

临床细胞生物学

HINT2在甲状腺乳头状癌中的表达和功能研究

张沪娇^{1,2#} 李慧^{1#} 高维¹ 李豪¹ 刘丹慧^{1*}¹温州医科大学检验医学院、生命科学学院, 检验医学教育部重点实验室, 浙江省医学遗传学重点实验室, 温州 325035; ²成都市第五人民医院, 成都 611130)

摘要 HINT2与多种肿瘤发生发展密切相关, 在甲状腺癌中的功能还不清楚。该文使用组织芯片检测甲状腺乳头状癌组织中HINT2的表达, 发现12例癌组织中HINT2蛋白表达水平显著高于正常组织(86%, $P < 0.05$)。该文构建高表达和低表达HINT2的甲状腺乳头状癌细胞系K1稳定克隆后, 使用CCK8和克隆形成实验检测HINT2对细胞增殖能力的影响, 采用Transwell和划痕法检测细胞迁移能力, 使用Matrigel Transwell法检测细胞侵袭能力。结果发现, 高表达HINT2促进了K1细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 而干扰HINT2则抑制了细胞的这些恶性表型。最后, 该文用Western blot方法检测AKT和ERK的活化情况, 发现高表达HINT2促进AKT和ERK的磷酸化, 而干扰HINT2则抑制AKT和ERK的磷酸化。这些结果说明, HINT2可能是甲状腺乳头状癌的原癌基因, 通过调控PI3K/AKT和MAPK/ERK通路影响甲状腺肉头状癌的恶性表型。

关键词 甲状腺乳头状癌; 肿瘤恶性表型; K1细胞株; HINT2

The Expression and Function of HINT2 in Papillary Thyroid Carcinoma

ZHANG Lujiao^{1,2#}, LI Hui^{1#}, GAO Wei¹, LI Hao¹, LIU Danhui^{1*}¹Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics, Key Laboratory of Laboratory Medicine, Ministry of Education, School of Laboratory Medicine and Life Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China;²Chengdu Fifth People's Hospital, Chengdu 611130, China,)

Abstract HINT2 plays important roles in the occurrence and progression of many cancers. Its role in thyroid carcinoma, however, has not been well defined. This study detected the expression of HINT2 in thyroid carcinoma tissue microarray. The results showed HINT2 was significantly higher expressed in 12 papillary thyroid carcinoma samples compared with the adjacent normal tissue (86%, $P < 0.05$). K1 cell lines overexpressing or knockdown HINT2 were established. CCK8 and clone formation assays were used to evaluate cell proliferation, Transwell and *in vitro* scratch assays were used to detect cell migration potential, and finally, Matrigel Transwell assay was used to explore cell invasion ability. The results showed that overexpression of HINT2 potentiated cell

收稿日期: 2021-01-05 接受日期: 2021-02-02

国家自然科学基金青年基金(批准号: 81301744)、浙江省自然科学基金(批准号: Y2090378)和温州市公益性科技计划项目(批准号: Y20170036)资助的课题
*共同第一作者

*通讯作者。Tel: 0577-86699651, E-mail: danhui@outlook.com

Received: January 5, 2021 Accepted: February 2, 2021

This work was supported by the Natural Science Foundation of China (Grant No.81301744), Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (Grant No.Y2090378), and Nonprofit Science and Technology Foundation of Wenzhou, Zhejiang, China (Grant No.Y20170036)

*These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-577-86699651, E-mail: danhui@outlook.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5509>

proliferation, migration and invasion, whereas HINT2 knockdown inhibits these malignant phenotypes. Additionally, the activation of AKT and ERK signal pathway were detected by Western blot. The results showed that ectopic expression of HINT2 increased the phosphorylation of AKT and ERK, whereas HINT2 knockdown inhibited this process. Taken together, these results suggest that *HINT2* plays oncogene role in papillary thyroid carcinoma, and regulates cell proliferation, migration and invasion through modulating PI3K/AKT and MAPK/ERK signal pathway.

Keywords papillary thyroid carcinoma; malignant phenotype; K1 cell line; HINT2

甲状腺癌是最常见的内分泌性恶性肿瘤,约占全身恶性肿瘤的1%^[1],年均增长6.2%。甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)是一种上皮恶性肿瘤,典型特征是其乳头状外观,是甲状腺最常见的恶性肿瘤(80%~85%)。PTC的10年生存率约为93%,主要发生在中年人,男女发病率之比为1:3,年龄中位数为50岁,是最常见的小儿甲状腺恶性肿瘤^[2-3]。大多PTC具有很好的分化能力,发生局部浸润、复发或转移(区域或远处)的概率较低,长期预后非常好,在10年的随访中,成人的生存率为92%~98%。然而有一小部分患者肿瘤侵袭性较强,发生局部或区域性复发或者远处转移,需要进一步治疗。影响PTC预后的因素包括:性别、就诊年龄、组织学和肿瘤分期^[4]。目前临床治疗PTC主要是手术切除、辅助放射性碘消融以及终生甲状腺激素治疗(通常与左甲状腺素一起作为单药治疗)^[5]。为了获得更好的指标来评判PTC发生发展,以及获得更佳的治疗策略,对PTC发生发展的机制和干预靶点的研究显得越发重要。

组氨酸三联体核苷酸结合蛋白是高度保守的二聚体蛋白, HINT2是五个家族成员之一, HINT2的分子量为16 kDa,位于内膜接触部位附近的线粒体中^[6],是线粒体腺苷磷酸酰胺酶^[7],在各种细胞类型的线粒体中表达。越来越多的研究发现, HINT2在肿瘤的发生发展中有着举足轻重的作用。在人类肾上腺癌细胞, HINT2调节线粒体Ca²⁺稳态^[6]。在结肠癌细胞中干扰HINT2可以促进缺氧诱导因子2 α (hypoxia inducible factor 2 α , HIF2 α)表达,从而诱导细胞上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)并增强细胞迁移和侵袭。因此, HINT2被认为可能是结肠癌进展和转移风险重要的临床指标^[8]。在H295R细胞中, HINT2是获得最佳类固醇生成反应所必需的^[9]。孕激素和骨化三醇结合上调促凋亡HINT2和真核翻译起始因子2 α 激酶2(eukaryotic

translation initiation factor kinase 2, EIF2AK2)蛋白的表达,从而引起子宫内膜癌细胞的凋亡和细胞周期停滞^[10]。在肝癌患者肿瘤组织中, HINT2的低表达与患者手术预后相关^[11]。干扰HINT2后, HepG2细胞中HIF2 α 的表达和活性氧的产生均增加^[12]。HINT2在某些类型的癌症中可能起抑癌作用。同时研究显示, HINT2是一种哺乳动物特异性的核编码线粒体HINT水解酶,其过表达使细胞对细胞凋亡敏感^[6]。但直到最近, HINT2对PTC恶性表型的影响及其调控机制尚不清楚。

1 材料与方法

1.1 样本组织

甲状腺癌及癌旁组织芯片购自西安艾丽娜生物科技有限公司,该芯片包含17例甲状腺癌组织标本,其中男性4例,女性13例,年龄20~79岁。肿瘤按照世界卫生组织标准分类,其中包含14例乳头状癌(I级7例, II级5例, III级2例),滤泡性乳头状癌1例,髓样癌1例,未分化癌1例。本研究已获温州医科大学伦理委员会审核批准。

1.2 细胞和主要试剂

甲状腺乳头状癌细胞系K1购自广州吉妮欧生物有限公司; HINT2干扰质粒载体pGPU6/GFP/Neo-HINT2由上海吉玛制药技术有限公司合成; pSin/eGFPires/Puro-HINT2重组质粒由本课题组构建;胎牛血清购自杭州沃森生物技术有限公司; DMEM培养基购自美国Gibco公司; Jetprime转染试剂购自法国Polyplus公司; HINT2多克隆抗体购自德国Novus Biologicals公司; Transwell小室购自美国Corning公司; CCK8购自日本Dojindo公司。

1.3 免疫组化染色

运用免疫组化技术于芯片上检测17例恶性甲状腺肿瘤标本及其匹配的癌旁组织中HINT2的表达。将石蜡切片于65 °C温箱烘烤2 h后经二甲苯彻

底脱蜡,然后用10 mol/L柠檬酸钠于100 °C条件下孵育30 min,进行抗原修复,PBS清洗3次,每次5 min;3% H₂O₂避光孵育15 min,PBS清洗3次,每次5 min;20%山羊血清室温封闭20 min,弃去封闭液。4 °C孵育HINT2过夜,PBS清洗3次,每次5 min;室温孵育FITC标记的二抗1 h后,PBS清洗3次,每次5 min;DAB显色,苏木素复染1 min后经70%、90%和100%乙醇梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜下观察染色结果并拍照。

1.4 细胞培养及转染

细胞用含体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养基,于37 °C、5% CO₂、95%湿度的培养箱中培养,每2~3天更换一次新鲜培养基,待细胞生长至70%~80%融合时,用胰酶进行消化传代。取对数生长期的细胞,以1×10⁵个/孔接种至6孔板中,细胞融合达50%~60%,更换新鲜培养基,参照Polyplus试剂说明书分别转染HINT2干扰质粒/对照空载质粒及HINT2高表质粒/对照空载质粒。实验分组:空白对照、Cont(阴性对照质粒+Polyplus)、HINT2(HINT2质粒+Polyplus)、ShCont(阴性对照质粒+Polyplus)、ShHINT2(ShHINT2质粒+Polyplus)。转染24 h后更换培养基,加入G-418、嘌呤霉素(Puromycin)的最低致死浓度筛选,每2~3天更换新鲜培养液,培养10~14天获得单细胞克隆团,用枪头挑取克隆团细胞加入96孔板培养,扩大培养,获得稳定表达的单克隆株。

1.5 RT-PCR

收集对数生长期的细胞,Trizol法提取细胞总RNA,参照逆转录试剂盒操作合成cDNA,以cDNA为模板进行实时荧光定量PCR检测稳定构建的细胞株中HINT2 mRNA的表达。HINT2上游引物5'-CAT TCC TAA GAA GCC CAT T-3',下游引物5'-ATC ACA AGT CGG TAT CCA T-3';内参β-actin上游引物5'-ACC CAC ACT GTG CCC ATC TAC-3',下游引物5'-TCG GTG AGG ATC TTC ATG AGG TA-3'。PCR反应体系为1 μL cDNA、10 μL 2× SYBR Premix Ex Taq、50× ROX Reference Dye 0.4 μL,上下游引物体系各400 nmol/L,补ddH₂O至20 μL。反应条件:95 °C预变性30 s;95 °C 5 s,60 °C 30 s,共40个循环;熔解反应条件:95 °C 15 s,全速降温至60 °C 1 min,0.3 °C/s升温至95 °C。

1.6 CCK8法

取对数生长期的细胞,将细胞分别以2 000个/孔

接种至96孔板中,每种细胞设置3个复孔,分别于培养0、24、48、72、96 h后,(以细胞刚贴壁时为0 h)以换液形式加入CCK8检测试剂(CCK8:DMEM=1:9)100 μL/孔,5个无细胞孔为空白对照,培养箱37 °C孵育2 h后用酶标仪检测450 nm波长处的吸光度(D)值,计算细胞增殖活性,实验重复3次。

1.7 平板克隆法

实验分组,取对数生长期细胞,分别以500个/孔接种至6孔板中,每种细胞设置2个复孔,37 °C、5% CO₂、95%湿度的培养箱中培养,每2~3天更换新鲜培养基,10~14天后4%多聚甲醛固定15 min,洗涤,结晶紫染色15 min,晾干后拍照。

1.8 迁移实验

我们用2种实验检测了细胞的迁移能力:包括划痕实验和Transwell实验。划痕实验:预先在12孔板背面划三道横线,每道横线间相隔约0.5 cm。实验分组,取对数期细胞以7.5×10⁵个/孔密度接种于12孔板,37 °C、5% CO₂、95%湿度培养箱中培养。待细胞长至90%左右时,用小号枪头沿着直尺均匀垂直划竖线,每孔三道竖线,用PBS轻轻洗涤3次,加入1 mL DMEM后放于37 °C、5% CO₂、95%湿度的培养箱中培养。在0、24、48 h时,10×镜下对K1细胞同一个位置进行拍照,以随机原则,选取10个或以上的视野(拍照前均用PBS洗涤2次)。Transwell实验:预先用DMEM饥饿HINT2高低表稳转株细胞及其各自对照24 h后,收集细胞,小室上室加入200 μL DMEM重悬的细胞悬液(5×10⁴个/孔),下室中加入0.6 mL含20% FBS DMEM培养基,放入培养箱培养24 h后取出固定染色,倒置显微镜下观察小室并拍照。

1.9 侵袭实验

在Transwell小室上室铺上预冷的Matrigel稀释液(DMEM:Matrigel=1:9),45 μL/孔,37 °C过夜使Matrigel凝固。实验前1 h加入100 μL DMEM水化,弃去多余液体,待用。其余步骤同Transwell迁移实验。

1.10 Western blot检测

预先将细胞接种到6孔板中,待细胞长到70%~80%融合时,收集细胞,使用裂解液(RIPA:PMSF=100:1,现配现用)冰上裂解30 min,提取蛋白。4 °C、14 000 r/min离心15 min,收集上清。BCA法进行蛋白定量,5×上样缓冲液(loading buffer)于100 °C条件下变性5 min。

用12%的分离胶和5%浓缩胶, 浓缩胶70 V 40 min; 分离胶110 V 90 min电泳。取出凝胶, 冰上转PVDF膜, 300 mA 90 min。5%牛奶室温封闭2 h后, 4 °C孵育actin、AKT/p-AKT、ERK/p-ERK过夜; 加入辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育2 h, ECL显影, 凝胶成像仪曝光。以actin为内参, 分析目的蛋白的表达量。

1.11 统计学处理

应用SPSS 17.0统计软件对结果进行统计学分析, 采用独立样本 t 检验方法进行分析, $P < 0.05$ 表明具有统计学意义。

2 结果

2.1 PTC中HINT2表达量上调显著

采用双盲法统计实验结果, 肉眼观察组织切片HINT2蛋白表达差异(棕色信号), 运用正置显微镜高倍(400 \times)拍摄, 每张切片随机选取5个视野。结果(图1)显示, 在滤泡性乳头状癌、髓样癌、未分化癌中HINT2表达量与相应对照未见明显差异, 但在14例甲状腺乳头状癌组织中, 12例显示HINT2明显高表达, 高表达率达86%, 而在对应癌旁正常组织中均表达量低或几乎不表达。这表明HINT2的高表达可能

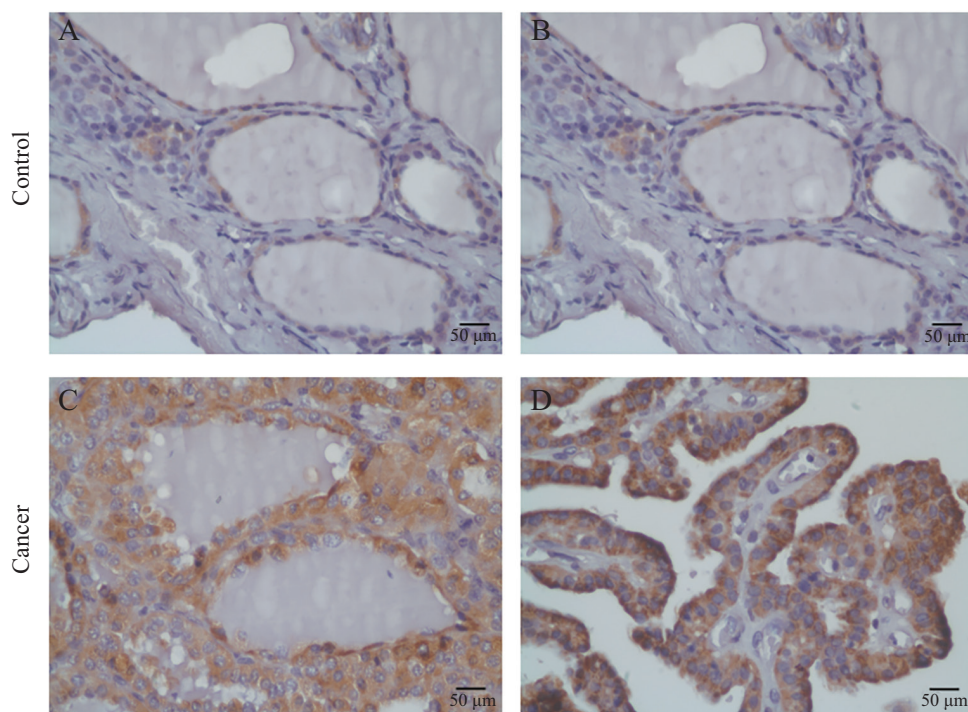
与甲状腺癌的发生相关。

2.2 HINT2调控PTC细胞增殖能力

明确HINT2高表达于PTC组织后, 我们构建了高表达和低表达HINT2的PTC细胞系K1稳定克隆, 并使用RT-PCR(图2A)和Western blot(图2B)检测了HINT2的表达, 结果显示HINT2高表达细胞株中HINT2表达量明显高于其对照组, HINT2干扰细胞株的HINT2表达量明显低于其对照组($P < 0.05$), 说明克隆构建成功。接着我们使用构建成功的细胞系, CCK8法(图2C)和平板克隆(图2D)检测细胞增殖能力, 结果显示, HINT2高表达组较Cont组细胞活性明显增加, HINT2干扰组较ShCont细胞活性明显降低, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); HINT2高表达组细胞培养10天后形成的克隆细胞团数目较Cont组明显增加, HINT2干扰组形成的克隆细胞团数目较ShCont细胞明显减少, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果表明: HINT2增强细胞活性, 促进细胞增殖。所有数据均进行三次及以上独立实验并且实验结果相同, 数据分析采用 t 检验。

2.3 HINT2调控PTC细胞迁移侵袭能力

明确HINT2调控PTC细胞增殖活性后, 我们运

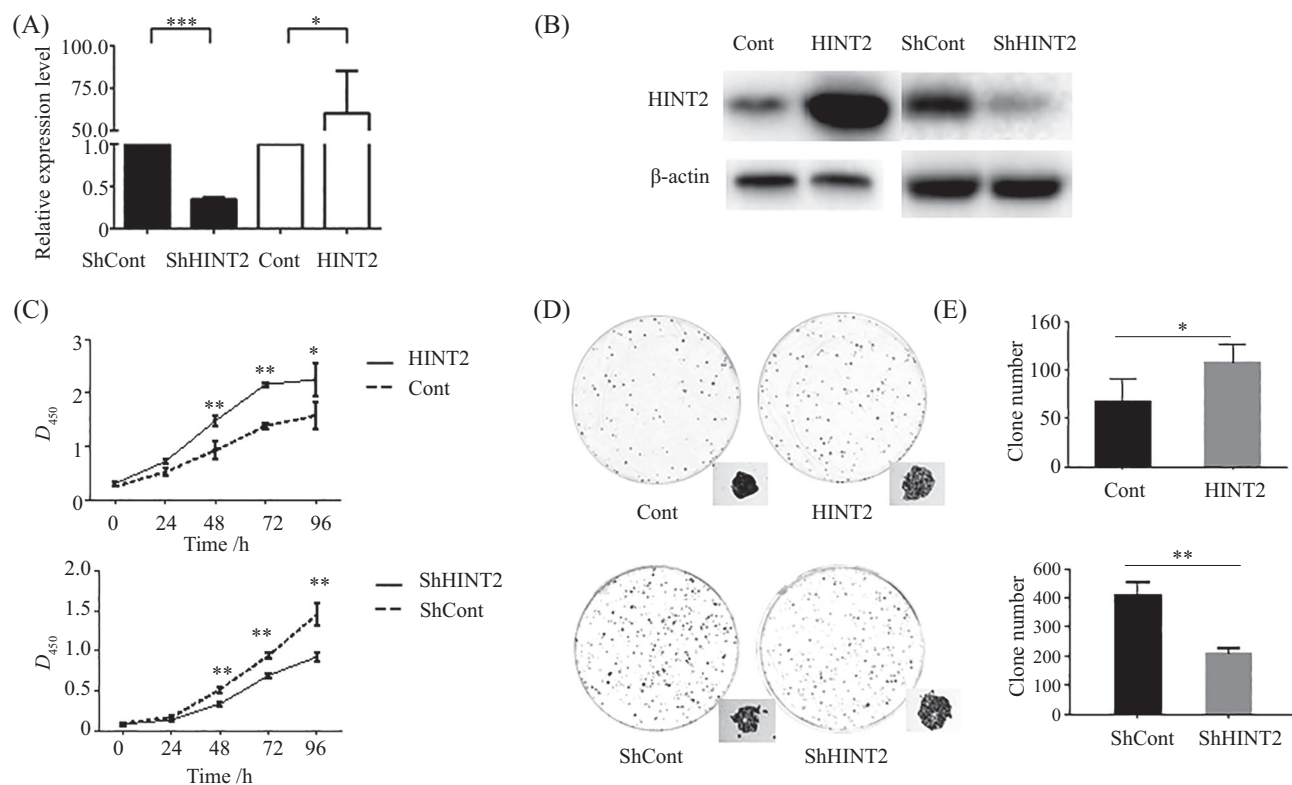


A、B: 癌旁组织; C、D: 甲状腺乳头状癌。

A,B: normal thyroid tissue; C,D: papillary thyroid carcinoma.

图1 免疫组化染色检测HINT2在甲状腺乳头状癌中的表达

Fig.1 Detect the expression of HINT2 in PTC by immunohistochemical staining



A: K1细胞株中HINT2 mRNA表达; B: K1细胞株中HINT2蛋白的表达; C: CCK8检测细胞活性; D: 平板克隆拍照; E: 平板克隆克隆团个数统计。
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与Cont组比较。

A: HINT2 mRNA expression of K1 cell line; B: HINT2 protein expression of K1 cell line; C: detection of cell viability by CCK8; D: image of plate clone; E: statistics of plate clone number. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Cont group.

图2 CCK8和平板克隆检测细胞增殖能力

Fig.2 Detection of cell proliferation rate by CCK8 and plate clone

用Transwell(图3A)和划痕实验(图3C和图3D)检测细胞迁移能力,结果显示:HINT2高表达组较Cont组迁移能力明显增加,HINT2干扰组较ShCont迁移能力明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$);说明HINT2增强细胞迁移能力,促进PTC细胞迁移。紧接着我们通过Matrigel Transwell(图3D)检测细胞侵袭能力。结果显示:HINT2高表达组较Cont组侵袭能力明显增加,HINT2干扰组较ShCont侵袭能力明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。说明HINT2调控PTC细胞侵袭,增强PTC细胞侵袭能力,促进PTC细胞体外侵袭。所有数据均进行三次及以上独立实验并且实验结果相同,数据分析采用 t 检验。

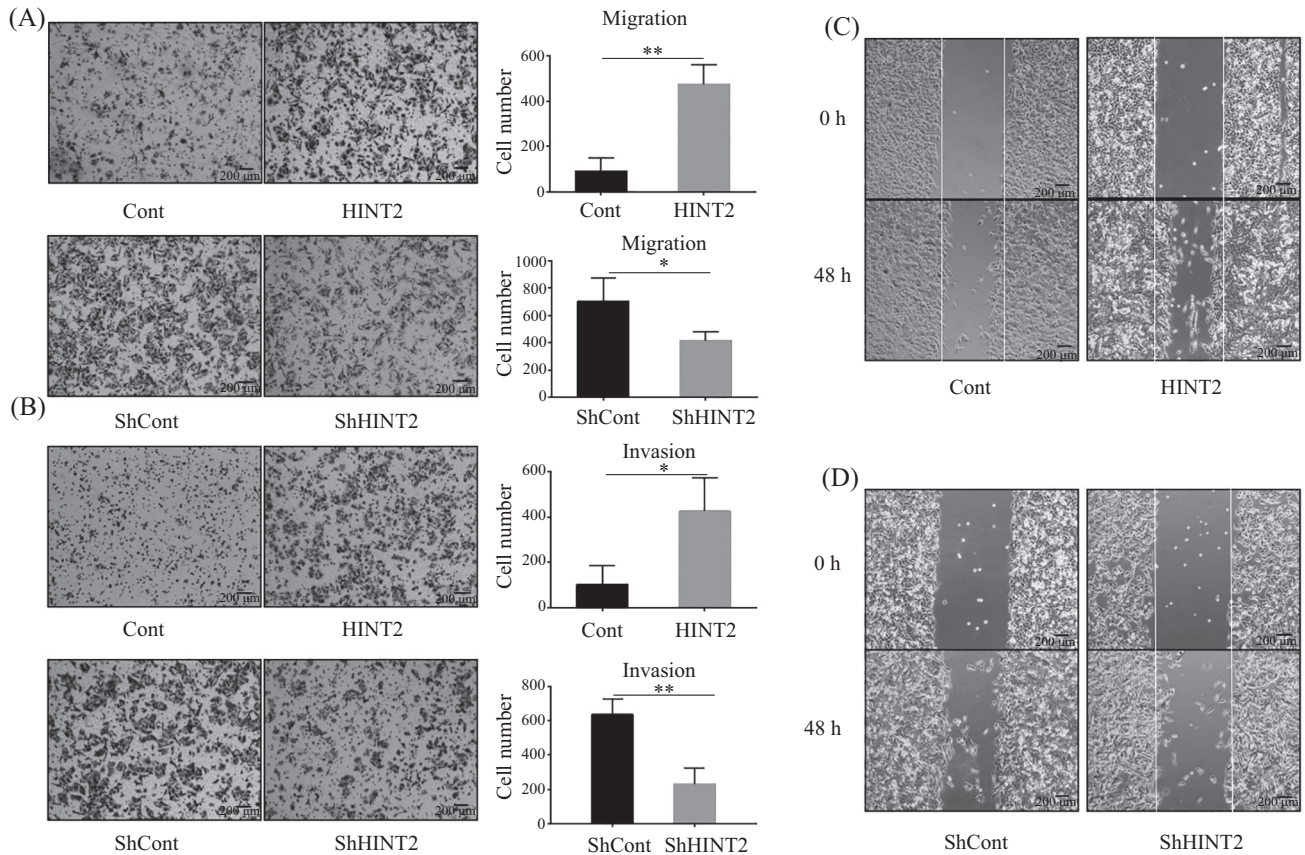
2.4 HINT2调控PI3K/AKT及MAPK/ERK通路的活化

明确HINT2促进PTC细胞增殖、迁移、侵袭等恶性行为后,我们运用Western blot(图4A和图4B)检测细胞AKT和ERK蛋白水平。结果显示:HINT2高表达细胞株显著上调p-AKT、p-ERK蛋白表达水平

($P < 0.05$),HINT2低表达显著下调p-AKT、p-ERK蛋白表达水平($P < 0.05$)。结果表明,HINT2高表达上调p-AKT、p-ERK的磷酸化水平,HINT2干扰株p-AKT、p-ERK的磷酸化水平明显降低,说明HINT2是通过激活PI3K/AKT及MAPK/ERK通路来上调p-AKT、p-ERK的磷酸化水平的,从而促进细胞增殖、迁移、侵袭等恶性表型。

3 讨论

随着诊断技术的进步和超声(ultrasonic)引导下的细针穿刺活检(fine needle aspiration biopsy, FNAB)的开展^[2],甲状腺癌的发病率迅速增加(1%~3%),这主要由于PTC的发生率增加造成,但死亡率仍保持稳定。目前,甲状腺癌的主要治疗方式仍是全甲状腺切除术、放射性碘(RAI)消融术和TSH治疗法,这些疗法在肿瘤细胞扩散之前有超过95%的5年生存率^[13]。然而,远处转移和复发仍然发生在某些亚型的人群中,PTC和高级PTC的5年存活率只有差不多59%^[14-15]。同



A: K1细胞株迁移拍照图及迁移细胞数统计; B: K1细胞株侵袭拍照图及侵袭细胞数统计; C: HINT2高表达细胞组划痕拍照; D: HINT2干扰细胞组划痕拍照。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A: transwell picture and transwell number statistics of K1 cell line; B: invasion picture and invasion number statistics of K1 cell line; C: *in vitro* scratch picture of the HINT2 high expression cell group; D: *in vitro* scratch picture of the HINT2 low expression cell group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图3 K1细胞迁移和侵袭能力的检测

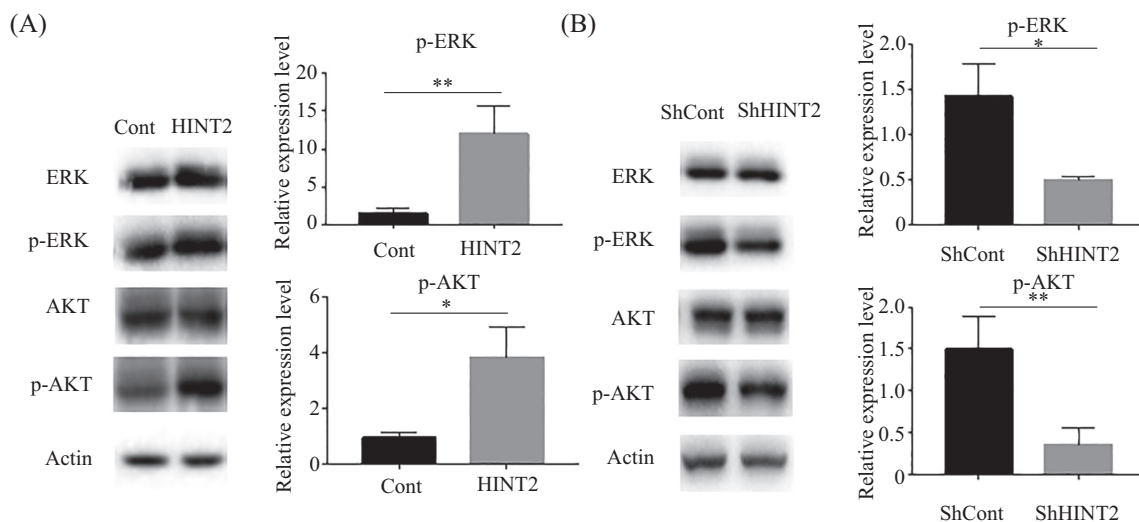
Fig.3 Detections of K1 cell migration ability and cell invasion ability

时,对于高分化低危甲状腺癌患者来说,全甲状腺切除术和辅助放射性碘消融术可能导致许多患者的过度治疗^[16]。现状迫切需要我们对于甲状腺癌的发病机制进行深入研究。

HINT2进化保守,存在广泛,并执行一系列生物学功能,具有腺苷磷酸酰胺酶、水解酶和核苷转移酶活性^[17],催化含有核苷酸底物的反应,并在细胞生长、细胞凋亡以及DNA、RNA和碳水化合物的代谢过程中起着重要作用。HINT2已被证明积极调节线粒体脂质代谢和细胞呼吸作用以及葡萄糖稳态,同时HINT2的缺乏会引起线粒体畸形和选定蛋白质乙酰化模式的改变,会破坏几种线粒体蛋白的翻译后修饰,从而阻碍对营养应激事件的适应^[12]。携带HINT2组成型缺失的小鼠表现出的主要表型是肝脏脂质和肝脏脂肪中线粒体蛋白的过度乙酰化,增加了肝脂质的积累,这可能是由于HINT2缺失引起某

些蛋白的乙酰化,从而导致甘油三酯在肝脏中的积累^[18-19]。同时在没有HINT2的情况下,电子转移和氧化磷酸化能力也下降^[7]。

越来越多的研究结果显示,HINT2与人类多种肿瘤的发生发展密切相关,影响肿瘤的增殖、迁移和侵袭等恶性行为。HINT2低表达于肝癌组织,在HepG2细胞中高表达HINT2进一步增强了FasL和放线菌素D引起的线粒体跨膜电势升高和Caspase活化,从而促进细胞凋亡,而干扰HINT2则抑制HepG2细胞的凋亡^[21]。另外,HINT2在临床胰腺癌标本中表达下调,其表达量与预后不良有关^[22]。在胰腺癌细胞中HINT2可以下调MICU1和MICU2的表达,提高线粒体Ca²⁺水平,同时触发胰腺癌细胞凋亡。HINT2还增强了吉西他滨在胰腺癌细胞中的促凋亡作用^[22]。在眼部黑色素瘤中,HINT2的表达受甲基化调节,发挥肿瘤抑制因子的作用^[23]。



A: HINT2高表达细胞组p-AKT、p-ERK水平显著上调; B: HINT2干扰细胞组p-AKT、p-ERK水平显著降低。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A: the levels increasing significantly of p-AKT and p-ERK in the HINT2 high expressing cell group; B: the levels reducing significantly of p-AKT and p-ERK in the HINT2 low expression cell group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图4 Western blot检测细胞蛋白水平

Fig.4 Detection of cell protein levels by Western blot

本研究中,我们首先检测了HINT2在PTC中的表达情况,结果发现HINT2在PTC中呈明显高表达。在PTC细胞系K1中高表达HINT2促进了细胞增殖、迁移和侵袭,而干扰HINT2则抑制了K1细胞的这些恶性表型。对其分子机制进行研究发现,高表达HINT2促进了AKT和ERK的磷酸化,而干扰HINT2则抑制了这一过程。由于丝氨酸激酶AKT和细胞外调节蛋白激酶ERK信号通路参与肿瘤的发生发展,影响肿瘤细胞的生长、迁移、转移或上皮-间质转化(EMT),抑制该信号通路的激活可抑制肿瘤细胞的恶性生物学行为^[24-26]。因此,我们推测HINT2可以通过调节AKT和ERK的活化水平,从而影响PTC的恶性表型。我们的研究还有一些缺陷。首先,检测的病例较少,不能确定HINT2的表达与PTC的分级是否存在相关性。其次,由于缺乏后续的临床资料,无法研究HINT2的表达是否影响PTC的预后。最后,我们虽然发现HINT2可以调控AKT和ERK的磷酸化,但对其如何介导这一过程还不清楚。由于HINT2定位于线粒体,推测HINT2表达量的变化会影响线粒体功能,引起细胞能量状态变化,从而影响AKT和ERK的活化程度,进而调节细胞的功能,其详细的分子机制还需要进一步探讨。

总之,我们的研究证明HINT2在肿瘤中的表达具有组织特异性,HINT2在PTC发生发展中发挥促

进作用,其可通过促进AKT和ERK磷酸化水平增强PTC细胞增殖以及迁移侵袭能力。这些研究结果进一步阐明了PTC的发病机制,也为其治疗提供了新的思路和潜在作用靶点。

参考文献 (References)

- [1] 贺小威,赵越. 雌激素受体在甲状腺癌中的作用[J]. 中国细胞生物学学报(HE X W, ZHAO Y, The role of estrogen receptor in thyroid cancer [J]. Chinese Journal of Cell Biology), 2017, 39(9): 1220-7.
- [2] COCA-PELAZ A, SHAH J P, HERNANDEZ-PRERA J C, et al. Papillary thyroid cancer-aggressive variants and impact on management: a narrative review [J]. Adv Ther, 2020, 37(7): 3112-28.
- [3] KITAHARA C M, SOSA J A, et al. The changing incidence of thyroid cancer [J]. Nat Rev Endocrinol, 2016, 12(11): 646-53.
- [4] GUR E O, KARAIŞLI S, HACIYANLI S, et al. Multifocality related factors in papillary thyroid carcinoma [J]. Asian Surg, 2019, 42(1): 297-302.
- [5] MITCHELL A L, GANDHI A, SCOTT-COOMBES D, et al. Management of thyroid cancer: United Kingdom National Multidisciplinary Guidelines [J]. Laryngol Otol, 2016, 130(S2): S150-60.
- [6] NDIAYE D, COLLADO-HILLY M, MARTIN J, et al. Characterization of the effect of the mitochondrial protein Hint2 on intracellular Ca^{2+} dynamics [J]. Biophys, 2013, 105(5): 1268-75.
- [7] RAJASEKARAN R, FELSER A, NUOFFER J M, et al. The histidine triad nucleotide-binding protein 2 (HINT-2) positively regulates hepatocellular energy metabolism [J]. FASEB, 2018, 32(9): 5143-61.
- [8] LI W, CAI S, WANG L, et al. HINT2 downregulation promotes colorectal carcinoma migration and metastasis [J]. Oncotarget,

- 2017, 21(8): 13521-31.
- [9] LENGLET S, ANTIGNY F, VETTERLI L, et al. Hint2 is expressed in the mitochondria of H295R cells and is involved in steroidogenesis [J]. *Endocrinology*, 2008, 149(11): 5461-9.
- [10] LEE L R, TENG P N, NGUYEN H, et al. Progesterone enhances calcitriol antitumor activity by upregulating vitamin D receptor expression and promoting apoptosis in endometrial cancer cells [J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2013, 6(7): 731-43.
- [11] ZHOU D K, QIAN X H, CHENG J, et al. Clinical significance of down-regulated HINT2 in hepatocellular carcinoma [J]. *Medicine*, 2019, 98(48): e17815.
- [12] MARTIN J, MAURHOFFER O, BELLANCE N, et al. Disruption of the histidine triad nucleotide-binding hint2 gene in mice affects glycemic control and mitochondrial function [J]. *Hepatology*, 2013, 57(5): 2037-48.
- [13] SAKAI T, SUGITANI I, EBINAA, et al. Active surveillance for T1bN0M0 papillary thyroid carcinoma [J]. *Thyroid*, 2019, 29(1): 59-63.
- [14] HAUGEN B R, ALEXANDER E K, BIBLE K C, et al. 2015 American thyroid association management guidelines for adult patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: the American thyroid association guidelines task force on thyroid nodules and differentiated thyroid cancer [J]. *Thyroid*, 2016, 26(1): 1-133.
- [15] CLARK O H. Thyroid cancer and lymph node metastases [J]. *Surg Oncol*, 2011, 103(6): 615-8.
- [16] HARRIES V, WANG L Y, MCGILL M, et al. Should multifocality be an indication for completion thyroidectomy in papillary thyroid carcinoma [J]? *Surgery*, 2020, 167(1): 10-7.
- [17] DOLOT R, WLODARCZYK A, BUJACZ G D, et al. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of human histidine triad nucleotide-binding protein 2 (hHINT2) [J]. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2013, 69(Pt 7): 783-7.
- [18] MARTIN J, BALMER M L, RAJENDRAN S, et al. Nutritional stress exacerbates hepatic steatosis induced by deletion of the histidine nucleotide-binding (Hint2) mitochondrial protein [J]. *Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2016, 310(7): 497-509.
- [19] DAI Y, CHEN S, KRAMER L B, et al. Interactions between bortezomib and romidepsin and belinostat in chronic lymphocytic leukemia cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(2): 549-58.
- [20] MARTIN J, ST-PIERRE M V, DUFOUR J F. Hit proteins, mitochondria and cancer [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1807(6): 626-32.
- [21] MARTIN J, MAGNINO F, SCHMIDT K, et al. Hint2, a mitochondrial apoptotic sensitizer down-regulated in hepatocellular carcinoma [J]. *Gastroenterology*, 2006, 130(7): 2179-88.
- [22] CHEN L, SUN Q, ZHOU D, et al. HINT2 triggers mitochondrial Ca²⁺ influx by regulating the mitochondrial Ca²⁺ uniporter (MCU) complex and enhances gemcitabine apoptotic effect in pancreatic cancer [J]. *Cancer Lett*, 2017, 411: 106-16.
- [23] JIA R, CHAI P, WANG S, et al. m6A modification suppresses ocular melanoma through modulating HINT2 mRNA translation [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1):161.
- [24] JIANG N, DAI Q, SU X, et al. Role of PI3K/AKT pathway in cancer: the framework of malignant behavior [J]. *Mol Biol Rep*, 2020, 47(6): 4587-629.
- [25] SUN Y, LIU W Z, LIU T, et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis [J]. *Recept Signal Transduct Res*, 2015, 35(6): 600-4.
- [26] HIRATA E, KIYOKAWA E. ERK activity imaging during migration of living cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(3): 679.