Journal of Ardabil University of Medical Sciences

Vol. 16, No. 3, Autumn 2016, Pages 292-299

Study of the Expression of Stem Cell Oct-4 Gene as a Diagnostic Molecular Marker in Specimens of Thyroid Papillary Carcinoma in Northwest of Iran

Babaei E*[1], Montazeri V[2]

1. Department of Biology, School of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran
2. Department of Thorax Surgery, Noor-Nejat Hospital, Tabriz, Iran

Corresponding author. Tel: +98413339 2686 Fax: +98413335 6027 E-mail: babaei@tabrizu.ac.ir

Received: Dec 19, 2015 Accepted: Jul 3, 2016

ABSTRACT

Background & objectives: According to the new theory of cancer stem cells, interruption in the self-renewal pathway of tissue stem cells can cause cancerous tumors. Current work has evaluated the role of self-renewal Oct-4 gene in thyroid tumors.

Methods: In this case-control study, the expression of Oct-4 gene has comparatively assessed between cancerous specimens, marginal tissues of tumors and non-tumoral nodules of thyroid using RT-PCR technique.

***Results*:** Statistical analysis of data by one-way ANOVA showed that Oct-4 gene is significantly expressed in thyroid papillary carcinomas in comparison with tumor margin and non-tumoral nodules ($p<0.05$).

Conclusion: In conclusion, the dominant expression of Oct-4 gene in thyroid tumoral cells not only demonstrates the cancer stem cell theory but also shows its role in thyroid cancer appearance that can be used in differentiating thyroid papillary carcinomas from non-tumoral nodules as well as demarcation of tumors.

Keywords: Thyroid Carcinoma; Cancer Stem Cell; Molecular Marker; Oct-4 Gene; RT-PCR

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]

مطالعه بیان ژن بن یاخته ای Oct-4 به عنوان یک مارکر مولکولی تشخیصی در نمونه‌های پاپیلاری کارسینومای تیروئید شمالغرب ایران

اسماعیل بابائی[1]*، وحید منتظری[2]

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران ۲. گروه جراحی توراکس، بیمارستان نورنجات، تبریز، ایران
* نویسنده مسئول. تلفن: ۳۳۳۹۲۶۸۶ ۰۴۱ فاکس: ۳۳۵۶۰۲۷ ۰۴۱ پست الکترونیک: babaei@tabrizu.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: بر اساس نظریه جدید بن یاخته های سرطانی، اختلال در فرآیند خودبازسازی بن یاخته های موجود در بافت ها می‌تواند منجر به بروز غدد سرطانی گردد. تحقیق حاضر فعالیت ژن خودبازسازی Oct-4 را در تومورهای تیروئید مورد بررسی قرار داده است.

روش کار: در این مطالعه مورد- شاهدی، بیان ژن Oct-4 به صورت مقایسه ای در نمونه های سرطانی، بافت حاشیه ای تومورها و ندول های غیرتوموری تیروئید با استفاده از تکنیک RT-PCR ارزیابی گردید.

یافته ها: نتایج بدست آمده از آنالیز داده ها با آزمون One-way ANOVA، حاکی از بیان معنی دار ژن Oct-4 در بافت‌های پاپیلاری کارسینومای تیروئید نسبت به حاشیه تومور و غده های غیرتوموری تیروئید می‌باشد ($p<۰/۰۵$).

نتیجه گیری: بیان غالب ژن Oct-4 در سلول های توموری تیروئید ضمن تایید نظریه بن یاخته های سرطانی، بیان گر نقش آن در بروز سرطان تیروئید است که می تواند به عنوان مارکر تشخیصی برای تمییز کارسینومای پاپیلاری تیروئید از انواع ندول های غیرتوموری و همچنین مرزبندی غده ها به کار گرفته شود.

واژه های کلیدی: سرطان تیروئید، بن یاخته سرطانی، مارکر مولکولی، ژن Oct-4، RT-PCR

دریافت: ۱۳۹٤/۰۹/۲۸ **پذیرش:** ۱۳۹۵/۰٤/۱۳

مقدمه

بر اساس نظریه جدید بن یاخته‌های سرطانی[1] در یک توده توموری جمعیت کوچکی از سلول‌های سرطانی با قابلیت تومورزایی در نظر گرفته می‌شوند که شباهت بالایی به سلول‌های بنیادی جنینی و بافتی دارند. این سلول‌ها به دلیل اختلال در فرآیند خودبازسازی[2] سلول‌های بنیادی موجود در بافت، قدرت تکثیر بالایی داشته و می‌توانند ایجاد تومور کنند [۱]. پروتئین Oct-4 یکی از فاکتورهای رونویسی متعلق به خانواده پروتئینی هومیئودومین‌ها می‌باشد که نقش کلیدی در داشتن خاصیت پرتوانی سلول‌ها و فرآیند خودبازسازی ایفا می‌کند [۲]. اعتقاد بر این است که بیان این ژن محدود به سلول‌های پرتوان[3] جنینی بوده و با گذر از مرحله پرتوانی، بیان آن به شدت کاهش می‌یابد [۲،۳]. در سال ۱۹۹۲، بیان پایین آن در سلول‌های بنیادی موجود در بافت‌های بالغ گزارش گردید. یافته‌های اخیر نیز به نوعی حاکی از فعالیت آن در بن یاخته‌های موجود در بافت‌های بالغ می‌باشد [٤].

مطالعات آزمایشگاهی نشان می‌دهند که بیان ژن Oct-4 محدود به بن یاخته‌های جنینی، جنسی و کارسینوماهای جنینی می‌باشد. در مقابل، در بافت‌های تمایز یافته بیان نشده و یا مقدار آن بسیار

[1] Cancer Stem Cells
[2] Regeneration
[3] Pluripotent

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]

ناچیز می‌باشد که آن هم مربوط به سلول‌های بنیادی موجود در بافت می‌باشد. ژن Oct-4 به دلیل بیان بسیار بالای خود در تومورهای سرطانی بافت‌های جنسی، یک مارکر مولکولی محسوب می‌شود [۵،۶].

یافته‌های اخیر حکایت از بیش فعالیت ژن‌های بن یاخته‌ای از جمله Klf-4، Oct-4، Sox-2 و NANOG در غدد توموری تیروئید از جمله کارسینومای آناپلاستی[1] دارد که نشان‌دهنده نقش آنها در بروز و پیشروی سرطان‌های تیروئید است [۷،۸]. مارکرهای دیگر بن یاخته‌ای از جمله CD133، CD44، EpCAM نیز در تومورهای تیروئید و غدد فوق کلیوی به عنوان عوامل پیش آگهی مطرح شده‌اند [۹،۱۲].

با توجه به یافته‌های اخیر در خصوص شباهت مولکولی سلول‌های سرطانی با انواع بنیادی و ایفای نقش ژن Oct-4 در تومورزائی و همچنین نبود اطلاعات مولکولی از پروفیل بیانی این ژن در نمونه‌های توموری منطقه شمالغرب ایران، هدف از تحقیق حاضر بررسی فعالیت ژن Oct-4در تومورهای پاپیلاری کارسینومای تیروئید بیماران منطقه شمالغرب کشور و مقایسه آن با بافت‌های حاشیه به ظاهر سالم تومورها و ندول‌های غیرتوموری تیروئید مثل گواتر است که می‌تواند بیانگر نقش این ژن در فرایند تومورزائی بافت تیروئید در نمونه‌های سرطانی منطقه شمالغرب کشور باشد.

روش کار

نمونه گیری

نمونه‌های مورد نظر از اتاق عمل بیمارستان امام خمینی تبریز و تحت نظارت مستقیم پزشک متخصص جمع آوری گردید. این نمونه‌ها شامل ۲۵ مورد بافت توموری، ۱۶ مورد بافت حاشیه تومور و ۱۶ مورد از ندول‌های غیرتوموری تیروئید مثل گواتر بودند که با اخذ فرم رضایت کامل بیماران و با اطلاع قبلی آنان بدست آمدند. از ۲۵ نمونه توموری پاپیلاری کارسینوما، ۱٤ مورد از نظر پاتولوژیک در حالت پیشرفته[2] بودند.

به منظور جلوگیری از هرگونه آلودگی و نیز اتولیز سلول‌ها، هر نمونه در یک تیوپ ۱/۵ استریل عاری از آنزیم‌های RNAse و DNAse گذاشته شده و بلافاصله در نیتروژن مایع قرار داده شد و به آزمایشگاه منتقل گردید. نمونه‌ها تا زمان استفاده برای استخراج RNA، در فریزر $-80\,^{\circ}C$ نگهداری شدند.

انجام واکنش RT-PCR

با استفاده از کیت استخراج RNX Plus^{TM} شرکت سیناژن، RNA کل از بافت‌های فریزشده و بر اساس پروتکل مربوطه استخراج گردید. پس از سنجش کمّی و کیفی RNA به ترتیب با اسپکتروفتومتری و ژل آگارز ۱٪، از هر نمونه RNA به مقدار ۱µl تحت تاثیر آنزیم DNase I قرار گرفت تا از هرگونه آلودگی احتمالی DNA جلوگیری شود. نمونه‌های بدست آمده بلافاصله جهت سنتز cDNA در حجم نهایی ۲۰µl و با استفاده از آنزیم Reverse transcriptase (Fermentas Co., Lithuania) مورد استفاده قرار گرفتند. طبق پروتکل شرکت سازنده آنزیم و بر اساس غلظت‌های تعیین شده توسط نانودراپ، مقدار مساوی RNA از هر نمونه توسط پرایمر Oligo dT به‌cDNA تبدیل گردید.

طراحی پرایمر

پرایمرهای مورد نظر برای ژن‌های Oct-4و β_2m به عنوان کنترل داخلی، بر روی توالی‌های به دست آمده از Gene bank و با استفاده از نرم افزار Gene Runner طراحی شده و توسط کمپانی MWG آلمان سنتز گردیدند [۱۳]. توالی پرایمرها به قرار زیر می‌باشد:

[1] Anaplastic Thyroid Carcinoma

[2] Advanced

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]

Human β2m:
Forward (HBF): 5’- CTA CTC TCT CTT TCT GGC CTG-3’ (94-114)
Reverse (HBR): 5’- GAC AAG TCT GAA TGC TCC AC-3’ (284-265)
Human Oct-4:
Forward: 5’-GAG AAT TTG TTC CTG CAG TGC-3’ (792-812)
Reverse: 5’- GTT CCC AAT TCC TTC CTT AGT G -3’ (1261-1240)

واکنش PCR برای هر دو ژن تحت شرایط یکسان و در حجم نهایی ۲۵µl با استفاده از ۲۰µl cDNA، ۰/۵µl ،۰/۷۵ µl $mgcl_2$، Taq polymerase ۰/۱۲۵µl از dNTP ۱۰mM و ۰/۵ µl از جفت پرایمرهای رقیق شده و تحت شرایط زیر انجام گردید: دناتوراسیون[1] اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای $94°C$ انجام شد و سپس، واکنش برای ۳۵ سیکل در درجه‌های دمایی $94°C$ ، $57/5°C$ و $72°C$ به ترتیب برای دناتوراسیون، اتصال پرایمرها و تکثیر هر سه به مدت ۳۰ ثانیه انجام گردید. در نهایت، ۱۰ دقیقه برای تکثیر نهائی در دمای $72°C$ در نظر گرفته شد. باند تکثیرشونده مورد انتظار برای β_2m، حدود ۱۹۱ و برای Oct-4، ٤٧٠ نوکلئوتید می‌باشد.

به منظور اطمینان از مرحله هضم آنزیمی DNAموجود درRNA استخراج شده، از هر نمونه، یک مورد No-RT استفاده گردید که در آن به طور مستقیم از RNA بدون هضم آنزیمی استفاده شد. محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز ۱/۵٪ و با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید آشکارسازی شدند.

تایید هویت باندهای حاصل از RT-PCR

به منظور تایید صحت قطعات تکثیرشده، باند اختصاصی Oct-4 از ژل توسط کیت اختصاصی (Fermentas, Lithuania) استخراج شده و توسط شرکت Microgene کره تعیین توالی گردید.

[1] Denaturation

آنالیز نتایج

آنالیز نتایج عکس‌های ژل آگارز با استفاده از نرم‌افزار UVI tec انجام شد. به منظور تعیین مثبت یا منفی بودن بیان ژن Oct-4 در نمونه‌های مورد بررسی، میانگین و انحراف از میانگین شدت بیان نسبی در هر گروه تعیین و از شاخص میانگین±انحراف معیار به عنوان آستانه بیان استفاده گردید و تمام نمونه‌های بالاتر و پایین‌تر از این حد به ترتیب مثبت یا منفی در نظر گرفته شدند. نسبت بیان نمونه‌ها در این مطالعه موردی- شاهدی، توسط آزمون One-way ANOVA ارزیابی گردید.

یافته‌ها

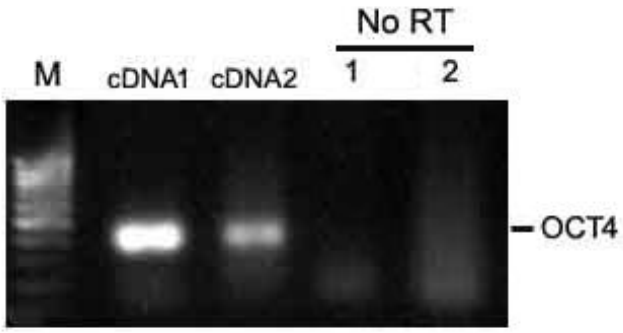
در تحقیق حاضر ۵۵ نمونه انسانی از اتاق عمل بیمارستان امام خمینی تبریز جمع‌آوری گردید که ۲۵ مورد توموری، ۱۶ مورد حاشیه توموری و ۱۶ مورد هم ندول‌های غیرتوموری تیروئید بودند. RNA استخراج شده از نمونه‌ها از کیفیت و کمیت خوبی برخوردار بودند و الگوی باندینگ آنها روی ژل آگارز نشان داد که تمامی آنها فاقد شکستگی بوده و مناسب برای انجام PCR می‌باشند. همچنین، آنالیز RNA با پیکودراپ نشان داد که فاقد آلودگی پروتئینی بوده و غلظت آنها برای مطالعات بیان ژن مناسب است.

هضم آنزیمی RNA کامل قبل از سنتز cDNA برای ژن Oct-4 که دارای چندین سودوژن است ضروری می‌باشد. شکل ۱ نشان می‌دهد که واکنش هضم آنزیمی، به طور کامل هرگونه آلودگی احتمالی DNA را حذف کرده است و ژن مورد نظر Oct-4 به صورت اختصاصی و تک باند با پرایمرهای مورد نظر تکثیر یافته است.

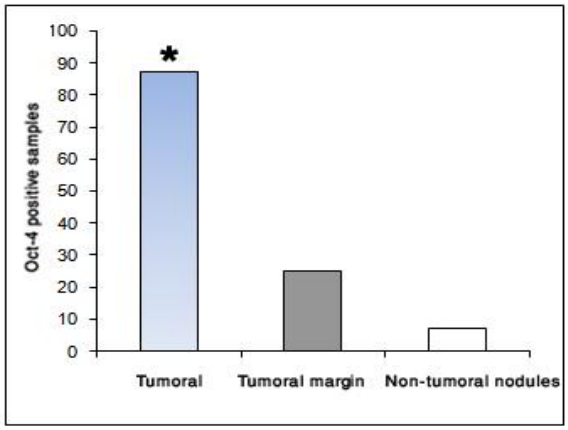
نتایج بدست آمده از آنالیز بیان ژن با RT-PCR نشان دادند که بیان ژن Oct-4 در نمونه‌های توموری مورد بررسی نسبت به حاشیه تومور و ندول‌های غیرتوموری تیروئید به طرز چشمگیری

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]

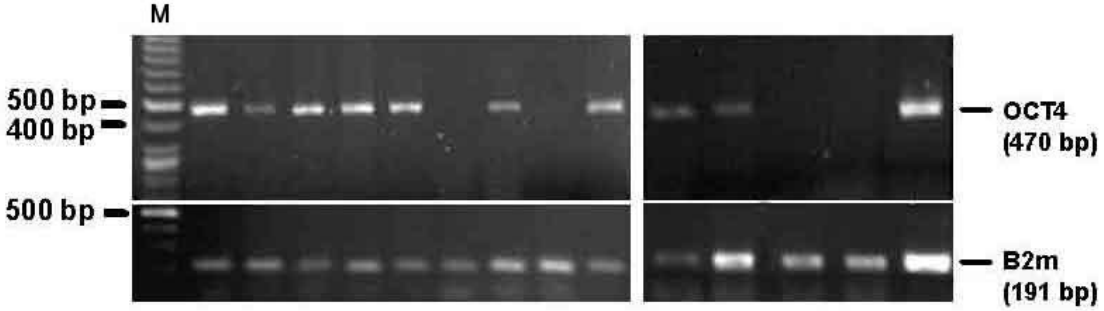
افزایش یافته است. در ۸۷/۵ درصد از نمونه‌های توموری ژن Oct-4 بیان داشت در حالی که این مقدار برای نمونه‌های جمع‌آوری شده از حاشیه تومور حدود ۲۵ درصد و برای ندول‌های غیرتوموری ۱٤/۷ درصد بود ($p<۰/۰۵$ برای هر دو). باند ٤۹۱ نوکلئوتیدی مربوط به ژن β_2m به عنوان کنترل داخلی در تمامی نمونه‌ها مشاهده گردید (شکل‌های ۲ و ۳).



شکل ۱. تایید ماهیت باندهای مشاهده شده در مرحله PCR. نبود باند در نمونه های No RT تیمار شده با DNase I که تبدیل به cDNA نشده اند حاکی از تجزیه کامل DNA می باشد. ستون مربوط به M مارکر را نشان می دهد.



شکل۲. الگوی آماری بیان ژن Oct-4 در سه گروه توموری، حاشیه تومور و ندول های غیرتوموری تیروئید. علامت ستاره معنی دار بودن بیان در نمونه های توموری نسبت به سایر گروه ها را نشان می دهد.



شکل ۳. بیان ژن Oct-4 در نمونه های توموری. ستون M مارکر را نشان می دهد. B2m: Beta 2- microglobin

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]

نتیجه تعیین توالی قطعه ٤٧٠ نوکلئوتیدی ژن Oct-4 و مقایسه آن با توالی موجود در Gene bank نشان داد که قطعه تکثیر شده مربوط به mRNA آن ژن می‌باشد.

بحث

در سال‌های اخیر میزان شیوع سرطان تیروئید همانند سایر سرطان‌های شایع افزایش چشمگیری یافته است. امروزه نبود مارکرهای مولکولی ایده‌آل جهت تشخیص زودرس و تفکیک سرطان پاپیلاری کارسینوما از انواع غیرتوموری ندول‌های تیروئیدی توجه محققان را به جستجوی راهکارهائی در این زمینه معطوف کرده است [١٤،١٥]. از سوی دیگر، مطالعات اخیر حاکی از آن است که تنها عده معدودی از سلول‌های موجود در غده‌های سرطانی توانایی تشکیل تومور و نیز مقاومت به درمان را دارا هستند [١].

طبق نظریه منشأ بن یاخته‌ای سرطان، سلول‌های بن‌یاخته ای موجود در بافت‌ها به دلیل اختلال در فرآیند تمایز می‌توانند با تکثیر خود به خودی و عدم تمایز، تولید غده‌های توموری کنند [١،٣]. بنابراین استراتژی‌های آینده برای درمان و یا پیشگیری از عود سرطان باید بر اساس هدف‌گیری عوامل درگیر در مسیر خودبازسازی این سلول‌ها طراحی شوند [١٥].

یافته‌های اخیر نشان از بیان ژن‌های درگیر در فرآیند خودبازسازی از جمله Oct-4 در تومورهای سرطانی دارد. ژیانگ و همکاران در مطالعه روی نمونه‌های توموری معده نشان دادند که این ژن می‌تواند به عنوان یک مارکر پیش آگهی در نظر گرفته شود [١٩]. نتایج مشابه برای سایر تومورها از جمله سرطان کولون [٢٠]، گردن رحم [٢١] و آناپلازی تیروئید [٧] نیز گزارش گردیده است که همگی نشان از بیان متمایز ژن Oct-4 در نمونه‌های توموری نسبت به انواع غیرتوموری دارد. هرچند که انواع مارکرهای بن یاخته‌ای سرطانی در نمونه‌های توموری تیروئید مطالعه شده است، اطلاعات کمی از پروفیل بیانی Oct-4 در پاپیلاری کارسینوما است. نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان دادند که ژن Oct-4 در بافت‌های توموری نسبت به حاشیه تومور و همچنین ندول‌های غیرتوموری به طرز معنی‌داری بیان می‌شود. این یافته با نتایج ژانگ [٩] و لین [١٠] همخوانی دارد که حضور بن یاخته‌های سرطانی را در بافت‌های توموری تیروئید گزارش کرده و نشان دادند که مارکرهای ژنی این سلول‌ها در تومورهای پاپیلاری و آناپلازی وجود دارند. وانگ و همکاران نیز در مطالعه خود گزارش کرده‌اند که بیان ژن Oct-4 در کارسینومای‌های تیروئید به مراتب بیشتر از انواع خوش‌خیم است [٧].

این نتیجه می‌تواند ناشی از بیان Oct-4 در سلول‌های غیرطبیعی سرطانی باشد که به دلایلی ژن Oct4 را نیز تحت تاثیر قرار داده است و یا ممکن است ناشی از وجود سلول‌های سرطانی باشند که به طریقی خاصیت خودبازسازی را بدست آورده‌اند [١،٧]. تعیین دقیق ماهیت بن یاخته‌ای تومورهای مورد مطالعه نیازمند بررسی نمونه‌های بیشتر و همچنین تفکیک نمونه‌ها از نظر مارکرهای سطحی بن یاخته‌ای است. نتایج ما می‌تواند به نوعی نقش ژن‌های بن یاخته‌ای را در سرطان پاپیلاری کارسینوما در بیماران شمالغرب ایران وانمود کند. از سوی دیگر، بیان بسیار پایین این ژن در نمونه‌های حاشیه تومور و ندول‌های غیرتوموری تیروئید نسبت به بافت توموری می‌تواند ژن Oct-4 را به عنوان یک شناسه مولکولی برای پاپیلاری کارسینوما مطرح سازد که در کنار سایر روش‌های روتین پاتولوژیکی قابل استفاده باشد. درصد بیان این ژن در نمونه‌های غیرتوموری گواتر بسیار پائین است. به عبارتی بافت غده گواتر عاری از سلول‌هایی با خاصیت تکثیر و خودبازسازی است. این یافته با گزارش آقای وانگ و همکاران همخوانی دارد [٨].

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]

نتیجه گیری

در مجموع، نتایج مطالعه حاضر بیان قابل توجه ژن Oct-4 را به طور اختصاصی در نمونه‌های پاپیلاری کاسینومای غده تیروئید بیماران منطقه شمالغرب ایران نسبت به انواع غیرتوموری گزارش می‌کند که می‌تواند تاثیری بر نظریه وجود سلول‌هایی با خاصیت بنیادی و یا خودبازسازی در غده‌های توموری باشد. همچنین این ژن می‌تواند بعنوان یک تومور مارکر بالقوه برای تشخیص بافت توموری تیروئید از ندول‌های غیرتوموری و نیز مرزبندی تومور از حاشیه آن به کار برده شود که به نوعی گویای نقش این ژن در بروز و پیشروی سرطان است. رسیدن به این مهم نیازمند بررسی و مطالعه کمّی بیان این ژن در نمونه‌های بیشتر می‌باشد که در آزمایشگاه این گروه تحقیقاتی در حال انجام می‌باشد.

تشکر و قدردانی

گروه نویسندگان از همکاری صمیمانه سرکار خانم دکتر حلیمی متخصص پاتولوژی، پرسنل اتاق عمل بیمارستان امام خمینی تبریز و بیماران ارجمند کمال تشکر و قدردانی را دارد. این مقاله مستخرج از نتایج طرح تحقیقاتی مصوب در دانشگاه تبریز به شماره ص۳۳۷/۲۷ می‌باشد.

References

1- Bjerkvig R, Tysnes BB, Aboody KS, Najbauer J, Terzis AJ. The origin of the cancer stem cells: current controversies and new insights. Nat Rev Cancer. 2005 Nov; 5(11): 899-904.
2- Pesce M, Wang X, Wolgemuth DJ, Scholer, H. Differential expression of the OCT4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. Mech Dev. 1998 Feb; 71(1-2): 89-98.
3- Singh VK, Kumar N, Kalsan M, Saini A, Chandra R. Mechanism of Induction: Induced pluripotent Stem Cells (iPSCs). J Stem Cells. 2015; 10(1): 43-62.
4- Palmieri SL, Peter W, Hess H, Schöler HR. Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extra embryonic cell lineages involved in implantation. Dev Biol. 1994 Nov; 166(1): 259-267.
5- Cheng L. Establishing a germ cell origin for metastatic tumors using OCT4 immunohistochemistry. Cancer. 2004 Nov; 101(9): 2006-2010.
6- Tai MH, Chang CC**,** Olson LK, Trosko JE. Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. Carcinogenesis. 2005 Feb; 26(2):495–502.
7- Carina V, Zito G, Pizzolanti G, Richiusa P, Criscimanna A, Rodolico V, et al. Multiple pluripotent stem cell markers in human anaplastic thyroid cancer: the putative upstream role of SOX2. Thyroid. 2013 Jan: 23(7): 829-837.
8- Wang H, Wang. Significance of Oct-4's expression in thyroid neoplasm. Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi. 2010 Aug; 24(15): 682-685.
9- Kim K, Ro JY, Kim S, Cho YM. Expression of stem-cell markers OCT-4 and CD133: important prognostic factors in papillary renal cell carcinoma. Hum Pathol. 2012 Dec; 43(12): 2109-2116.
10- Cheng CJ, Wu YC, Shu JA, Ling TY, Kuo HC, Wu JY, et al. Aberrant expression and distribution of the OCT-4 transcription factor in seminomas. J Biomed Sci. 2007 Nov; 14(6): 797-807.
11- Babaei E, Mowla SJ, Shariat Torbaghan S , Emadi Bayegi M. Detection of survivin gene expression in formalin fixed paraffin-embedded tissues of human osteosarcoma: Its potential usefulness in diagnosis and prognosis of bone tumors. IBJ. 2006 Jan; 10(1): 39-45.
12- Khoo ML, Asa SL, Witterick IJ, Freeman JL. Thyroid calcification and its association with thyroid carcinoma. Head Neck. 2002 Jul; 24 (7): 651-655.
13- Liang H, Zhong Y, Luo Z, Huang Y, Lin H, Luo M, et al. Assessment of biomarkers for clinical diagnosis of papillary thyroid carcinoma with distant metastasis. Int J Biol Markers. 2010 Jan-Mar; 25(1):38-45.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]

14- Shaha A. Treatment of thyroid cancer based on risk groups. J Surg Oncol. 2006 Dec; 94(8): 683-691
15- Trosko JE. From adult stem cells to cancer stem cells: Oct-4 Gene, cell-cell communication, and hormones during tumor promotion. Ann N Y Acad Sci. 2006 Nov; 1089: 36-58.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]