

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2026.01.0014

论著

TBX3 介导 BRAF^{V600E} 诱导的甲状腺癌失分化的功能研究

阚荣林, 赵丽

(天津医科大学基础医学院生物化学与分子生物学系, 天津 300070)

摘要 目的: 探究 TBX3 在 BRAF^{V600E} 诱导的甲状腺癌细胞失分化中的作用。方法: 利用原位自发甲状腺乳头状癌小鼠模型 (mPTC) 以及诱导型过表达 BRAF^{V600E} 的体外甲状腺失分化癌模型 (Nthy-BRAF^{V600E} Teton), 分析 TBX3 表达水平与甲状腺癌分化基因表达变化的相关性; 在体外甲状腺未分化癌 (ATC) 细胞系 KHM-5M 以及 8505C 中敲低 TBX3, 通过 Western 印迹、RT-qPCR、Transwell 及细胞成球实验, 评估其对细胞分化、迁移和干性的影响。结果: 免疫组化/免疫荧光实验结果显示, 在甲状腺癌进展过程中, Tbx3 与分化标志物 (Pax8、Tg、Nis) 的表达水平呈负相关。在 Nthy-BRAF^{V600E} Teton 细胞系中加入强力霉素, Western 印迹结果显示随着磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2 的持续性激活, BRAF 以及 TBX3 的表达水平逐渐升高。CCK-8 实验结果显示, 过表达 BRAF^{V600E} 后细胞增殖能力明显提升 ($t=9.076, P<0.0001$)。选取诱导 48 h 为最佳诱导时间点, 此时 TBX3 表达水平显著升高 ($t=6.180, P<0.01$), 分化基因 TG、PAX8 以及 FOXE1 的 mRNA 水平明显降低 ($t=4.101, 2.994, 4.392$, 均 $P<0.05$)。RT-qPCR 结果显示, ATC 细胞系 KHM-5M 以及 8505C 中 TBX3 的 mRNA 水平明显高于人正常甲状腺上皮细胞 Nthy ($q=18.82, 6.562$, 均 $P<0.01$)。当 KHM-5M 以及 8505C 中, TBX3 的表达量明显降低 (敲低组 vs. 对照组, KHM-5M 中 $q=82.29, 61.22$, 均 $P<0.0001$; 8505C 中 $q=25.89, 26.71$, 均 $P<0.001$) 时, Western 印迹结果显示 NIS ($q=35.50, 9.343$, 均 $P<0.01$; $q=19.02, 20.55$, 均 $P<0.001$)、PAX8 ($q=27.72, 17.16$, 均 $P<0.001$; $q=6.831, 7.015$, 均 $P<0.05$)、TPO ($q=27.14, 6.113$, 均 $P<0.05$; $q=56.34, 10.81$, 均 $P<0.01$)、TTF-1 ($q=16.69, 4.576$, 均 $P<0.05$; $q=25.69, 22.70$, 均 $P<0.001$) 的表达水平显著上调。Transwell 迁移实验表明, 敲低 TBX3 显著抑制了 KHM-5M 以及 8505C 的迁移能力 (敲低组 vs. 对照组, KHM-5M 中 $q=10.90, 11.67$, 均 $P<0.0001$; 8505C 中 $q=14.49, 35.19$, 均 $P<0.0001$)。此外, 细胞成球实验结果显示, 敲低 TBX3 后, KHM-5M 以及 8505C 的成球能力明显降低 (敲低组 vs. 对照组, KHM-5M 中 $q=8.660, 12.56$, 均 $P<0.001$; 8505C 中 $q=10.41, 14.79$, 均 $P<0.0001$)。结论: TBX3 通过抑制甲状腺癌细胞分化、增强迁移能力以及维持干细胞特性, 介导了 BRAF^{V600E} 诱导的甲状腺癌失分化, 从而促进肿瘤的恶性进展。

关键词 甲状腺癌; BRAF^{V600E}; TBX3; 失分化

中图分类号 R34

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2026)01-0014-09

The functional study of TBX3 in mediating BRAF^{V600E}-induced dedifferentiation of thyroid cancer

KAN Ronglin, ZHAO Li

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To investigate the role of T-box transcription factor 3 (TBX3) in BRAF^{V600E}-induced dedifferentiation of thyroid carcinoma cells. **Methods:** The correlation between TBX3 expression and alterations in thyroid cancer differentiation gene expression was analyzed using a mouse model of in situ spontaneous papillary thyroid carcinoma (mPTC) and an inducible BRAF^{V600E}-overexpressing *in vitro* dedifferentiated thyroid carcinoma cell model (Nthy-BRAF^{V600E} Teton). TBX3 was knocked down *in vitro* in human anaplastic thyroid carcinoma (ATC) cell lines (KHM-5M, 8505C). The effects on cell differentiation, migration, and stemness were assessed via Western blotting, reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), Transwell, and tumor-sphere formation assays. **Results:** Immunohistochemical and immunofluorescence analyses revealed an inverse correlation between the expression levels of Tbx3 and differentiation markers (Pax8, thyroglobulin, sodium-iodide symporter) during thyroid cancer progression. Doxycycline induction in Nthy-BRAF^{V600E} Teton cells resulted in sustained p-extracellular regulated protein kinase 1/2 activation, accompanied by progressively increased BRAF and TBX3 protein levels. CCK-8 assays demonstrated significantly enhanced cellular proliferation upon BRAF^{V600E} overexpression ($t=9.076, P<0.0001$). The 48-hour induction point was selected for subsequent experiments, characterized by significantly elevated TBX3 expression ($t=6.180, P<0.01$) and markedly reduced mRNA levels of differentiation genes TG, PAX8, and FOXE1 ($t=4.101, 2.994, 4.392$; all $P<0.05$). RT-qPCR confirmed significantly higher TBX3 mRNA levels in ATC cell lines KHM-5M and 8505C compared to immortalized normal human thyroid epithelial cells (Nthy) ($q=18.82, 6.562$, both $P<0.01$). In KHM-5M and 8505C, efficient TBX3 knockdown (knockdown group vs. control group: KHM-5M, $q=82.29, 61.22$; 8505C, $q=25.89, 26.71$; all $P<0.001$) led to significant upregulation of key differentiation proteins, as shown by Western

基金项目 国家自然科学基金 (82073052)

作者简介 阚荣林 (2000-), 女, 硕士在读, 研究方向: 医学生物化学与分子生物学; 通信作者: 赵丽, E-mail: shzhaoli@tmu.edu.cn.

blotting: NIS (KHM-5M: $q=35.50, 9.343$; 8505C: $q=19.02, 20.55$), PAX8 (KHM-5M: $q=27.72, 17.16$; 8505C: $q=6.831, 7.015$), thyroid peroxidase (KHM-5M: $q=27.14, 6.113$; 8505C: $q=56.34, 10.81$), and thyroid transcription factor-1 (KHM-5M: $q=16.69, 4.576$; 8505C: $q=25.69, 22.70$) (all $P<0.05$ unless otherwise specified; specific P -values for all protein comparisons were $P<0.01$ or $P<0.001$). TBX3 knockdown significantly attenuated the migratory capacity of both ATC cell lines KHM-5M and 8505C in Transwell assays (knockdown *vs.* control: KHM-5M, $q=10.90, 11.67$; 8505C, $q=14.49, 35.19$; all $P<0.0001$). Furthermore, tumorsphere formation assays revealed a significant impairment in stem cell-like properties of KHM-5M and 8505C upon TBX3 depletion (knockdown *vs.* control: KHM-5M, $q=8.660, 12.56$; 8505C, $q=10.41, 14.79$; all $P<0.001$). **Conclusion:** TBX3 mediates BRAF^{V600E}-induced dedifferentiation in thyroid cancer by repressing cellular differentiation, enhancing migratory potential, and maintaining stemness, thereby collectively promoting malignant progression.

Key words thyroid cancer; BRAF^{V600E}; TBX3; dedifferentiation

甲状腺癌(TC)是内分泌器官最常见的恶性肿瘤,约占全身恶性肿瘤的1%。尽管分化型TC预后良好,但仍有约5%的TC患者不再保留摄碘的生物学功能,出现癌细胞失分化转变与碘抵抗现象^[1]。其中,甲状腺未分化癌(ATC)的恶性程度最高,其进展迅速,死亡率超过90%^[2-5]。由于手术、放疗和化疗对ATC患者的疗效有限,目前临床上缺乏有效的治疗手段,导致患者生存期显著缩短,已成为临床上亟待解决的重点和难点问题^[6]。

据报道,遗传畸变(如BRAF、RAS和RET/PTC重排)是导致TC发生、发展和失分化的重要原因,其主要激活丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(AKT)这两个信号通路^[7]。其中,BRAF^{V600E}诱导的MAPK信号通路的持续性激活是最关键的早期驱动因素^[8],通常与TC恶化与失分化进展密切相关^[9]。目前研究发现,约有45%的ATC患者携带BRAF^{V600E}突变^[10],并且这类ATC患者往往更容易发生碘抵抗等不良预后^[11]。

T-box转录因子家族在胚胎发育中发挥重要作用,其中T-box转录因子3(TBX3)作为这个家族的一员,在胚胎发育中调控心脏、乳腺和四肢等器官的形成^[12]。其突变会导致耻骨-乳腺综合征,发生乳腺和大汗腺发育不全,上肢、心脏和生殖器缺陷等多种临床畸形。相比之下,TBX3在成人组织中没有上述功能,但它在黑色素瘤、乳腺癌等多种癌症中异常高表达,从而在肿瘤形成过程中帮助其绕过衰老和细胞凋亡,并促进增殖、肿瘤形成和侵袭^[12-16]。这些证据提示,TBX3可能在肿瘤发生和进展中发挥着关键作用。然而,TBX3在TC失分化中的作用尚未明确。

本课题组前期研究结合临床样本和系列小鼠遗传模型发现,TBX3在人及小鼠甲状腺乳头状癌(PTC)中表达水平显著高于癌旁正常组织,与TC细胞的增殖能力呈正相关,并受BRAF^{V600E}直接调控^[15-16]。在Braf^{V600E}诱导生成的早期小鼠甲状腺乳头状癌(mPTC)中,敲除Tbx3能够显著抑制癌症的进程,并

促进分化和摄碘相关基因的表达上调^[16-18]。基于这些结果,笔者推测TBX3可能是BRAF/MAPK信号通路介导TC细胞失分化的关键分子。

因此,揭示TBX3在调控TC细胞失分化中的功能,有望为临床上ATC的诊疗提供靶点和科学依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

人甲状腺正常细胞Nthy-ori 3-1(Nthy)(美国,ATCC);人ATC细胞系KHM-5M、8505C获赠于广东中山大学附属第一医院刘仍允教授课题组;RPMI 1640、胎牛血清FBS(中国,上海道鹏生物科技有限公司);DMEM/F-12(1:1)(美国,Gibco);RIPA裂解缓冲液、蛋白酶抑制剂、磷酸蛋白酶抑制剂、HE染色试剂盒(中国,北京索莱宝生物科技有限公司);TRIzol、BCA试剂盒(美国,Invitrogen);BeyoECL Star化学发光试剂盒(中国,上海碧云天生物技术股份有限公司);cDNA第一链合成试剂盒(中国,北京康润诚业生物科技有限公司);青链霉素PS、胰蛋白酶、CCK-8检测盒(中国,苏州新赛美生物科技有限公司);BRAF抗体、磷酸化细胞外信号调节激酶(p-ERK)1/2抗体、细胞外信号调节激酶(ERK)1/2抗体(美国,Cell Signaling Technology);TBX3抗体、PAX8抗体、甲状腺球蛋白(TG)抗体、甲状腺过氧化物酶(TPO)抗体、甲状腺转录因子(TTF)-1抗体(英国,Abcam); α -Tubulin抗体(美国,Sigma);Vinculin抗体(中国,爱博泰克生物科技有限公司);Anti-Rabbit IgG(H+L)Antibody、Anti-Mouse IgG(H+L)Antibody(美国,KPL);NIS抗体、Alexa FluorTM 568 Goat anti-Mouse IgG(H+L)、Alexa FluorTM 568 Goat anti-Rabbit IgG(H+L)(美国,Thermo Fisher Scientific);二氧化碳培养箱、实时荧光定量PCR仪器购于美国Thermo Fisher Scientific公司;CLASS II TYPE A2生物安全柜购于中国北京东联哈尔仪器制造有限公司;石蜡包埋机、石蜡切片机购于德国Leica公司;正置荧光显微镜购于中国北京奥林巴斯销售服务有限公司;BioTek酶标仪购于美国伯腾仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 实验动物 *TPO-Cre* 小鼠由美国 NIH 的 Shioko Kimura 教授馈赠; *LSL-Braf^{V600E}CA* 小鼠由美国 NIH 的 Martin McMahon 教授馈赠。将 *TPO-Cre* 小鼠与 *LSL-Braf^{V600E}CA* 小鼠杂交得到 *TPO-Cre; LSL-Braf^{V600E}CA* 小鼠,即为 mPTC 小鼠模型。所有小鼠实验程序和方案均经《天津市实验动物管理条例》审核和授权。实验操作遵循天津医科大学动物保护与使用委员会的相关指导原则[批准号:SYXK(津)-2023-0004]。

1.2.2 细胞培养及传代 人正常甲状腺上皮细胞 Nthy 以及具有 BRAF^{V600E} 突变的人 ATC 细胞系 KHM-5M、8505C 培养于含 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素的 RPMI-1640 培养基中,于 5% CO₂、37℃ 细胞培养箱中进行培养。待细胞融合至 90% 左右,用 0.25% 的胰蛋白酶消化细胞并传代。

1.2.3 质粒 将 BRAF^{V600E} 突变体基因片段克隆至慢病毒 Tet-on 诱导表达载体 pLVX-Tet-on-Bsd 中,构建 pLVX-Tet-on-BRAF^{V600E} 重组质粒。将靶向 TBX3 的 shRNA 克隆到 pLKO.1-puro 中,获得了敲低 TBX3 的重组质粒。shTBX3 目的序列通过 <https://www.sigamaaldrich.cn/CN/zh> 网站进行设计,引物合成服务由北京擎科生物科技公司提供。相关 shTBX3 引物序列在表 1 中列出。

1.2.4 免疫组织化学和免疫荧光分析(IHC/IF) 小

鼠肿瘤组织被固定在 4% PFA 中,并包埋于石蜡中。对小鼠组织石蜡块进行切片,切片厚度 5 μm。HE 染色步骤如下:石蜡切片在 61℃ 条件下烤片 90 min。二甲苯脱蜡,并用梯度乙醇水化。苏木素染液染色 30~60 s,自来水冲洗 3~5 次后浸泡 15 min。伊红染色 10 s,自来水冲洗 3~5 次后浸泡 5 min。梯度乙醇脱水透明后用中性树胶封片。免疫组织化学染色步骤如下:石蜡切片在 61℃ 条件下烤片 90 min。二甲苯脱蜡,并用梯度乙醇水化。在柠檬酸钠缓冲液(pH 6.0)中进行高压修复。使用含 0.2% Triton-100 的 PBS 透膜 15 min 后用 PBS 清洗。3% H₂O₂ 灭活内源性过氧化物酶,并利用 10% 羊血清封闭 2 h。滴加一抗(TBX3 1:200、PAX8 1:20、TG 1:400、NIS 1:100)于 4℃ 孵育过夜。根据一抗属性在 HRP 标记的二抗(IF 1:1000;IHC 1:200)中室温孵育 2 h。孵育完成后进行 DAB 显色以及苏木素复染核。梯度乙醇脱水透明后用中性树胶封片。免疫荧光染色步骤如下:二抗孵育前步骤与免疫组织化学染色相同,但免疫荧光染色不需要灭活内源性过氧化物酶。根据一抗属性在 FITC 标记的二抗中孵育 2 h。用含有 DAPI 的封片剂进行封片。以上染色后的组织切片于正置荧光显微镜下采集图像。

1.2.5 RT-qPCR 法测定 RNA 的含量 利用 TRIzol 提取总 RNA,并使用 GenStar 逆转录试剂盒进行 RNA 的反转录。采用 LightCycler 480 real-time PCR 系统(Roche)测定相对定量,qPCR 反应程序为:(1)预变:95℃,600 s。(2)扩增:95℃,15 s;60℃,60 s。扩增 40 个循环。(3)熔解:95℃,15 s;60℃,60 s;90℃,1 s。(4)冷却:4℃,∞。使用内参对反应得到的目的基因 CT 值进行校正,采用比较 Ct 值法(2^{-ΔΔCt})计算相对定量。每个样本至少重复 3 次。引物合成服务由北京擎科生物科技公司提供,引物序列在表 2 中列出。

表 1 shRNA 引物序列

Tab.1 shRNA primer sequences

引物名称	引物序列(5'→3')
shTBX3#1	GCGAATGTTTCCTCCATTTAA
shTBX3#2	GCTGATGACTGTCGTTATAAA

注:shTBX3#1/#2:TBX3 敲低组

表 2 RT-qPCR 引物序列

Tab.2 RT-qPCR primer sequences

引物名称	上游序列(5'→3')	下游序列(5'→3')	引物大小(bp)
TBX3	TTTGAAGACCATGGAGCCCG	ACATTGCGCTTCCCGACTTG	20
TG	GTTCCTGATTCTGAGTTCCCG	GGCAACATTGTCACTTGTC	21
TPO	AGTCCGTGCTCTAGCGTC	TGTTGCTCAGGAAGTTGG	19
PAX8	ACTACAAACGCCAGAACC	AGGGAGGTTGAATGGTTGC	20
FOX E1	CTACAGCTACATCGCGCTCA	GCGGACACGAACCGATCTAT	20
GAPDH	CCTGTTCCAGATCAGCCG	CGACCAAATCCGTTGACTCC	20

注:TBX3:T-box 转录因子 3;TG:甲状腺球蛋白;TPO:甲状腺过氧化物酶;PAX8:配对盒 8;FOX E1:叉头盒 E1;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶

1.2.6 Western 印迹实验 待细胞密度为 80% 左右收取细胞蛋白。将 RIPA 裂解缓冲液:蛋白酶抑制剂:磷酸蛋白酶抑制剂按照 100:1:1 的比例进行配制,加入细胞培养皿中收取细胞并进行裂解,蛋

白提取物通过 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。蛋白样品经 8% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳分离,并转移至 PVDF 膜上,按照蛋白大小剪裁 PVDF 膜,之后经 5% 脱脂牛奶封闭 2 h,封闭后将膜条转移至对应一

抗中 4℃ 孵育过夜, 第二天根据一抗属性在 HRP 标记的二抗中孵育, 二抗孵育完成后进行曝光, 并整理结果。所需一抗如下: TBX3(1:1 000)、BRAF(1:1 000)、p-ERK1/2 (1:2 000)、ERK1/2 (1:1 000)、NIS(1:500)、PAX8(1:200)、TPO(1:1 000)、TTF-1 (1:500)、Vinculin(1:1 000)、 α -Tubulin(1:2 000)。

1.2.7 CCK-8 实验 准备处于对数生长期的细胞按照每孔 1 000 个细胞均匀接种至 96 孔板中, 放置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养, 实验共设置 4 个时间点: 0、24、48、72 h, 每组细胞设置 6 复孔。待细胞贴壁时记为 0 h, 每隔 24 h 吸除上清培养基, 向 96 孔板避光加入 100 μ L 的 CCK8(CCK8 试剂用完全培养基按照 1:10 稀释), 置于 37℃, 5% CO₂ 的细胞培养箱中孵育 2 h。孵育完成后, 使用酶标仪读取该细胞在 450 nm 处的吸光度值, 将数据导出并进行处理, 使用 Graphpad Prism 8.0 软件绘制细胞增殖曲线。

1.2.8 Transwell 迁移实验 准备处于对数生长期的细胞, 用无血清培养基重悬并调整细胞浓度为 $2.5 \times 10^4/100 \mu$ L, 每个细胞培养小室的上室中加入 5×10^4 个细胞, 之后在下室加入 600 μ L 含有 10% 血清的培养基, 并将细胞培养小室放于 37℃, 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养 24~48 h。取出上室, 将其置于 4% 的 PFA 中室温固定 30 min 后用棉签轻轻擦去上室内的细胞。PBS 清洗 3 次, 用 0.1% 的结晶紫染色液进行染色, 静置 15 min。PBS 清洗掉多余的结晶紫

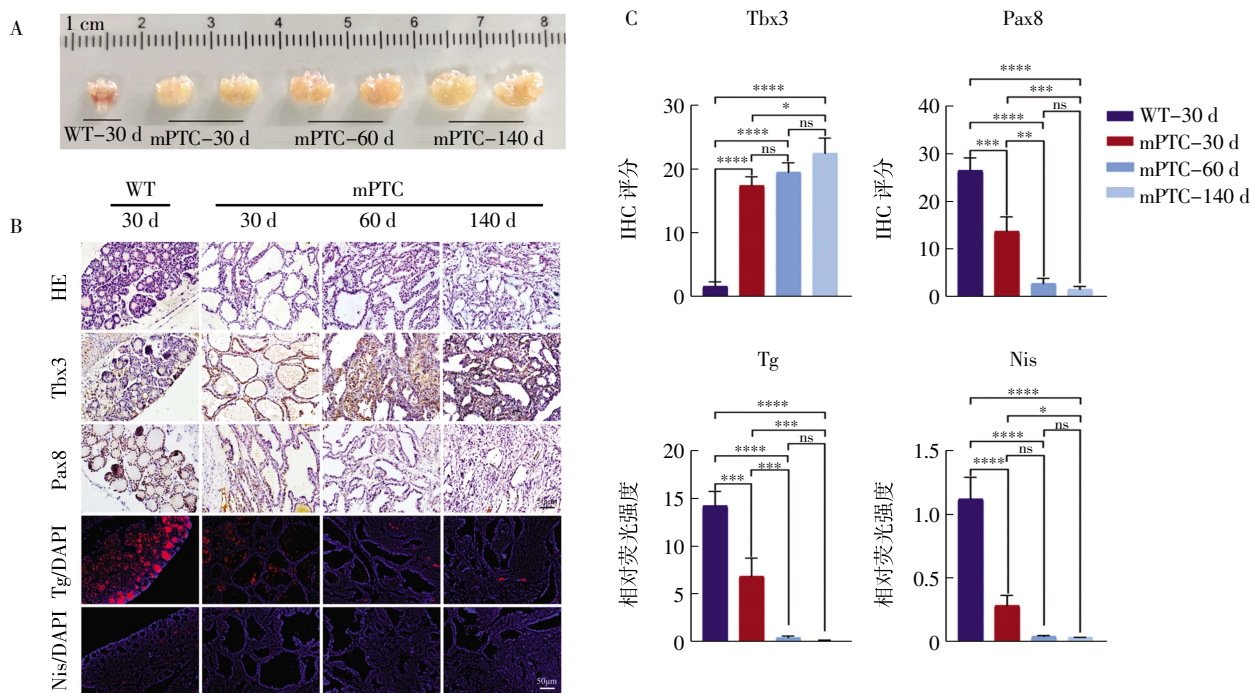
染色液, 将上室放在室温条件下自然干燥。正置显微镜下拍照观察, 并用 Image J 进行定量分析。

1.2.9 细胞成球实验 在 DMEM/F12(50 mL) 培养基中加入 1 mL B27、1 mL 20% 的 BSA、5 μ L 200 μ g/mL 的 EGFR 以及 40 μ L 5 mg/mL 的人胰岛素得到干细胞培养基。将细胞在低黏附成球培养皿(6 孔板) 中培养, 每孔细胞量为 10 000 个细胞。置于 37℃、含 5% CO₂ 细胞培养箱中培养 10~14 d, 期间根据细胞成球状态进行拍照并进行定量分析。

1.3 统计学处理 通过 GraphPad Prism 8.0 进行数据分析和作图, 所有实验均已重复 3 次, 数据符合正态分布。根据数据类型, 两组间比较采用 *t* 检验, 两组以上比较采用单因素方差分析(One Way-ANOVA), $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TC 失分化程度与 Tbx3 表达水平显著正相关 收取不同时期的 mPTC 小鼠甲状腺肿瘤组织, 在 TC 发生、发展过程中, 肿瘤大小逐渐增加(图 1A)。HE 染色结果显示, 随着时间的推移, 甲状腺肿瘤组织逐渐丧失滤泡结构, 组织形态变得致密(图 1B)。之后, 对 Tbx3 以及 Pax8、Tg、Nis 这些与甲状腺分化相关的基因进行 IHC 以及 IF 染色, 发现伴随着 mPTC 的逐渐恶化, Tbx3 表达水平逐渐升高, Pax8、Tg 以及 Nis 这些与甲状腺分化相关的基因表达水平逐渐降低(图 1B、1C)。



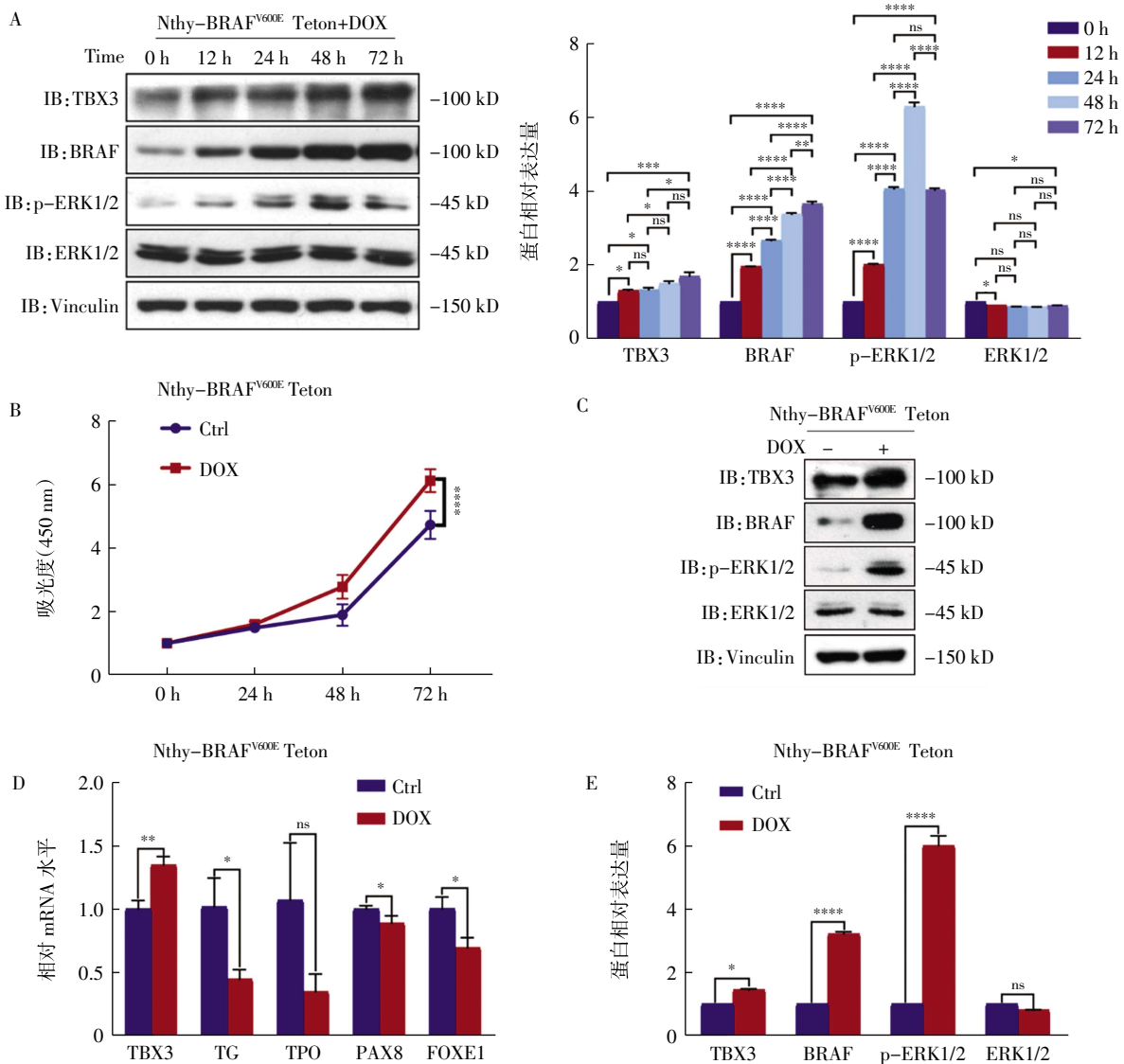
注: WT:野生型小鼠; mPTC:甲状腺乳头状癌小鼠; Tbx3: T-box 转录因子 3; Pax8: 配对盒 8; Tg: 甲状腺球蛋白; Nis: 钠/碘转运体; IHC: 免疫组织化学; A: 1 月龄的正常小鼠甲状腺组织以及不同时期肿瘤小鼠甲状腺组织 ($n=2$) 大小比较; B: WT 以及不同时期 mPTC 甲状腺组织 HE 染色分析组织形态, IHC 及 IF 染色分析 Tbx3、Pax8、Tg、Nis 的蛋白表达; C: Tbx3、Pax8、Tg、Nis 的 IHC、IF 染色结果定量; ns: 无显著性差异, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$; 比例尺: 50 μ m

图 1 甲状腺癌失分化程度与 Tbx3 表达水平呈正相关

Fig.1 Tbx3 expression positively correlates with thyroid cancer dedifferentiation

2.2 TBX3 伴随人甲状腺失分化癌模型恶性进展而持续增加 在 DOX 诱导型过表达 BRAF^{V600E} 的 Nthy 细胞系中,随着 MAPK 信号通路的持续性激活, TBX3 的蛋白表达量逐渐升高(图 2A),并且细胞增殖能力明显增强($t=9.076, P<0.0001$,图 2B),这与体内得到的结果一致。选取加入 DOX 诱导 48 h 作为最佳诱导时间点,发现在 TBX3 蛋白($t=3.890, P<0.05$)以及 mRNA($t=6.180, P<0.01$)水平明显升高的前提下,分化相关基因 TG、PAX8 以及 FOXE1 的 mRNA 水平均有所下调($t=4.101, 2.994, 4.392$,均 $P<0.05$,图 2C、2D、2E)。

2.3 TBX3 缺失促进甲状腺未分化癌再分化 对 BRAF^{V600E} 突变的 ATC 细胞系 KHM-5M 以及 8505C 中 TBX3 的 mRNA 水平进行检测,结果表明 KHM-5M 以及 8505C 中, TBX3 的 mRNA 水平均显著高于 Nthy($q=18.82, 6.562$,均 $P<0.01$,图 3A)。之后分别在 KHM-5M 以及 8505C 细胞中敲低 TBX3, Western Blotting (敲低组 vs. 对照组, KHM-5M 中 $q=58.15, 63.07$,均 $P<0.0001$; 8505C 中 $q=44.49, 42.29$,均 $P<0.0001$)以及 RT-qPCR ($q=82.29, 61.22$,均 $P<0.0001$; $q=25.89, 26.71$,均 $P<0.001$)结果显示 TBX3 已被明显敲低(图 3B),并且敲低 TBX3 后,分化标



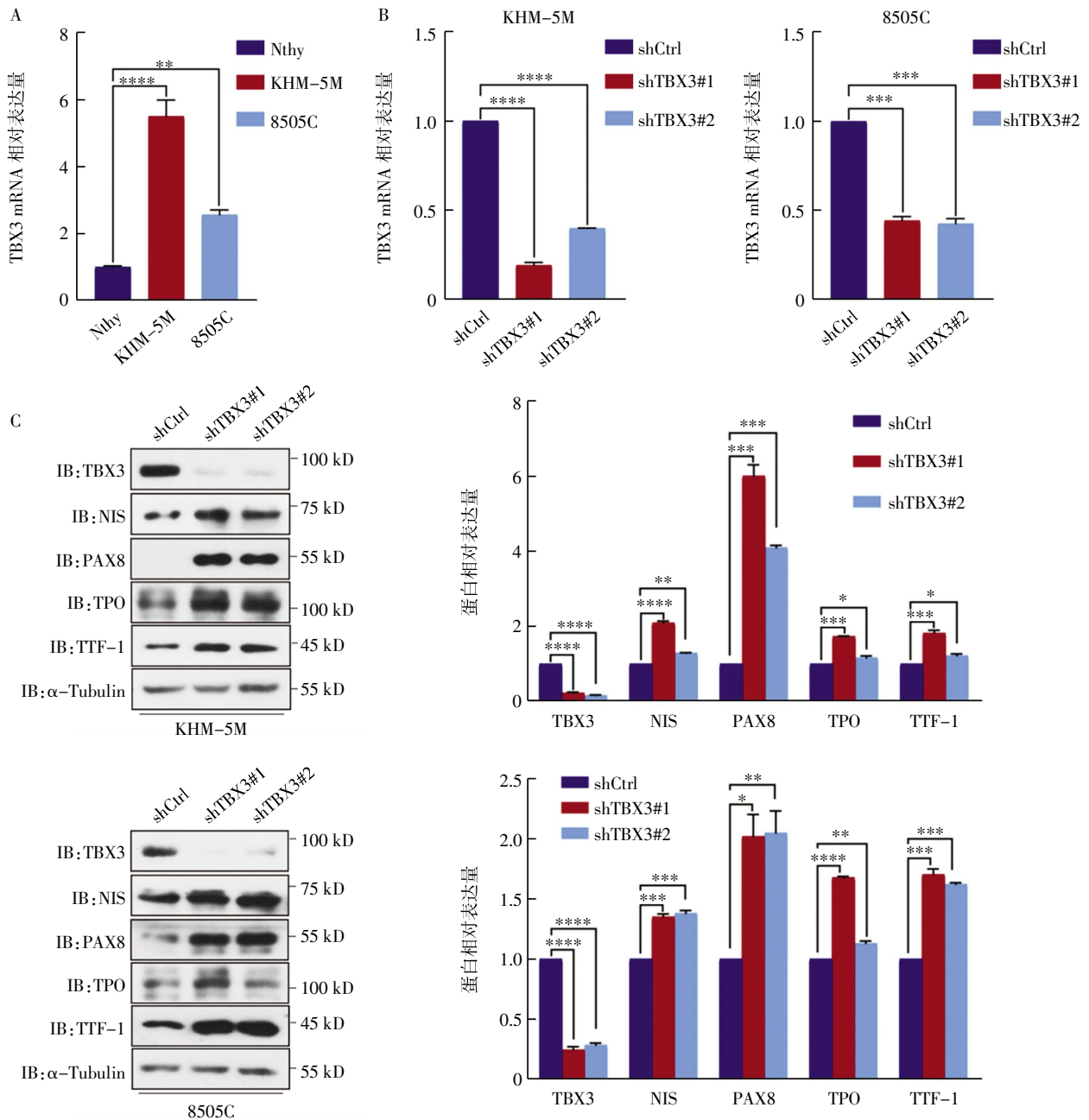
注: Ctrl: 感染 pLVX-Tet-on-BRAF^{V600E} 病毒液但未加 DOX 诱导的阴性对照组; DOX: 感染 pLVX-Tet-on-BRAF^{V600E} 病毒液且加入 DOX 诱导的 BRAF^{V600E} 过表达组; DOX: 强力霉素; TBX3: T-box 转录因子 3; BRAF: 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶; ERK1/2: 细胞外信号调节激酶; p-ERK1/2: 磷酸化 ERK1/2; TG: 甲状腺球蛋白; TPO: 甲状腺过氧化物酶; PAX8: 配对盒 8; FOXE1: 叉头盒 E1; A: Western blotting 检测加入 DOX 诱导不同时间下, p-ERK、BRAF 以及 TBX3 的蛋白表达; B: CCK-8 实验检测肿瘤细胞增殖能力; C: Western Blotting 检测加入 DOX 诱导 48 h 时, p-ERK、BRAF 以及 TBX3 的蛋白表达; D: RT-qPCR 检测加入 DOX 诱导 48 h 时, TBX3、TG、TPO、PAX8 以及 FOXE1 的 mRNA 表达; E: p-ERK、BRAF 以及 TBX3 的蛋白定量分析; ns: 无显著性差异, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$

图 2 TBX3 在人甲状腺失分化癌模型中的时间依赖性表达

Fig.2 Time-dependent expression of TBX3 in human dedifferentiated thyroid carcinoma model

志物 NIS($q=35.50, 9.343$, 均 $P<0.01$; $q=19.02, 20.55$, 均 $P<0.001$)、PAX8($q=27.72, 17.16$, 均 $P<0.001$; $q=6.831, 7.015$, 均 $P<0.05$)、TPO($q=27.14, 6.113$, 均 $P<$

0.05 ; $q=56.34, 10.81$, 均 $P<0.01$)以及 TTF-1($q=16.69, 4.576$, 均 $P<0.05$; $q=25.69, 22.70$, 均 $P<0.001$)的蛋白水平均明显上调(图 3C)。



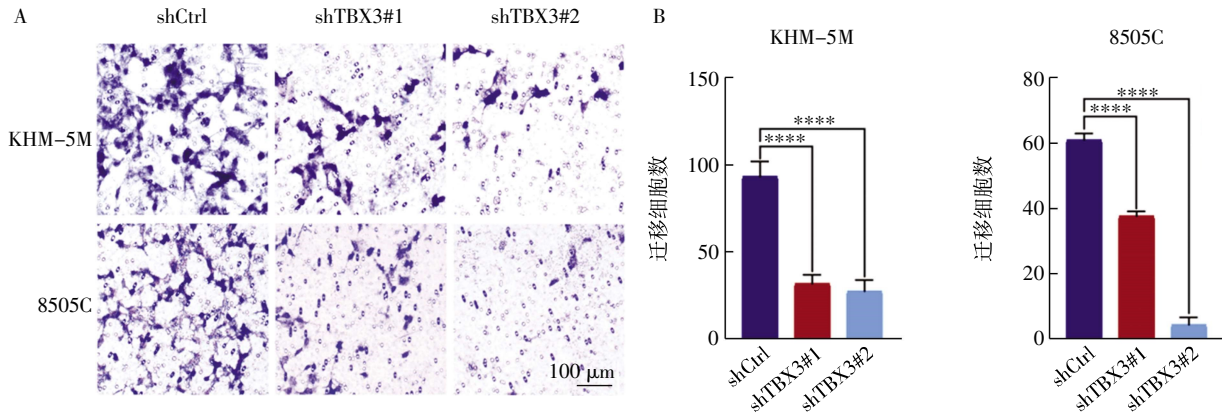
注: shCtrl: 阴性对照组; shTBX3#1/#2: TBX3 敲低组; TBX3: T-box 转录因子 3; NIS: 钠/碘转运体; PAX8: 配对盒 8; TPO: 甲状腺过氧化物酶; TTF-1: 甲状腺转录因子-1; A: RT-qPCR 检测 TBX3 的 mRNA 表达; B: RT-qPCR 检测 TBX3 的敲低情况; C: Western blotting 检测 TBX3、NIS、PAX8、TPO 以及 TTF-1 的蛋白表达; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$

图 3 TBX3 缺失促进甲状腺未分化癌再分化

Fig.3 TBX3 depletion promoted redifferentiation of anaplastic thyroid carcinoma

2.4 TBX3 促进 ATC 细胞迁移 使用 Transwell 迁移实验研究 TBX3 对 ATC 细胞迁移能力的影响。结果显示, 敲低 TBX3 以后, KHM-5M 以及 8505C 的迁移能力均下降(敲低组 vs. 对照组, KHM-5M 中 $q=10.90, 11.67$, 均 $P<0.0001$; 8505C 中 $q=14.49, 35.19$, 均 $P<0.0001$, 图 4)。

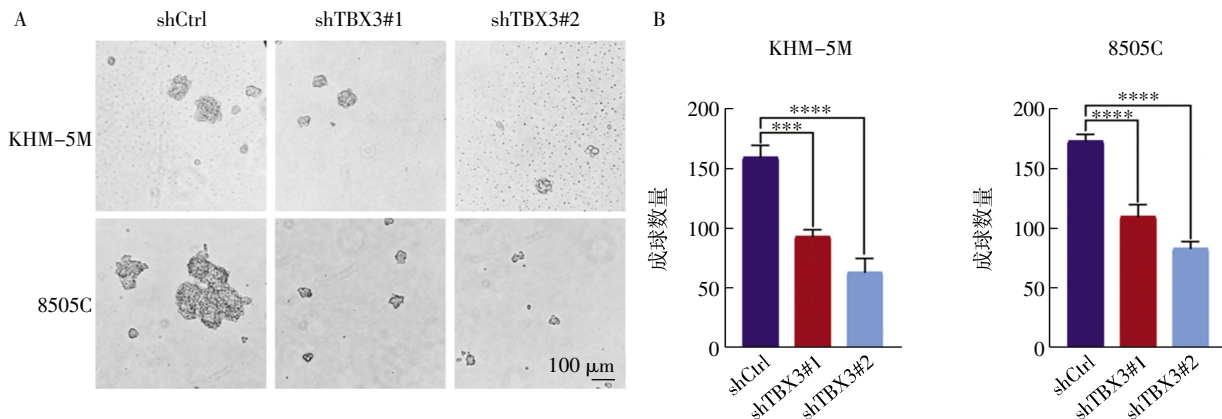
2.5 TBX3 促进 ATC 细胞干性获得 细胞成球实验发现, 在敲低 TBX3 以后, ATC 细胞系 KHM-5M 以及 8505C 的成球能力明显减弱(敲低组 vs. 对照组, KHM-5M 中 $q=8.660, 12.56$, 均 $P<0.001$; 8505C 中 $q=10.41, 14.79$, 均 $P<0.0001$, 图 5)。



注:shCtrl: 阴性对照组;shTBX3#1/#2:TBX3 敲低组;TBX3:T-box 转录因子 3;A:Tranwell 实验检测 KHM-5M 以及 8505C 中敲低 TBX3 对细胞迁移的影响;B:细胞迁移结果定量分析;**** $P < 0.0001$;比例尺:100 μm

图 4 TBX3 促进甲状腺未分化癌细胞迁移

Fig.4 TBX3 promoted the migration of anaplastic thyroid carcinoma cells



注:shCtrl:阴性对照组;shTBX3#1/#2:TBX3 敲低组;TBX3:T-box 转录因子 3;A:在 KHM-5M、8505C 中敲低 TBX3 后的细胞成球实验;B:细胞成球结果定量分析;*** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$;比例尺:100 μm

图 5 TBX3 促进甲状腺未分化癌细胞干性获得

Fig.5 TBX3 promoted stemness acquisition in anaplastic thyroid carcinoma cells

3 讨论

ATC 是甲状腺癌中最罕见但侵袭性最强、预后最差的一种。目前的研究发现,约有 45% 的 ATC 患者携带 BRAF^{V600E} 突变^[10],并且这类 ATC 患者往往更容易发生碘抵抗等不良预后^[19]。针对这类患者,临床上通常使用 MAPK 抑制剂来抑制 MAPK 信号通路的激活,进而促进 ATC 再分化以及碘摄取^[20]。但 MAPK 抑制剂的长期使用会使 ATC 患者产生耐药性,从而制约这一治疗策略的有效性^[21]。因此,针对这类 BRAF/MAPK 信号通路异常激活所导致的 ATC 患者,寻找 BRAF^{V600E} 诱导的 MAPK 信号通路下游关键的靶基因,进而有效干预它,有望解决临床上 TC 失分化和碘抵抗的难题。在本研究中,笔者证实,TBX3 是 BRAF/MAPK 信号通路下游驱动 TC 失分化的核心效应分子。通过原位自发 mPTC 小鼠模型发现,Tbx3 的表达水平与 TC 失分化程度呈正相关,即 Tbx3 表达水平越高,TC 细胞分化程度越

低。这一结果提示,TBX3 可能在 TC 失分化过程中发挥关键作用。

已有研究表明,在 SV-40 永生化 Nthy 中过表达 BRAF^{V600E} 突变体(Nthy-BRAF^{V600E}),可诱导细胞发生恶性转化。转录组分析显示,Nthy-BRAF^{V600E} 细胞的基因表达谱与 ATC 细胞系 8505C 高度相似^[22],表明该模型能较好地模拟高度恶性 TC 的分子特征。基于以上研究,本研究通过 Tet-on 系统构建了诱导型过表达 BRAF^{V600E} 的 Nthy 细胞系(Nthy-BRAF^{V600E} Teton)。该模型可通过调控 BRAF/MAPK 信号通路的激活程度,动态模拟 TC 从分化到失分化的转变过程,为深入研究 TBX3 在 TC 失分化中的调控作用提供了独特的体外人源失分化模型。结果表明,伴随着 BRAF/MAPK 信号通路的持续性激活,TBX3 的表达水平逐渐升高,细胞增殖能力也明显增强。并且在 Tbx3 显著升高的前提下,分化相关基因 TG、PAX8 以及 FOXE1 的 mRNA 水平均有所下调。

该体外失分化癌模型不仅验证了小鼠模型的结果, 更在人源细胞水平证实了 TBX3 在失分化中的调控作用。

TBX3 作为 T-box 转录家族的一员, 在胚胎发育以及肿瘤发生过程中都发挥着重要的功能。研究表明, TBX3 能够通过调控细胞增殖、分化、组织完整性以及上皮-间质转化(EMT)等过程, 影响多种生理和病理进程^[12,23]。近年来, 关于 TBX3 在肿瘤中的研究逐渐增多。例如, 在肝癌患者样本中, TBX3 的表达与组织学分级、肿瘤大小和癌细胞转移呈正相关^[24]。在黑色素细胞中, BRAF^{V600E} 能够诱导 TBX3 的高表达, 而 TBX3 的高表达有效抑制了黑色素细胞和黑色素瘤细胞中 E-钙黏蛋白的表达^[23]。并且在一项针对 189 个队列和 178 例患者的综合研究发现, TBX3 可以作为低分化型黑色素瘤的标志物^[25]。然而, TBX3 在 ATC 失分化中的功能尚不清楚。

在这项研究中, 笔者证明了 TBX3 是介导 ATC 失分化的关键转录因子。TBX3 在 BRAF^{V600E} 突变的 ATC 细胞系中高表达, 敲低 TBX3 后, 分化相关基因(如 NIS、TPO、PAX8) 的表达显著上调, 表明抑制 TBX3 可促进 ATC 的再分化。

鉴于 TC 的失分化往往与干性获得相关, 并且这种干性可能直接源自恶性甲状腺上皮细胞的转化^[26], 因此本研究进一步探讨了 TBX3 对细胞迁移和干性的影响。结果表明, 敲低 TBX3 显著抑制了细胞的迁移和成球能力, 说明 TBX3 的表达水平能够影响 ATC 细胞的侵袭性和干细胞样特性。

综上所述, 本研究利用原位自发 mPTC 小鼠模型以及体外 ATC 细胞系证实, TBX3 表达水平与 TC 失分化程度呈正相关, 敲低 TBX3 能够促进 ATC 再分化, 并显著抑制 TC 细胞迁移以及干性获得。这些发现为 BRAF^{V600E} 突变所导致的 ATC 患者的治疗提供了新思路: 相较于 MAPK 抑制剂易耐药的问题, 靶向下游效应分子 TBX3 可能更持久地恢复癌细胞分化状态, 甚至逆转碘抵抗, 成为临床上逆转 TC 失分化的一种策略。并且 TBX3 的表达水平或许可以辅助鉴别高风险 ATC 患者, 为其早期诊断、预后评估及个体化治疗策略的制定提供新的分子依据。然而, 由于临床上 ATC 患者的背景较为复杂, 除 BRAF^{V600E} 突变外, 还常伴有 TERT 启动子突变、PI3K/AKT 通路异常等高频突变以及复杂的肿瘤微环境。因此, TBX3 在 TC 失分化中的具体调控机制仍需更深入的探索。

参考文献:

- [1] COLOMBO C, MINNA E, GARGIULI C, et al. The molecular and gene/miRNA expression profiles of radioiodine resistant papillary thyroid cancer[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 1-14.
- [2] YUAN J, GUO Y. Targeted therapy for anaplastic thyroid carcinoma: advances and management[J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 15(1): 1-21.
- [3] BIBLE K C, KEBEBEW E, BRIERLEY J, et al. 2021 American Thyroid Association guidelines for management of patients with anaplastic thyroid cancer[J]. *Thyroid*, 2021, 31(3): 337-386.
- [4] MOLINARO E, ROMEI C, BIAGINI A, et al. Anaplastic thyroid carcinoma: from clinicopathology to genetics and advanced therapies[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2017, 13(11): 644-660.
- [5] FALLAHI P, FERRARI S M, GALDIERO M R, et al. Molecular targets of tyrosine kinase inhibitors in thyroid cancer[J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 79: 180-196.
- [6] FUGAZZOLA L, ELISEI R, FUHRER D, et al. 2019 European Thyroid Association guidelines for the treatment and follow-up of advanced radioiodine-refractory thyroid cancer[J]. *Eur Thyroid J*, 2019, 8(5): 227-245.
- [7] OH J M, AHN B C. Molecular mechanisms of radioactive iodine refractoriness in differentiated thyroid cancer: impaired sodium iodide symporter (NIS) expression owing to altered signaling pathway activity and intracellular localization of NIS[J]. *Theranostics*, 2021, 11(13): 6251-6277.
- [8] VOLANTE M, LAM A K, PAPOTTI M, et al. Molecular pathology of poorly differentiated and anaplastic thyroid cancer: what do pathologists need to know?[J]. *Endocr Pathol*, 2021, 32(1): 63-76.
- [9] SMITH N, NUCERA C. Personalized therapy in patients with anaplastic thyroid cancer: targeting genetic and epigenetic alterations[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015, 100(1): 35-42.
- [10] PRIANTTI J N, RODRIGUES NMV, DE MORAES FCA, et al. Efficacy and safety of BRAF/MEK inhibitors in BRAFV600E-mutated anaplastic thyroid cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. *Endocrine*, 2024, 86(1): 284-292.
- [11] ELIA G, PATRIZIO A, RAGUSA F, et al. Molecular features of aggressive thyroid cancer[J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 1-10.
- [12] DONG L, LYU X, FALETI O D, et al. The special stemness functions of Tbx3 in stem cells and cancer development[J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, 57: 105-110.
- [13] KRSTIC M, KOLENDOWSKI B, CECCHINI M J, et al. TBX3 promotes progression of pre-invasive breast cancer cells by inducing EMT and directly up-regulating SLUG[J]. *J Pathol*, 2019, 248(2): 191-203.
- [14] ZIMMERLI D, BORRELLI C, JAUREGI-MIGUEL A, et al. TBX3 acts as tissue-specific component of the Wnt/ β -catenin transcriptional complex[J]. *Elife*, 2020, 9: 1-17.
- [15] LI X, RUAN X, ZHANG P, et al. TBX3 promotes proliferation of papillary thyroid carcinoma cells through facilitating PRC2-mediated p57KIP2 repression[J]. *Oncogene*, 2018, 37(21): 2773-2792.
- [16] ZHANG P, GUAN H, YUAN S, et al. Targeting myeloid derived

- suppressor cells reverts immune suppression and sensitizes BRAF-mutant papillary thyroid cancer to MAPK inhibitors[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 1-18.
- [17] ZHANG Z, WU Y, FU J, et al. Proteostatic reactivation of the developmental transcription factor TBX3 drives BRAF/MAPK-mediated tumorigenesis[J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 1-18.
- [18] DERWAHL M. Linking stem cells to thyroid cancer[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, 96(3): 610-613.
- [19] RIESCO-EIZAGUIRREG, GUTIÉRREZ-MARTÍNEZP, GARCÍA-CABEZAS M A, et al. The oncogene BRAF V600E is associated with a high risk of recurrence and less differentiated papillary thyroid carcinoma due to the impairment of Na⁺/I⁻ targeting to the membrane[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2006, 13(1): 257-269.
- [20] SAQCENA M, LEANDRO-GARCIA L J, MAAG J L V, et al. SWI/SNF complex mutations promote thyroid tumor progression and insensitivity to redifferentiation therapies[J]. *Cancer Discov*, 2021, 11(5): 1158-1175.
- [21] CRISPO F, NOTARANGELO T, PIETRAFESA M, et al. BRAF inhibitors in thyroid cancer: clinical impact, mechanisms of resistance and future perspectives[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(9): 1-14.
- [22] KIM M, KIM S J, XU Z, et al. BRAFV600E transduction of an SV40-immortalized normal human thyroid cell line induces dedifferentiated thyroid carcinogenesis in a mouse xenograft model[J]. *Thyroid*, 2020, 30(4): 487-500.
- [23] BOYD S C, MIJATOV B, PUPO G M, et al. Oncogenic B-RAF^{V600E} signaling induces the T-box3 transcriptional repressor to repress E-cadherin and enhance melanoma cell invasion[J]. *J Invest Dermatol*, 2013, 133(5): 1269-1277.
- [24] LI Z, WANG Y, DUAN S, et al. Expression of TBX3 in hepatocellular carcinoma and its clinical implication[J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 9324-9333.
- [25] FREEMAN S S, SADE-FELDMAN M, KIM J, et al. Combined tumor and immune signals from genomes or transcriptomes predict outcomes of checkpoint inhibition in melanoma[J]. *Cell Rep Med*, 2022, 3(2): 1-13.
- [26] PAN Z, LU X, XU T, et al. Epigenetic inhibition of CTCF by HNI promotes dedifferentiation and stemness of anaplastic thyroid cancer[J]. *Cancer Lett*, 2024, 580: 1-13.

(2025-05-14 收稿)

(上接第 13 页)

- [14] KIRTONIA A, ASHRAFIZADEH M, ZARRABI A, et al. Long noncoding RNAs: a novel insight in the leukemogenesis and drug resistance in acute myeloid leukemia[J]. *J Cell Physiol*, 2022, 237(1): 450-465.
- [15] LI R, WU S, WU X, et al. Immune-related lncRNAs can predict the prognosis of acute myeloid leukemia[J]. *Cancer Med*, 2022, 11(3): 888-899.
- [16] LI M L, WANG Y, XU Y N, et al. Overexpression of lncRNA-HOTAIR promotes chemoresistance in acute leukemia cells[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2020, 13(12): 3044-3051.
- [17] FENG Y, HU S, LI L, et al. Long noncoding RNA HOXA-AS2 functions as an oncogene by binding to EZH2 and suppressing LATS2 in acute myeloid leukemia (AML)[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(12): 1025.
- [18] DÍAZ-BEYÁ M, BRUNET S, NOMDEDÉU J, et al. The lincRNA HOTAIRM1, located in the HOXA genomic region, is expressed in acute myeloid leukemia, impacts prognosis in patients in the intermediate-risk cytogenetic category, and is associated with a distinctive microRNA signature[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(31): 31613-31627.
- [19] CHEN L, HU N, WANG C, et al. HOTAIRM1 knockdown enhances cytarabine-induced cytotoxicity by suppression of glycolysis through the Wnt/beta-catenin/PFKF pathway in acute myeloid leukemia cells[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2020, 680: 108244.
- [20] DÍAZ-RAMOS A, ROIG-BORRELLAS A, GARCÍA-MELERO A, et al. α -Enolase, a multifunctional protein; its role on pathological situations[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 2012(1): 156795.
- [21] LI Y, LIU L, LI B. Role of ENO1 and its targeted therapy in tumors[J]. *J Transl Med*, 2024, 22(1): 1025.
- [22] XU W, YANG W, WU C, et al. Enolase 1 correlated with cancer progression and immune-infiltrating in multiple cancer types: a pan-cancer analysis[J]. *Front Oncol*, 2021, 10: 593706.
- [23] HANDSCHUH L, KAMIERCZAK M, MILEWSKI M C, et al. Gene expression profiling of acute myeloid leukemia samples from adult patients with AML-M1 and -M2 through boutique microarrays, real-time PCR and droplet digital PCR[J]. *Int J Oncol*, 2018, 52(3): 656-678.
- [24] ZHANG W, LIU B, WU S, et al. TMT-based comprehensive proteomic profiling identifies serum prognostic signatures of acute myeloid leukemia[J]. *Open Med*, 2023, 18(1): 20220602.
- [25] TIAN Y, GUO J, MAO L, et al. Single-cell dissection reveals promotive role of ENO1 in leukemia stem cell self-renewal and chemoresistance in acute myeloid leukemia[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2024, 15(1): 347.
- [26] ZHANG G, ZHAO X, LIU W. NEDD4L inhibits glycolysis and proliferation of cancer cells in oral squamous cell carcinoma by inducing ENO1 ubiquitination and degradation[J]. *Cancer Biol Ther*, 2022, 23(1): 243-253.
- [27] ZHANG M, ZHANG Z, TIAN X, et al. NEDD4L in human tumors: regulatory mechanisms and dual effects on anti-tumor and pro-tumor[J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1291773.
- [28] CHU M, ZHANG L, YUAN Q, et al. Distinct associations of NEDD4L expression with genetic abnormalities and prognosis in acute myeloid leukemia[J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21: 1-12.

(2025-03-29 收稿)