P<0.001$)。见 Figure 6。

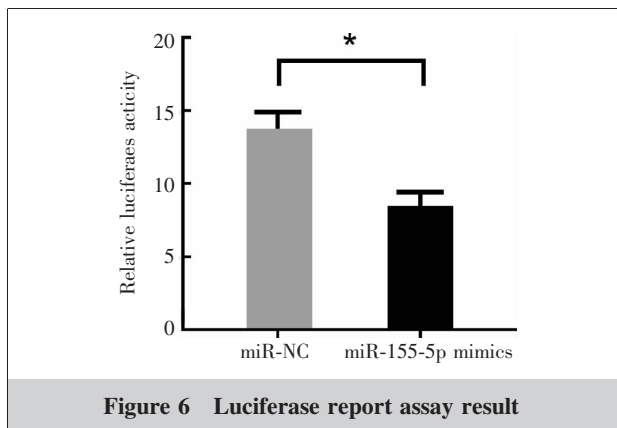


Figure 6 Luciferase report assay result

3 讨论

甲状腺乳头状癌是最常见的甲状腺恶性肿瘤,近年来发病率增长最迅速^[13],目前各种研究表明,miR-155-5p 在各种肿瘤类型中过表达,并且在肺癌细胞中显著上调^[14,15]。Zhang 等^[16]研究发现 miR-155-5p 可作为鉴定肾透明细胞癌患者高复发风险的临床生物标志物。Zhang 等^[17]发现过表达 miR-155 可提高 PTC 细胞的活力,并且可以促进细胞集落的形成。朱有志等^[18]学者认为 miR-155 高表达的 PTC 常具有肿瘤更大、甲状腺包膜外更易侵犯、颈部淋巴结更高转移率及 TNM 分期更晚等临床病理特点,其可作为 PTC 患者预后不良评估指标之一。Lee 等^[19]学者研究发现 miR-155 表达水平有助于区分良性和恶性病变,并可在淋巴结转移的情况下区分良性和恶性病变,可作为 PTC 诊断的血清学标志物。

本研究我们通过实时定量 PCR 实验证明 miR-155-5p 可能在甲状腺乳头状癌的发生发展中发挥癌基因的作用,其具体致癌机制有待进一步研究。通过 MTT、Transwell 侵袭实验证明 miR-155-5p 过表达对 PTC 的增殖和侵袭能力具有促进作用。

hMLH1 位于染色体的 3p21-23 区域,是人类 DNA 错配修复(mismatch repair, MMR)系统的重要组成部分。*hMLH1* 基因的甲基化失活被证实与多种实

体肿瘤发生密切相关。其潜在的机制可能为 *hMLH1* 蛋白的缺失造成微卫星不稳定,从而进一步致使一系列抑癌基因的杂合性缺失。我们前期研究也发现在 PTC 组织中 *hMLH1* 基因启动子甲基化率明显高于癌旁正常组织,并且与原发灶大小、数量、局部侵犯情况、T 分期和颈部淋巴结转移情况有关,而与患者性别、病理分期无关(均 $P>0.05$),因此认为 *hMLH1* 基因启动子甲基化是 PTC 组织中较常见的分子事件,*hMLH1* 在转录水平抑制,并与 PTC 的恶性进展关系密切^[20]。本研究中我们通过生物信息学预测、Western Blot 检测及荧光素酶检测等验证发现 miR-155-5p 可靶向抑制 *hMLH1* 的表达,进一步说明 PTC 中 *hMLH1* 还存在转录后水平的抑制。

Giaginis 等^[21]学者研究发现 PTC 中 *hMLH1* 基因表达率(40%, 16/40)明显高于增生性结节(13%, 4/30),而低于滤泡癌(86%, 6/7)及恶性程度更高的髓样癌(80%, 4/5)和未分化癌(100%, 2/2),同时还发现增生性结节的 *hMLH1* 均表达在细胞核内,而 PTC 则表达在核周和细胞质中,其他类型的甲状腺恶性肿瘤则在核内,胞质内都有表达;而且 *hMLH1* 的表达和淋巴结转移、血管侵犯相关。该团队推断 *hMLH1* 基因在甲状腺恶性肿瘤中可能存在双面性:即在早期,在各种环境因素的影响下 *hMLH1* 基因受各种表观调控因素影响而失活,诱发肿瘤;到了癌症进展期 *hMLH1* 在胞质及核膜上的异位表达可能促进了肿瘤生长和播散。

本研究仍有许多局限性,如样本量不足等,将来应扩大样本量进一步评估 miR-155-5p 作为 PTC 生物标志物的意义和价值,*hMLH1* 在 PTC 中的详细作用机制也需进一步的验证。

综上所述,miR-155-5p 在 PTC 中表达升高,可促进 PTC 增殖和侵袭,并可靶向调控 *hMLH1* 基因的表达,是治疗 PTC 的潜在靶点。

参考文献:

- [1] La Vecchia C, Malvezzi M, Bosetti C, et al. Thyroid cancer mortality and incidence: a global overview [J]. Int J Cancer, 2015, 136(9): 2187-2195.
- [2] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017 [J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(1): 7-30.
- [3] Zheng R, Zeng H, Zhang S, et al. National estimates of cancer prevalence in China, 2011 [J]. Cancer Lett,

- 2016,370(1):33-38.
- [4] Hemminki K,Li X. Familial risk of cancer by site and histopathology[J]. *Int J Cancer*,2003,103(1):105-109.
- [5] Omur O,Baran Y. An update on molecular biology of thyroid cancers[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*,2014,90(3):233-252.
- [6] Ambros V. MicroRNA pathways in flies and worms: growth,death,fat,stress,and timing[J]. *Cell*,2003,113(6):673-676.
- [7] Rui Y,Ma Y,Du Y,et al. The altered expression of inflammation-related microRNAs with microRNA-155 expression correlates with Th17 differentiation in patients with acute coronary syndrome [J]. *Cell Mol Immunol*,2011,8(6):486-495.
- [8] Zhang GJ,Xiao HX,Tian HP,et al. Upregulation of microRNA-155 promotes the migration and invasion of colorectal cancer cells through the regulation of claudin-1 expression[J]. *Int J Mol Med*,2013,31(6):1375-1380.
- [9] Kono H,Nakamura M,Ohtsuka T,et al. High expression of microRNA-155 is associated with the aggressive malignant behavior of gallbladder carcinoma [J]. *Oncol Rep*,2013,30(1):17-24.
- [10] Zhao XD,Zhang W,Liang HJ,et al. Overexpression of miR-155 promotes proliferation and invasion of human laryngeal squamous cell carcinoma via targeting SOCS1 and STAT3[J]. *PLoS One*,2013,8(2):e56395.
- [11] Bologna-Molina R,Pereira-Prado V,Sánchez-Romero C,et al. Expression of hMLH1 and hMSH2 proteins in ameloblastomas and tooth germs [J]. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*,2018,23(2):e126-e131.
- [12] Guan H,ji M,Hou P,et al. Hypermethylation of the DNA mismatch repair gene hMLH1 and its association with lymph node metastasis and T1799A BRAF mutation in patients with papillary thyroid cancer [J]. *Cancer*,2010,113(2):247-255.
- [13] Saral M,R Michael T,Mira M,et al. Database and registry research in thyroid cancer:striving for a new and improved national thyroid cancer database [J]. *Thyroid*,2015,25(2):157-168.
- [14] Cheng TL,Hu CP,Li M,et al. Role of miR-155 in invasion and metastasis of lung adenocarcinoma A549 cells[J]. *Chinese Journal of Oncology*,2016,38(2):86-92.[程田力,胡成平,李敏,等. miR-155 在肺腺癌 A549 细胞侵袭和转移中的作用[J]. *中华肿瘤杂志*,2016,38(2):86-92.]
- [15] O'Connell RM,Taganov KD,Boldin MP,et al. MicroRNA 155 is induced during the macrophage inflammatory response[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2007,104(5):1604-1609.
- [16] Zhang J,Ye Y,Chang DW,et al. Global and targeted miRNA expression profiling in clear cell renal cell carcinoma tissues potentially links miR-155-5p and miR-210-3p to both tumorigenesis and recurrence [J]. *Am J Pathol*,2018,188(11):2487-2496.
- [17] Zhang X,Li M,Zuo K,et al. Upregulated miR-155 in papillary thyroid carcinoma promotes tumor growth by targeting APC and activating Wnt/beta-catenin signaling [J]. *J Clin Endocrinol Metab*,2013,98(8):E1305-E1313.
- [18] Zhu YZ,Zheng K,Zhang HH,et al. Expression of microRNA-155 in papillary thyroid carcinoma and its clinical significance[J]. *Journal of Southern Medical University*,2016,36(10):1364-1368.[朱有志,郑珂,张惠灏,等. MicroRNA-155 在甲状腺乳头状癌中的表达及临床意义[J]. *南方医科大学学报*,2016,36(10):1364-1368.]
- [19] Lee YS,Lim YS,Lee JC,et al. Differential expression levels of plasma-derived miR-146b and miR-155 in papillary thyroid cancer[J]. *Oral Oncol*,2015,51(1):77-83.
- [20] Lu XX,Ge MH,Lin ZQ,et al. The correlation among hMLH1,NIS and TSHR genes with promoter methylation in papillary thyroid carcinoma and its clinical significance [J]. *Tumor*,2013,33(5):446-453.[陆晓筱,葛明华,凌志强,等. 甲状腺乳头状癌中 hMLH1、NIS 和 TSHR 基因异常甲基化的相互关系及临床意义 [J]. *肿瘤*,2013,33(5):446-453.]
- [21] Giaginis C,Michailidi C,Stolakis V,et al. Expression of DNA repair proteins MSH2,MLH1 and MGMT in human benign and malignant thyroid lesions:an immunohistochemical study[J]. *Med Sci Monit*,2011,17(3):R81-R90.