

文章编号 1006-8147(2023)05-0521-05

论 著

# 神经介素 U 蛋白在人甲状腺乳头状癌中表达的意义及作用机制

高关清<sup>1</sup>, 郭丹<sup>2</sup>, 卢文亚<sup>1</sup>, 张萍<sup>3</sup>, 王芳<sup>2</sup>, 石科<sup>2</sup>

(1.河南省第二人民医院耳鼻咽喉科, 郑州 451191; 2.河南医学高等专科学校生物化学与医学遗传学教研室, 郑州 451191; 3.河南省第二人民医院普外科, 郑州 451191)

**摘要** 目的:探讨神经介素 U(NMU)蛋白在人甲状腺乳头状癌组织中的表达、临床意义及对细胞增殖的影响。方法:生物信息学分析 GEPIA 数据库中 NMU 在甲状腺乳头状癌组织及正常组织中的 mRNA 水平,并分析其表达与患者无病生存期的关系。进一步回顾性分析了来自河南省第二人民医院 2016 年 3 月—2022 年 3 月接受手术治疗的 71 例患者的临床病理资料。采用免疫组化法检测甲状腺乳头状癌组织和正常组织中 NMU 蛋白表达水平,分析其与患者临床病理特征的关系。培养 TPC-1 和 KTC-1 细胞,通过 NMU 的 shRNA 质粒转染下调 NMU 表达,通过集落形成实验及噻唑蓝(MTT)实验检测对甲状腺乳头状癌细胞增殖的影响。结果:生物信息学分析揭示在 GEPIA 数据库中 NMU 的 mRNA 显著高表达,并与患者无病生存期显著相关。免疫组化揭示 NMU 在癌组织中显著高表达,而在正常组织中则为阴性或无表达,表达水平与肿瘤分期(高级别者 42 例,  $\chi^2=8.184$ ,  $P=0.004$ )及多灶(33 例,  $\chi^2=7.469$ ,  $P=0.006$ )显著相关,而与患者的年龄、性别、淋巴结转移无关(均  $P>0.05$ )。MTT 实验( $t=7.33$ ,  $P=0.0052$ ;  $t=8.08$ ,  $P=0.0040$ )及集落形成实验( $t=12.43$ ,  $P=0.0011$ ;  $t=16.46$ ,  $P=0.0005$ )证实, NMU 在甲状腺乳头状癌细胞中的下调抑制甲状腺乳头状癌细胞增殖。结论:甲状腺乳头状癌组织中 NMU 显著高表达,且与患者侵袭性临床病理特征及无病生存有关, NMU 蛋白促进甲状腺乳头状癌细胞增殖。

**关键词** 甲状腺乳头状癌;免疫组化;神经介素 U 蛋白;肿瘤分期;增殖

中图分类号 R736.1

文献标志码 A

## The significance and mechanism of expression of neuromedin U protein in human papillary thyroid carcinoma

GAO Guan-qing<sup>1</sup>, GUO Dan<sup>2</sup>, LU Wen-ya<sup>1</sup>, ZHANG Ping<sup>3</sup>, WANG Fang<sup>2</sup>, SHI Ke<sup>2</sup>

(1.Department of Otolaryngology, Henan Second Provincial People's Hospital, Zhengzhou 451191, China; 2.Department of Biochemistry and Medical Genetics, Henan Medical College, Zhengzhou 451191, China; 3.Department of General Surgery, Henan Second Provincial People's Hospital, Zhengzhou 451191, China)

**Abstract Objective:** To investigate the expression and clinical significance of neuromedin U (NMU) protein in human thyroid papillary carcinoma tissues, as well as the effects on cell proliferation. **Methods:** The mRNA levels of NMU in thyroid papillary carcinoma tissues and corresponding normal tissues in GEPIA database were analyzed by bioinformatics, and the correlation between its expression and disease-free survival of patients was analyzed. The clinicopathologic data of 71 patients who received surgical treatment in the Second People's Hospital of Henan Province from March 2016 to March 2022 were retrospectively analyzed. Immunohistochemistry was used to detect the expression levels of NMU protein in papillary thyroid carcinoma tissues and paracancer tissues, and the relationship between NMU protein expression and clinicopathologic features of patients was analyzed. The expression of NMU was down-regulated by shRNA plasmid transfection in TPC-1 and KTC-1 cells, and the effects on the proliferation of thyroid papillary carcinoma cells were detected by colony formation assay and thiazolyl tetrazolium(MTT) assay. **Results:** Bioinformatics analysis revealed that NMU mRNA was significantly overexpressed in GEPIA database, and was significantly correlated with disease-free survival. Immunohistochemistry revealed significantly high expression of NMU in cancer tissues, while negative or no expression in paracancer tissues. The expression level was significantly correlated with tumor stage(42 cases with high grade,  $\chi^2=8.184$ ,  $P=0.004$ ) and multiple foci (33 cases with  $\chi^2=7.469$ ,  $P=0.006$ ), but not with patient age, sex, and lymph node metastasis(all  $P>0.05$ ). Both MTT ( $t=7.33$ ,  $P=0.0052$ ;  $t=8.08$ ,  $P=0.0040$ ) and colony formation assays ( $t=12.43$ ,  $P=0.0011$ ;  $t=16.46$ ,  $P=0.0005$ ) confirmed that down-regulation of NMU in thyroid papillary carcinoma cells inhibited cell proliferation. **Conclusion:** NMU is highly expressed in thyroid papillary carcinoma tissues, which is related to clinicopathological features and disease-free survival of patients. NMU promotes proliferation of thyroid papillary carcinoma cells.

**Key words** thyroid papillary carcinoma; immunohistochemistry; neuromedin U protein; tumor stage; proliferation

基金项目 河南省科技攻关项目(222102310338)

作者简介 高关清(1983-),男,主治医师,硕士,研究方向:头颈疾病尤其是肿瘤的防治和诊疗等;E-mail:guanqinggao@163.com。

甲状腺癌是最常见的内分泌恶性肿瘤,预后通常较好<sup>[1]</sup>。与其他类型的肿瘤类似,甲状腺乳头状癌的早期诊断对提高生存率很重要。目前多种生物标志物和不同疗法成功用于甲状腺乳头状癌的诊断和治疗<sup>[2-4]</sup>。然而,阐明甲状腺乳头状癌转移的分子机制对于开发新的甲状腺乳头状癌治疗方法至关重要。

神经介素 U(neuromedin U, NMU)蛋白是人体内源神经调节肽家族的重要成员,能够通过激活人体中枢和外周组织的神经介素 U 受体 1(NMU receptor 1, NMUR),发挥多样而复杂的生理功能<sup>[5]</sup>。NMU 是参与人体胃肠道免疫调节的重要角色,已有大量研究证实了它与炎症发生以及先天淋巴细胞的活性调控息息相关<sup>[6]</sup>。NMU 激活 NMUR 后通过调节中枢神经系统和外周胃肠道运动两条途径来实现对能量平衡的调节<sup>[7]</sup>。

研究显示, NMU 具有控制肿瘤进展的能力,并且有可能成为监控肿瘤发生与进展的标志物。NMU 表达升高或降低与肿瘤细胞迁移、侵袭、糖代谢、上皮间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)、维持肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)表型等密切相关,进而影响肿瘤的免疫反应、药物敏感性和治疗效果等<sup>[8]</sup>。结直肠癌细胞分泌的 NMU 能在表达 NMUR2 受体的 CRC 细胞中诱导侵袭性表型<sup>[9]</sup>。NMU 也是肺腺癌患者预后不良的生物标志物<sup>[10]</sup>。然而 NMU 在甲状腺乳头状癌中的表达及对其潜在影响仍然未知。本研究主要探讨 NMU 蛋白在人甲状腺乳头状癌组织中的表达及临床意义及对细胞增殖的影响。

## 1 材料和方法

1.1 基因表达 GEPIA 分析 在线软件 GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/detail.php?gene=NMU>) 是基于基因表达数据和肿瘤基因组图谱 RNA 序列而建立的程序,本研究采用 GEPIA 检测甲状腺癌和正常甲状腺标本中 NMU mRNA 水平,及其在不同类型肿瘤中的表达。NMU 在甲状腺癌中的表达在 expression DIY(The Boxplot TAB)中显示,截断标准为  $\log_2FC > 1$  和  $P < 0.01$ 。

1.2 临床资料 收集 2016 年 3 月—2022 年 3 月河南省第二人民医院 71 例甲状腺乳头状癌患者手术切除的肿瘤及正常组织标本,分析其临床病理资料特征。全部病例均经过病理证实,术前未经化疗或放疗,且具有完整的病例资料。收集患者的一般临床资料,包括年龄、性别、肿瘤分期、淋巴结转移和腺内传播等。71 例甲状腺乳头状癌患者年龄 43~65 岁,平均年龄( $57.5 \pm 5.75$ )岁;男性 14 例,女性 57

例;肿瘤分期低级别者 29 例,高级别者 42 例;淋巴结转移未转移者 28 例,转移者 48 例;多灶者 33 例,单灶者 38 例。

1.3 试剂 NMU 抗体为兔抗人单克隆抗体(ab2296335、abcam、Cambridge),  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(1:1 000 稀释, ab8226、abcam)。免疫组化稀释浓度为 1:100,免疫印迹稀释浓度为 1:1 000;免疫组化二步法检测试剂盒(PV-6001)、DAB 显色试剂盒(ZLI-9018)均购于北京中衫金桥生物技术有限公司;噻唑蓝(methylthiazolyl tetrazolium, MTT)购自美国 Sigma-Aldrich 公司。

1.4 方法及免疫组化染色结果的评分标准 甲状腺乳头状癌肿瘤及正常的组织进行福尔马林固定,并用石蜡全包埋,包埋后的蜡块标本行 5  $\mu$ m 切片及免疫组化染色,抗体 1:100 稀释。切片于 75℃孵育 30 min 后,二甲苯脱蜡及梯度乙醇水合。柠檬酸缓冲液孵育 20 min 后 5% BSA 于室温封闭 30 min。封闭后 NMU 抗体孵育 2 h,二抗孵育 1.5 h,通过 DAB 法显色,随后苏木素染色。组化切片于蔡司显微镜下拍照。

评分标准:阳性细胞比例:阳性细胞数<20%为 0 分;阳性细胞百分率为 20%~50% 记 1 分;肿瘤细胞阳性百分率为 50%~70% 记 2 分;肿瘤细胞阳性百分率>70%则为 3 分;同时对阳性着色细胞的染色强度进行评分:阴性表达记 0 分,弱阳性表达记 1 分,中等阳性 2 分,强阳性记为 3 分;最终计分结果为阳性细胞比例分数加染色强度分数,范围为 0~6 分。0~2 分为 NMU 低表达,3~6 分为 NMU 高表达。

1.5 细胞培养及转染 甲状腺乳头状癌的细胞系 TPC-1 和 KTC-1 细胞购自美国模式菌种收集中心(ATCC)。shRNA 质粒购自 Addgene。TPC-1 和 KTC-1 细胞均于含有 10% 胎牛血清(FBS,美国 Gibco 公司)的 RPMI-1640 培养基(美国 Gibco 公司)中进行培养。细胞转染采用脂质体转染法进行。细胞实验分为对照组(转染对照 shRNA 质粒)及 NMU 下调组(转染 NMU 的 shRNA 质粒),实验所用质粒购自 Charles River 公司,货号 SH814099,序列如下:CCGC TCCTGCTGCTGCTGCTGCT。取 2 mL 灭菌的 EP 管加入质粒或 Lipo2000 和 1.5 mL Opti-MEM 培养基,室温孵育 5 min。随后两者混合后孵育 20 min,加入细胞培养基中,6 h 后换液,24 h 后进行功能实验。

1.6 蛋白质印迹法(Western blotting)实验 利用 RIPA 细胞裂解液提取细胞总蛋白,使用 BCA 法测量蛋白浓度。加入蛋白酶抑制剂后,将总蛋白进行 10% SDS-PAGE 电泳后,转膜至聚偏氟乙烯(PVDF)的

膜上,5%脱脂奶粉进行室温固定2 h,室温条件下NMU一抗(1:1 000)孵育2 h,随后Tris-HCL缓冲液(TBST)洗脱未结合抗体,共洗5次,每次5 min;随后室温山羊抗兔二抗(1:3 000)孵育45 min,TBST洗脱未结合抗体,共洗5次,每次5 min,加入ECL增强显影底物后在曝光仪中检测信号,所得信号使用Image J 8.0软件进行分析。

**1.7 实时定量荧光PCR** 通过TRIzol试剂提取HUVEC细胞内总RNA,并进行两步法反转录,条件为42℃,1 h,所得cDNA通过SYBR荧光探针进行实时定量聚合酶链式反应(PCR),并使用 $\beta$ -actin作为内参,检测相关mRNA的表达水平。实验结果采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行定量。NMU正向:5'-AGT TGT GGA ATG AGG CAT CC-3',反向:5'-GGA TGC A-CA ACT GAC GAC AC-3'; $\beta$ -actin:正向5'-GCA CTC TTC CAG CCT TCC TT-3',反向:5'-GTT GGC GTA CAG GTC TTT GC-3'。以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 公式计算出 $\beta$ -actin和NMU相对表达量。

**1.8 MTT实验** 细胞铺于96孔板中,进行质粒转染处理后于48 h加入40  $\mu$ L的MTT试剂,37℃培养箱孵育4 h,应用200  $\mu$ L的DMSO震荡溶解,随后在570 nm波长下使用多功能酶标仪检测其吸光度值。每组实验设3个重复,统计结果。

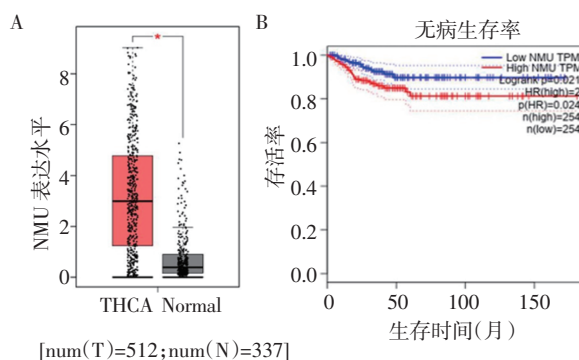
**1.9 集落形成实验** 细胞进行质粒转染处理后48 h铺于6孔板中,每孔约1 000个细胞,37℃培养箱培养14 d,随后使用0.2%的结晶紫染色15 min,使用4%多聚甲醛室温固定20 min,流水缓慢冲洗,随后奥林巴斯荧光显微镜下观察拍照,使用Image J 8.0软件分析图片。

**1.10 统计学处理** 统计学处理采用Graphpad 8.0软件。符合正态分布的计量数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示。通过GPEIA数据库分析NMU mRNA在甲状腺乳头状癌组织中的表达。通过卡方检验比较临床病理特征与

患者肿瘤组织NMU表达的相关性, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 生物信息学分析揭示NMU的mRNA在甲状腺乳头状癌患者肿瘤组织中高表达且与患者预后相关** 首先通过GPEIA数据库分析NMU mRNA水平在512例人甲状腺乳头状癌组织及对应的337例正常组织中的差异,发现在肿瘤组织中NMU mRNA呈显著高表达(图1A, $P=0.006$ )。且生物信息学分析结果证实甲状腺乳头状癌患者肿瘤组织NMU的表达与患者无病生存率显著相关(图1B, $P=0.021$ )。



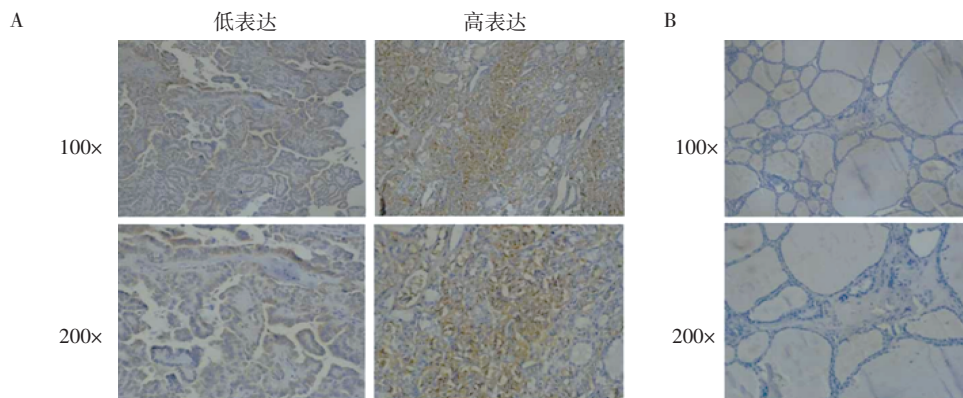
注:A:GPEIA数据库分析NMU mRNA在甲状腺乳头状癌组织及正常组织中的表达差异;B:NMU mRNA表达水平与甲状腺乳头状癌患者无病生存期的关系;NMU:神经素U

图1 NMU的mRNA水平在甲状腺癌中显著增加并与患者不良预后显著相关

Fig 1 mRNA levels of NMU are significantly increased in thyroid cancer and are significantly associated with poor prognosis in patients

**2.2 NMU蛋白在甲状腺乳头状癌患者肿瘤组织中高表达并与患者临床病理特征显著相关** 将肿瘤组织按NMU的表达水平分为高表达组与低表达组,结果发现,相对于正常组织,NMU蛋白在人甲状腺乳头状癌组织中呈显著高表达(图2)。

对染色结果进行评分量化分析,结果证实,NMU表达水平与甲状腺乳头状癌患者的肿瘤分期



注:A:肿瘤组织;B:正常组织;NMU:神经素U

图2 NMU在甲状腺乳头状癌中的表达水平

Fig 2 The expression levels of NMU in thyroid papillary carcinoma



( $P=0.004$ )及多灶情况等( $P=0.006$ )密切相关,而与其他临床特征,包括年龄( $P=0.461$ )、性别( $P=0.422$ )、淋巴结转移( $P=0.938$ )等无显著相关性(表 1)。

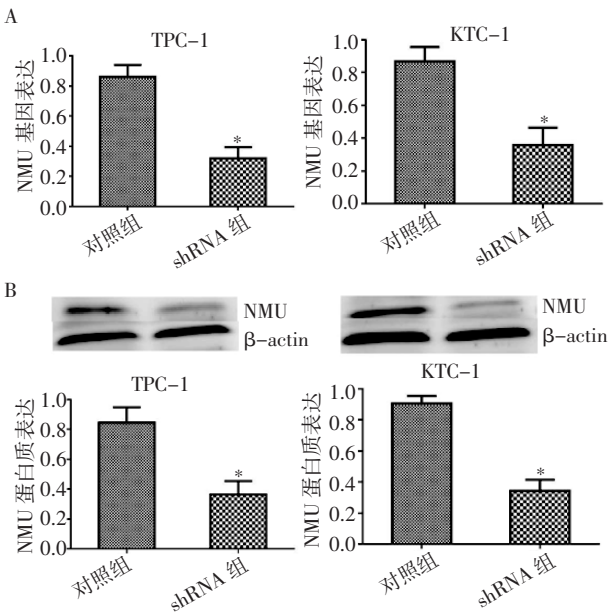
表 1 71 例甲状腺乳头状癌患者 NMU 的表达水平与临床病理特征相关性分析[n( % )]

Tab 1 Correlation analysis between NMU expression levels and clinical pathological characteristics in 71 patients with papillary thyroid cancer [n( % )]

特征	n=71	NMU 表达		$\chi^2$	P
		低 n=17	高 n=54		
年龄(岁)				0.543	0.461
<45	24(33.8)	7(9.9)	17(23.9)		
≥45	47(66.2)	10(14.1)	37(52.1)		
性别				0.644	0.422
男	14(19.7)	5(7.0)	9(12.7)		
女	57(80.3)	12(16.9)	45(63.4)		
肿瘤分期				8.184	0.004
T1	29(40.8)	12(16.9)	17(23.9)		
T2~T3	42(59.2)	5(7.0)	37(52.2)		
淋巴结转移				0.006	0.938
是	34(47.9)	8(11.3)	26(36.6)		
否	37(52.1)	9(12.7)	28(39.4)		
多灶情况				7.469	0.006
是	33(46.5)	3(4.2)	30(42.3)		
否	38(53.5)	14(19.7)	24(33.8)		

注:NMU:神经介素 U

2.3 下调 NMU 蛋白抑制甲状腺乳头状癌细胞增殖 与对照组相比,NMU 下调组 TPC-1 和 KTC-1 细胞 NMU 的 mRNA 及蛋白水平均显著下降( $t=7.96$ 、 $7.37$ 、 $10.42$ 、 $7.69$ ,均  $P<0.05$ ),见图 3。

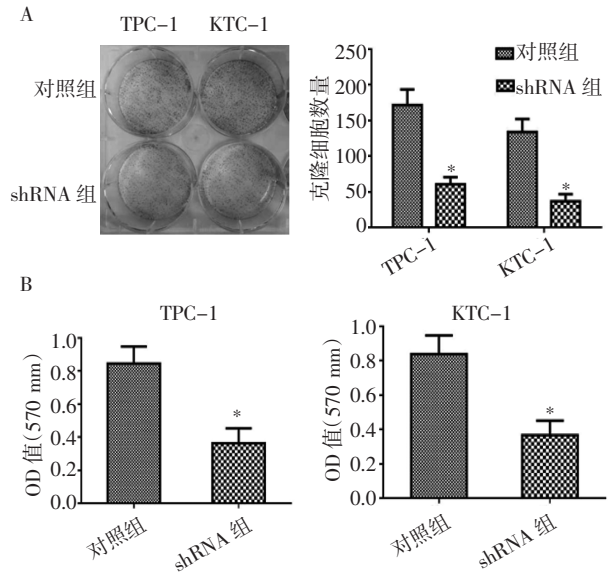


注:A:qPCR 检测 NMU 的 shRNA 质粒转染后 24 h,TPC-1 和 KTC-1 细胞中 NMU mRNA 的表达;B:免疫印迹检测 NMU 的 shRNA 质粒转染后 24 h,在 TPC-1 和 KTC-1 细胞中 NMU 蛋白的表达;\* $P<0.05$

图 3 NMU 的 shRNA 在甲状腺乳头状癌细胞系 TPC-1 和 KTC-1 中的沉默效率

Fig 3 shRNA silencing efficiency of NMU in thyroid papillary cancer cell lines TPC-1 and KTC-1

集落形成实验结果表明,在 TPC-1 和 KTC-1 细胞中,NMU 蛋白的下调会导致形成集落的数量下降(图 4A, $t=12.43$ , $P=0.001$  1; $t=16.46$ , $P=0.000$  5)。MTT 实验结果表明,在 TPC-1 和 KTC-1 细胞中,NMU 蛋白下调后 TPC-1 和 KTC-1 细胞平均吸光度值均下降(图 4B, $t=7.33$ , $P=0.005$  2; $t=8.08$ , $P=0.004$  0)。



注:A:NMU 下调后 TPC-1 和 KTC-1 细胞集落形成实验;B:NMU 下调后培养 48 h,TPC-1 和 KTC-1 细胞的 MTT 实验,\* $P<0.05$

图 4 NMU 下调抑制甲状腺乳头状癌细胞增殖

Fig 4 NMU down-regulation inhibited the proliferation of thyroid papillary cancer cells

### 3 讨论

甲状腺乳头状癌是最为常见的一种甲状腺癌,其生长缓慢,恶性程度低,预后通常较好。其发生会受到辐射、激素、遗传、环境及炎症等因素的影响。由于甲状腺乳头癌对放化疗不敏感,因此靶向治疗便成了最有潜力的一种治疗手段<sup>[11]</sup>。然而截至目前,甲状腺乳头状癌的治疗靶点有限。为了进一步提高患者的生存率,仍需发现新的更有效的治疗靶点。NMU 在多种肿瘤中均出现高表达并与不良预后相关,因此进一步借助 ProteinAtlas 验证 NMU mRNA 在多种肿瘤中与患者预后的相关性。在本研究中发现,NMU 在甲状腺乳头状癌中显著高表达,并与患者的无病生存期显著相关,提示不良预后。进一步的临床病理特征分析证实 NMU 的表达与患者的肿瘤分期及多灶情况密切相关,而这两种特征均与甲状腺乳头状癌的转移有关。因此推测 NMU 可能参与甲状腺乳头状癌的进展和转移,是一个甲状腺乳头状癌的潜在治疗靶点和标志物。

为了证实推测,进一步利用两种甲状腺乳头状癌的细胞系开展体外实验。通过转染 NMU 的 shRNA 质粒,下调 NMU 的表达,并通过集落形成实验和 MTT 实验检测其对细胞增殖的影响,结果表明,NMU 的下调显著抑制甲状腺乳头状癌细胞增殖。因此,研究初步揭示了 NMU 在甲状腺癌中的功能。NMU 表达水平的改变能够影响癌细胞的多种功能,如增殖、迁移、侵袭、代谢、EMT 等,进而影响肿瘤免疫、药物敏感性和治疗效果<sup>[8]</sup>。研究表明,结直肠癌细胞分泌的 NMU 能够调节肿瘤微环境,促进细胞侵袭<sup>[9]</sup>。另有研究证实,NMU 在人树突细胞中表达<sup>[12]</sup>,而 NMUR1 在免疫效应细胞(如 T 细胞、NK 细胞)中表达<sup>[13]</sup>,提示抗原提呈细胞和免疫效应细胞群之间存在相互作用,并进一步提示 NMU 可参与肿瘤的免疫治疗。

除此之外,NMU 作为一种神经调节蛋白,也能参与代谢过程,负责调节能量消耗、进食行为,维持生命的新陈代谢<sup>[14]</sup>。而肿瘤的微环境及肿瘤细胞代谢在甲状腺癌进展与转移中同样扮演重要角色<sup>[15]</sup>,故有理由推测 NMU 可能通过调控甲状腺肿瘤细胞的代谢影响肿瘤进展。在本研究中,初步发现 NMU 对甲状腺乳头状癌细胞增殖的影响,而对于细胞迁移及代谢等方面的影响仍需进一步体内外研究证实。

总之,本研究发现了 NMU 在甲状腺乳头状癌中显著高表达,并与患者的无病生存期显著相关。NMU 的表达水平与甲状腺癌患者的肿瘤分期及多灶情况密切相关,且 NMU 的下调能够抑制甲状腺乳头状癌细胞增殖,提示其可作为甲状腺乳头状癌的潜在治疗靶点。

#### 参考文献:

- [1] MIRANDA-FILHO A, LORTET-TIEULENT J, BRAY F, et al. Thyroid cancer incidence trends by histology in 25 countries: a population-based study[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2021, 9: 225–234.
- [2] LIN R X, YANG S L, JIA Y, et al. Epigenetic regulation of papillary thyroid carcinoma by long non-coding RNAs[J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 83: 253–260.
- [3] 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: 10–17.
- [4] BERGDORF K, FERGUSON DC, MEHRAD M, et al. Papillary thyroid carcinoma behavior: clues in the tumor microenvironment [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2019, 26: 601–614.
- [5] DE PRINS A, VAN EECKHAUT A, SMOLDERS I, et al. Neuromedin U and structural analogs: an overview of their structure, function and selectivity [J]. *Curr Med Chem*, 2020, 27: 6744–6768.
- [6] YE Y, LIANG Z, XUE L. Neuromedin U: potential roles in immunity and inflammation [J]. *Immunology*, 2021, 162: 17–29.
- [7] DOGGRELL S A. Neuromedin U—a new target in obesity [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2005, 9: 875–877.
- [8] PRZYGODZKA P, SOBOSKA K, SOCHACKA E, et al. Neuromedin U: a small peptide in the big world of cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(9): 1312.
- [9] PRZYGODZKA P, SOBOSKA K, SOCHACKA E, et al. Neuromedin U secreted by colorectal cancer cells promotes a tumour-supporting microenvironment [J]. *Cell Commun Signal*, 2022, 20: 193.
- [10] WU Y, MCROBERTS K, BERR SS, et al. Neuromedin U is regulated by the metastasis suppressor RhoGDI2 and is a novel promoter of tumor formation, lung metastasis and cancer cachexia [J]. *Oncogene*, 2007, 26: 765–773.
- [11] FILETTI S, DURANTE C, HARTL D, et al. Thyroid cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up—dagger [J]. *Ann Oncol*, 2019, 30: 1856–1883.
- [12] LI Y, GAO Y, CHU W, et al. Differences in and verification of genetic alterations in chemotherapy and immunotherapy for metastatic melanoma [J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13: 23672–23688.
- [13] HEDRICK J A, MORSE K, SHAN L, et al. Identification of a human gastrointestinal tract and immune system receptor for the peptide neuromedin U [J]. *Mol Pharmacol*, 2000, 58: 870–875.
- [14] MALENDOWICZ L K, RUCINSKI M. Neuromedins NMU and NMS: an updated overview of their functions [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021, 12: 713961.
- [15] FERRARI S M, FALLAHI P, GALDIERO M R, et al. Immune and inflammatory cells in thyroid cancer microenvironment [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18): 4413.

(2023-02-10 收稿)