

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2025.04.008

lncRNA EBLN3P 调节 miR-369-3p/CCND1 轴对甲状腺癌 B-CPAP 细胞增殖、迁移和 EMT 进程的影响

赵方腾, 孙琪, 钱永(海南医科大学附属海南省肿瘤医院 头颈外科, 海南 海口 570000)

[摘要] **目的:** 探究长链非编码 RNA (lncRNA) 内源性博尔纳病毒样核蛋白 3 假基因 (EBLN3P) 调控 miR-369-3p/CCND1 轴对甲状腺癌 B-CPAP 细胞增殖、迁移和 EMT 进程的影响。**方法:** 收集 2020 年 5 月至 2021 年 5 月间在海南省肿瘤医院手术切除的 20 例甲状腺癌及相应癌旁组织标本, 以及甲状腺癌 B-CPAP 细胞, qPCR 法和 WB 法检测癌组织和细胞中 EBLN3P、miR-369-3p、CCND1 mRNA 水平, 双萤光素酶报告基因实验验证 lncRNA EBLN3P、CCND1 与 miR-369-3p 之间的靶向关系。随机将 B-CPAP 细胞分为对照组、sh-NC 组、sh-EBLN3P 组、sh-EBLN3P + anti-NC 组、sh-EBLN3P + anti-miR-369-3p 组, 通过克隆形成实验、划痕愈合实验、Transwell 实验分别检测各组细胞的增殖和迁移能力, WB 法检测各组细胞中 EMT 相关蛋白的表达。构建 B-CPAP 细胞裸鼠移植瘤模型, 观察沉默 EBLN3P 对移植瘤生长的影响。**结果:** 在甲状腺癌组织和 B-CPAP 细胞中 EBLN3P、CCND1 mRNA 表达上调, miR-369-3p 表达下调 (均 $P < 0.05$); EBLN3P 与 miR-369-3p、CCND1 与 miR-369-3p 之间有结合位点, 存在靶向关系。与 sh-NC 组比较, sh-EBLN3P 组克隆形成数、划痕愈合率、细胞迁移数降低 (均 $P < 0.05$), EBLN3P、CCND1、Ki67、MMP-2、N-cadherin、vimentin 表达下调, miR-369-3p、E-cadherin 表达上调 (均 $P < 0.05$); 与 sh-EBLN3P + anti-NC 组比较, sh-EBLN3P + anti-miR-369-3p 组 miR-369-3p 表达下调, 克隆形成数、划痕愈合率、细胞迁移数均升高 (均 $P < 0.05$), CCND1、Ki67、MMP-2、N-cadherin、vimentin 表达均上调, E-cadherin 表达下调 (均 $P < 0.05$)。与 sh-NC 组比较, sh-EBLN3P 组 B-CPAP 细胞裸鼠移植瘤的体积和质量均显著降低 (均 $P < 0.05$)。**结论:** 在甲状腺癌组织和 B-CPAP 细胞中 lncRNA EBLN3P 表达上调, 沉默 EBLN3P 可靶向调控 miR-369-3p/CCND1 轴抑制甲状腺癌 B-CPAP 细胞的增殖、迁移、EMT 进程。

[关键词] 甲状腺癌; B-CPAP 细胞; 长链非编码 RNA; 内源性博尔纳病毒样核蛋白 3 假基因; miR-369-3p; 细胞周期蛋白 D1; 增殖; 迁移; 上皮间质转化

[中图分类号] R736.1; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2025)04-0398-07

The effects of lncRNA EBLN3P on the proliferation, migration and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of thyroid cancer B-CPAP cells by regulating the miR-369-3p/CCND1 axis

ZHAO Fangteng, SUN Qi, QIAN Yong (Department of Head and Neck Surgery, Hainan Cancer Hospital, Hainan Medical University, Haikou 570000, Hainan, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of long non-coding RNA (lncRNA) endogenous Bornavirus-like nucleoprotein 3 pseudogene (EBLN3P) on the proliferation, migration and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of thyroid cancer B-CPAP cells by regulating the miR-369-3p/CCND1 axis. **Methods:** 20 samples of thyroid cancer and corresponding adjacent tissue specimens surgically removed at Hainan Cancer Hospital between May 2020 and May 2021, as well as thyroid cancer B-CPAP cells were collected. The levels of EBLN3P, miR-369-3p and CCND1 mRNA in cancer tissues and cells were detected using qPCR and Western blot (WB) methods. The dual-luciferase reporter gene assay was used to validate the targeting relationship among lncRNA EBLN3P, CCND1 and miR-369-3p. B-CPAP cells were randomly divided into the control group, sh-NC group, sh-EBLN3P group, sh-EBLN3P + anti-NC group and sh-EBLN3P + anti-miR-369-3p group. The colony formation assay was used to detect the number of colony formation in each group. The scratch wound healing assay and Transwell assay were performed to evaluate cell migration ability. WB was used to detect the expression of EMT-related proteins. The nude mouse xenograft model of B-CPAP cells was constructed to observe the effect of silencing EBLN3P on the growth of xenograft tumors. **Results:** The expressions of lncRNA EBLN3P and CCND1

[基金项目] 海南省自然科学基金高层次人才项目 (No. 821RC723)

[作者简介] 赵方腾 (1990—), 女, 学士, 主治医师, 主要从事甲状腺癌的临床研究

[通信作者] 钱永 (扫码获取作者联系方式)



mRNA were up-regulated, and the expression of miR-369-3p was down-regulated in thyroid cancer tissues and B-CPAP cells (all $P < 0.05$). lncRNA EBLN3P had binding sites with miR-369-3p, and CCND1 had binding sites with miR-369-3p, and there was a targeting relationship. Compared with those in the sh-NC group, the number of clone formation, the scratch healing rate and the number of cell migration in the sh-EBLN3P group decreased (all $P < 0.05$); the expressions of EBLN3P, CCND1, Ki67, MMP-2, N-cadherin and vimentin was down-regulated; the expressions of miR-369-3p and E-cadherin was up-regulated (all $P < 0.05$). Compared with those in the sh-EBLN3P + anti-NC group, the expression of miR-369-3p in the sh-EBLN3P + anti-miR-369-3p group was down-regulated; the number of clone formation, scratch healing rate and the number of cell migration increased (all $P < 0.05$); the expressions of CCND1, Ki67, MMP-2, N-cadherin and vimentin was up-regulated; the expression of E-cadherin was down-regulated (all $P < 0.05$). Compared with those in the sh-NC group, the volume and weight of B-CPAP cell nude mouse xenograft tumors in the sh-EBLN3P group were significantly reduced (both $P < 0.05$). **Conclusion:** The expression of lncRNA EBLN3P is up-regulated in thyroid cancer cells and tissues. Silencing EBLN3P can inhibit the proliferation, migration and EMT of thyroid cancer B-CPAP cells by targeting and regulating the miR-369-3p/CCND1 axis.

[Key words] thyroid cancer; B-CPAP cell; long non-coding RNA (lncRNA); endogenous Bornavirus-like nucleoprotein 3 pseudogene (EBLN3P); miR-369-3p; cyclin D1 (CCND1); proliferation; migration; epithelial-mesenchymal transition (EMT)

[Chin J Cancer Biother, 2025, 32(4): 398-404. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.04.008]

甲状腺癌的发病率约为 5%, 约占全身性恶性肿瘤发病率的 1%, 其发病率呈逐年上升^[1]。多数甲状腺癌是可以治愈的, 但晚期甲状腺癌患者的病死率较高^[2]。甲状腺癌的预后良好, 但约 5% 患者会出现转移, 目前缺乏特异性和有效的治疗方法。进一步探索治疗靶点有助于提升甲状腺癌患者的治疗效果^[3]。长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 已被证明参与许多生物学过程, 其异常表达可导致癌症等多种疾病进展^[4]。据报道^[5], lncRNA 内源性博尔纳病毒样核蛋白 3 假基因 (endogenous Bornavirus-like nucleoprotein 3 pseudogene, EBLN3P) 在结肠癌组织和细胞中表达上调, 促进癌细胞增殖和转移, 同时抑制细胞凋亡。EBLN3P 在甲状腺癌中的作用机制尚需深入研究。研究^[6]显示, miR-369-3p 在多种癌症中起肿瘤抑制作用。上调 miR-369-3p 表达可降低甲状腺癌细胞增殖和迁移能力^[7]。细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1, CCND1) 通过结合并激活 CDK4/6, 其异常表达导致细胞周期紊乱和功能障碍^[8]。CCND1 在甲状腺癌组织和细胞中表达上调, lncRNA NR2F1-AS1 通过靶向 miRNA-338-3p 上调 CCND1 表达促进甲状腺癌进展^[9]。前期研究发现, EBLN3P、CCND1、miR-369-3p 三者间存在潜在的结合位点。因此, 本研究初步探究在甲状腺癌中 EBLN3P 是否通过调控 miR-369-3p/CCND1 轴影响癌细胞的增殖、迁移、上皮间质转化 (EMT) 过程的作用机制。

1 材料与方法

1.1 临床标本、细胞、实验动物及主要试剂

收集 2020 年 5 月至 2021 年 5 月间在海南省肿瘤医院头颈外科手术切除治疗的 22 例甲状腺癌患者的癌组织及癌旁组织标本, 其中男 6 例, 女 16 例, 年龄

45~65 岁, 液氮保存。本研究符合医院伦理委员会审批要求 (审批号: 20191285), 术前均告知患者并签署知情同意书, 患者术前均未接受治疗, 组织标本通过病理学检测确诊为甲状腺癌。

雄性、(14.36 ± 0.53) g 的 BALB/C 小鼠购自湖北贝恩特生物科技有限公司, 许可证号: SCXK (鄂) 2021-0027。本研究已通过本院实验动物伦理审核批准 (审批号: 20230114)。

人甲状腺癌 B-CPAP 细胞 (YB-70575) 购于上海钰博生物公司, 人甲状腺上皮细胞 Nthyori3-1 (HTX1902) 购于华拓生物公司。短发卡 RNA 阴性对照 (sh-NC)、沉默 lncRNA EBLN3P 的 sh-RNA (sh-lncRNA EBLN3P)、miRNA 抑制剂阴性对照 (anti-NC)、miR-369-3p 抑制剂 (anti-miR-369-3p)、过表达阴性对照 (miR-NC)、CCND1 质粒均购于上海生工生物公司, 用于 qPCR 分析的 mRNA 引物 EBLN3P、miR-369-3p、CCND1、U6、GAPDH 引物均购于擎科生物公司, 双荧光素酶试剂盒 (RG088M)、双荧光素酶报告基因载体购于碧云天公司, 兔抗 CCND1 (MA5-14512)、Ki67 (MA5-14520)、MMP-2 (PA5-115583)、E-cadherin (MA5-14458)、N-cadherin (PA5-19486)、vimentin (PA5-27231) 抗体均购于赛默飞公司, HRP 标记的山羊抗兔 IgG (CSB-PA001501GA01RB) 抗体购自武汉华美生物工程有限公司。

1.2 细胞培养及分组转染

将 B-CPAP 与 Nthyori3-1 细胞移至常规环境中培养 48 h, 提取总 RNA, 检测细胞中 EBLN3P、miR-369-3p 和 CCND1 水平。

将对数生长期的 B-CPAP 细胞随机分为对照组、sh-NC 组、sh-EBLN3P 组、sh-EBLN3P + anti-NC 组、sh-EBLN3P + anti-miR-369-3p 组, 除对照组外, 其余各组细胞转染与其对应的质粒, 培养 48 h 后, 进行后

续实验。

1.3 qPCR法检测甲状腺癌组织和细胞中EBLN3P、miR-369-3p、CCND1 mRNA表达水平

提取甲状腺癌组织和各组细胞总RNA, 逆转录扩增为cDNA, 进行qPCR反应。引物序列: EBLN3P上游引物为5'-CAGACTAAAGGATCAAGCGAGA-3', 下游引物为5'-ATCAATTGCCACAGGTTGAAGA-3'; miR-369-3p上游引物为5'-CTCCTGGTACCTGAAGGGAAGA-3', 下游引物为5'-CTCCAAGGTGAGATTGTACTGA-3'; U6上游引物为5'-ATGGTCTTTTCTGATTAGCC-3', 下游引物为5'-GATTTCGCTCAAGACGTCGA-3'; CCND1上游引物为5'-ACTTCGAGCGGACGTGCTA-3', 下游引物为5'-CTCGCGGCTCGCGCGCAGCGA-3'; GAPDH上游引物为5'-GTCTCCTCTGAC TTCAACAGCG-3', 下游引物为5'-ACCACCTGTGCTGTAGCCAA-3'。qPCR反应条件: 95℃预变性2 min; 95℃30 s, 60℃退火30 s, 72℃延伸30 s, 共40个循环。以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算EBLN3P、miR-369-3p、CCND1 mRNA的相对表达水平。

1.4 双萤光素酶报告基因实验验证EBLN3P与miR-369-3p、CCND1与miR-369-3p之间的靶向关系

利用Starbase数据库在线预测分析EBLN3P、CCND1分别与miR-369-3p之间的结合位点。根据萤光素酶与底物结合发生化学发光反应, 将基因克隆至萤光素酶基因上游, 构建萤光素酶报告质粒, 通过检测萤光素酶活性判断对目的基因的影响。构建EBLN3P和CCND1野生型(WT)和突变型(MUT)载体, 相应克隆到萤光素酶载体上, 与miR-NC、miR-369-3p mimic共转染B-CPAP细胞, 培养48 h后, 检测细胞的萤光素酶活性。

1.5 克隆形成实验检测B-CPAP细胞的增殖能力

转染完成的B-CPAP细胞以200个/孔接种在6孔板中, 培养14 d至细胞出现克隆, 终止培养。PBS清洗, 加甲醇固定, 结晶紫染色后, 于光学显微镜下拍照, Image J软件统计克隆形成数^[10]。

1.6 划痕愈合实验检测B-CPAP细胞的划痕愈合率

将转染后的B-CPAP细胞以 2×10^5 个/孔的密度接种于6孔板中, 待细胞贴壁生长到80%~90%汇合度时, 使用移液器吸头尖端垂直于细胞表面, 沿孔板方向均匀划痕, 移除划痕后的细胞碎片。加入FBS培养基中继续培养, 并在0和24 h分别拍摄划痕区域的图像, 在显微镜下观察, 计算划痕愈合率^[11]。细胞划痕愈合率 = (划痕面积0 h - 划痕面积24 h) / 划痕面积0 h $\times 100\%$ 。

1.7 Transwell小室实验检测B-CPAP细胞的迁移能力

将200 μ L密度为 2×10^5 个/mL的细胞悬液加入

Transwell小室的上室中, 下室中加入500 μ L含10% FBS的培养基。培养12 h后, 用4%多聚甲醛溶液固定细胞20 min, 然后用结晶紫溶液染色20 min。最后, 在光学显微镜下观察并计数穿膜细胞数^[12]。

1.8 WB法检测B-CPAP细胞中CCND1、Ki67、MMP-2、N-cadherin、vimentin和E-cadherin表达水平

常规RIPA法提取各组B-CPAP细胞蛋白, 取蛋白上样电泳, 浓缩胶80 V, 分离胶120 V, 20 min电泳, 转膜1 h, 封闭1 h后加入稀释比例均为1:2 000的CCND1、Ki67、MMP-2、N-cadherin、vimentin、E-cadherin一抗, 4℃过夜培养。洗涤后, 在HRP标记的山羊抗兔IgG二抗(稀释比例为1:5 000)中室温作用2 h, ECL法显色, 利用Image J软件分析蛋白质条带的灰度值。

1.9 B-CPAP细胞裸鼠移植瘤模型的构建与观察

选取BALB/C小鼠, 将密度为 1×10^7 /mL的sh-NC组和sh-EBLN3PB组B-CPAP细胞悬液注射于小鼠右前肢腋部皮下, 每只注射200 μ L。实验分为sh-NC和sh-EBLN3P组, 每组6只。至35 d时麻醉后处死小鼠, 分离皮下移植瘤, 称质量并测量大小, 按照公式“ $V = a \times b^2 / 2$ ”计算移植瘤体积。

1.10 统计学处理

qPCR、克隆形成、划痕愈合、Transwell小室、WB等实验均独立重复6次。用SPSS 25.0软件分析实验数据。符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间差异比较采用独立样本 t 检验, 多组间差异比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 甲状腺癌组织和细胞中EBLN3P、miR-369-3p、CCND1 mRNA的表达

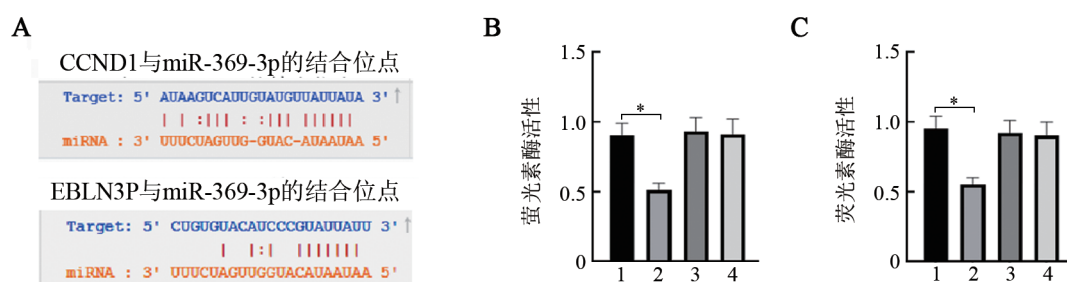
qPCR法检测结果发现, 与癌旁组织比较, 甲状腺癌组织中EBLN3P(1.23 ± 0.10 vs 0.78 ± 0.07)、CCND1 mRNA(1.19 ± 0.16 vs 0.81 ± 0.08)表达水平显著升高(均 $P < 0.05$), miR-369-3p表达显著降低(0.70 ± 0.07 vs 1.14 ± 0.12 , $P < 0.05$); 与甲状腺上皮细胞相比, 甲状腺癌B-CPAP细胞中EBLN3P、CCND1 mRNA表达均显著升高(1.26 ± 0.17 vs 0.73 ± 0.07 , 1.22 ± 0.14 vs 0.74 ± 0.07 , 均 $P < 0.05$), miR-369-3p表达显著下降(0.76 ± 0.07 vs 1.11 ± 0.10 , $P < 0.05$)。结果表明, EBLN3P、CCND1 mRNA在甲状腺癌组织和细胞中呈高表达、miR-369-3p呈低表达。

2.2 EBLN3P、CCND1靶向结合miR-369-3p

通过Starbase数据库预测结果(图1A)显示,

EBLN3P、CCND1 的 3'-UTR 均能与 miR-369-3p 竞争性结合。双荧光素酶报告基因检测结果(图 1B、C)显示,与 EBLN3P-WT + miR-NC 组相比,EBLN3P-WT + miR-369-3p mimic 组细胞荧光素酶活

性显著降低($P < 0.05$);与 CCND1-WT + miR-NC 组相比,CCND1-WT + miR-369-3p mimic 组荧光素酶活性显著下降($P < 0.05$)。结果表明,EBLN3P、CCND1 分别与 miR-369-3p 存在靶向结合关系。



B 图 1:EBLN3P-WT + miR-NC 组,2:EBLN3P-WT + miR-369-3p mimic 组,3:EBLN3P-MUT + miR-NC 组,4:EBLN3P-MUT + miR-369-3p mimic 组;C 图 1:CCND1-WT + miR-NC 组,2:CCND1-WT + miR-369-3p mimic 组,3:CCND1-MUT + miR-NC 组,4:CCND1-MUT + miR-369-3p mimic 组。

A:数据库预测 EBLN3P、CCND1 与 miR-369-3p 结合位点;B、C:双荧光素酶报告基因实验检测 EBLN3P(B)和 CCND1(C)与 miR-369-3p 之间的靶向关系。* $P < 0.05$ 。

图1 EBLN3P、CCND1 分别靶向结合 miR-369-3p

2.3 沉默 EBLN3P 降低 EBLN3P 和 CCND1、升高 miR-369-3p 表达水平

qPCR 法检测结果(图 2A)显示,与 sh-NC 组比较,sh-EBLN3P 组 B-CPAP 细胞中 EBLN3P、CCND1 mRNA 表达均显著降低,miR-369-3p 表达显著升高(均 $P < 0.05$);与 sh-EBLN3P + anti-NC 组比较,sh-EBLN3P + anti-miR-369-3p 组 miR-369-3p 表达显著降低($P < 0.05$),CCND1 表达显著升高($P < 0.05$)。

WB 实验结果(图 2B)印证了 qPCR 检测结果,即沉默 EBLN3P 显著降低 B-CPAP 细胞中 CCND1 表达($P < 0.05$),而同时使用 anti-miR-369-3p 则升高 CCND1 表达水平($P < 0.05$)。

2.4 沉默 EBLN3P 通过调控 miR-369-3p 抑制 B-CPAP 细胞的增殖及迁移能力

平板克隆实验、划痕愈合实验和 Transwell 小室实验结果(图 2C、D、E)显示,与 sh-NC 组相比,sh-EBLN3P 组 B-CPAP 细胞克隆形成数、划痕愈合率和细胞迁移数均显著降低(均 $P < 0.05$);与 sh-EBLN3P + anti-NC 组相比,sh-EBLN3P + anti-miR-369-3p 组细胞克隆形成数、划痕愈合率、细胞迁移数均显著升高(均 $P < 0.05$)。实验结果表明,沉默 EBLN3P 降低 B-CPAP 细胞的增殖及迁移能力,而同时使用 anti-miR-369-3p 则逆转沉默 EBLN3P 对细胞增殖及迁移的抑制作用。

2.5 沉默 EBLN3P 通过调控 miR-369-3p 抑制细胞迁移、侵袭和 EMT 相关蛋白的表达

WB 实验结果(图 2F)显示,与 sh-NC 组相比,

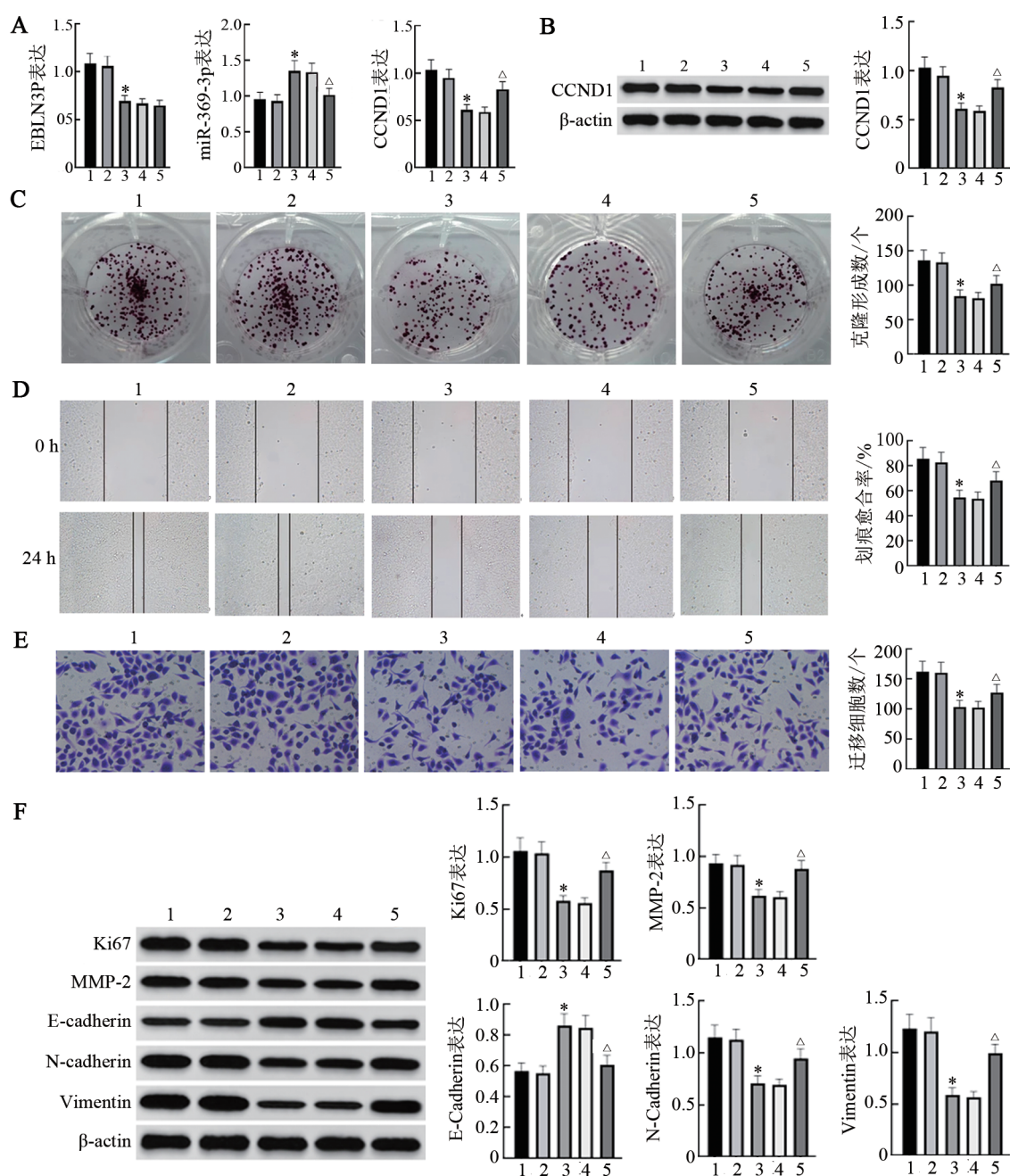
sh-EBLN3P 组 B-CPAP 细胞中 Ki67、MMP-2、N-cadherin、vimentin 表达均显著下调(均 $P < 0.05$),E-cadherin 表达上调($P < 0.05$);与 sh-EBLN3P + anti-NC 组相比,sh-EBLN3P + anti-miR-369-3p 组细胞 Ki67、MMP-2、N-cadherin、vimentin 表达均显著上调(均 $P < 0.05$),E-cadherin 表达显著下调($P < 0.05$)。结果表明,沉默 EBLN3P 抑制 B-CPAP 细胞增殖、迁移能力和 EMT 进程,而同时使用 anti-miR-369-3p 则逆转沉默 EBLN3P 对细胞增殖、迁移及 EMT 进程的抑制作用。

2.6 沉默 EBLN3P 可抑制 B-CPAP 细胞裸鼠移植瘤的生长

成功构建 B-CPAP 细胞裸鼠移植瘤模型。实验结果(图 3)显示,与 sh-NC 组相比,sh-EBLN3P 组裸鼠移植瘤生长缓慢,移植瘤体积和质量均显著下降(均 $P < 0.05$)。结果表明,沉默 EBLN3P 显著抑制 B-CPAP 细胞裸鼠移植瘤的生长。

3 讨论

甲状腺癌是一种复杂且异质性较高的恶性肿瘤,该病的发病率及病死率呈逐年上升趋势^[14]。虽然,大多数甲状腺癌是良性增生性肿瘤,为早期高分化甲状腺癌,其预后良好;但一些低分化甲状腺癌患者死于肿瘤的长期进展^[15]。局限性甲状腺癌通常可以通过手术治愈,但转移性甲状腺癌患者的治疗选择有限,其发病率有所增加^[16]。因此,探明甲状腺癌发病机制和治疗靶点的分子机制具有重要意义。



1: 对照组; 2: sh-NC 组; 3: sh-EBLN3P 组; 4: sh-EBLN3P + anti-NC 组; 5: sh-EBLN3P + anti-miR-369-3p 组。

A: qPCR 法检测 B-CPAP 细胞中 EBLN3P、CCND1 和 miR-369-3p 表达; B: WB 法检测 B-CPAP 细胞中 CCND1 表达; C: 克隆形成实验检测 B-CPAP 细胞的克隆形成数; D: 划痕愈合实验检测 B-CPAP 细胞的划痕愈合率; E: Transwell 小室实验检测 B-CPAP 细胞的迁移能力(结晶紫染色, $\times 200$); F: WB 法检测 B-CPAP 细胞中 Ki67、MMP-2、E-cadherin、N-cadherin 和 vimentin 的蛋白表达水平。

与 sh-NC 组相比, $^*P < 0.05$; 与 sh-EBLN3P + anti-NC 组相比, $^{\Delta}P < 0.05$ 。

图2 沉默 EBLN3P 对 B-CPAP 细胞增殖、迁移及相关蛋白表达的影响

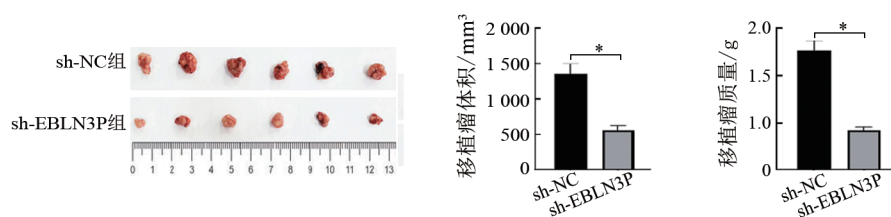


图3 沉默 EBLN3P 抑制荷瘤裸鼠移植瘤的生长

长度超过 200 个碱基的 lncRNA 已被认为是影响肿瘤生长的调节因子。EBLN3P 是新发现的一种位于 9 号染色体上的 lncRNA, 在骨肉瘤、肝癌和结直肠癌等肿瘤组织中高表达, 其表达水平的改变可能会对肿瘤进展产生影响^[17]。LI 等^[18]研究发现, EBLN3P 的过表达或沉默 miR-144-3p 促进肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭。ZOU 等^[19]报道, 沉默 EBLN3P 降低宫颈癌细胞增殖、迁移和侵袭能力, 同时抑制荷瘤小鼠肿瘤的生长, EBLN3P 通过竞争性结合 miR-29c-3p 并与 TATA 结合蛋白相关因子 15 相互作用正向调控染色体浓缩调节蛋白 2 表达, 从而促进宫颈癌细胞的增殖、迁移和侵袭。EMT 对肿瘤细胞中侵袭性表型的发展至关重要, 因此是转移性疾病的标志^[20]。甲状腺肿瘤在浸润性前沿表现为细胞凝聚力丧失, 除了 β -cadherin 和 vimentin 表达升高外, 甲状腺转录因子-1 和 E-cadherin 表达水平降低。侵袭性表型是 EMT 在甲状腺癌中的标志, 也与晚期肿瘤、淋巴结转移和肿瘤复发有关。据报道^[21], 除了在肿瘤侵袭性前沿下调外, E-cadherin 在甲状腺小灶微癌中也高表达。本研究结果与以上文献报道趋势一致, EBLN3P 在甲状腺癌组织及细胞中均呈高表达, 抑制 EBLN3P 表达能够降低甲状腺癌细胞的克隆形成数、划痕愈合率、细胞迁移数, 同时抑制 Ki67、MMP-2、N-cadherin、vimentin 的表达, 上调 E-cadherin 表达, 说明沉默 EBLN3P 能够抑制甲状腺癌细胞增殖、迁移和 EMT 过程。

miRNA 已被证实通过靶向多种肿瘤相关信号通路中的 mRNA 来调节细胞增殖、凋亡、生长、衰老、黏附、侵袭和迁移等细胞过程的关键分子。因此, miRNA 失调导致 mRNA 表达水平的改变会影响肿瘤的发生发展。miRNA 基因被认为是致癌基因和抑癌基因, 其表达与多种癌症有关^[22]。YI 等^[23]研究发现, EGFEM1P 与 miR-369-3p 相互作用, 降低 miR-369-3p 的表达水平, 证明了 miR-369-3p 在甲状腺癌中潜在的抑癌作用。本研究中, miR-369-3p 在甲状腺癌组织和细胞中表达下调, 沉默 EBLN3P 表达能够促进 miR-369-3p 表达, 从而抑制甲状腺癌细胞的增殖、迁移和 EMT 进程。生物信息学分析发现, EBLN3P 与 miR-369-3p 存在靶向关系, 进一步双萤光素酶报告基因实验验证了这一点, 推测 EBLN3P 可能靶向 miR-369-3p 调控甲状腺癌细胞的恶性生物学行为。

细胞周期蛋白依赖性激酶由细胞周期蛋白(如 CCND1)激活, 可促进细胞周期进程。CCND1 在细胞周期通路中表达上调可能在肿瘤进展中起至关重要的作用, 并且可能在甲状腺癌中具有预后意义。CCND1 突变可能通过参与细胞周期途径在甲状腺癌进展中发挥作用^[24]。本研究中, CCND1 与 miR-369-3p 之间存在

靶向关系, 并且在甲状腺癌组织和细胞中 CCND1 表达上调。EBLN3P 可通过抑制 miR-369-3p 表达影响 CCND1 表达, 从而调控甲状腺癌进展。小鼠成瘤实验结果表明, 沉默 EBLN3P 使移植瘤生长速度减缓, 降低移植瘤体积和质量。实验结果说明, lncRNA EBLN3P 能够靶向调控 miR-369-3p/CCND1 通路调节甲状腺癌细胞的增殖、迁移和 EMT 过程。

综上所述, 沉默 lncRNA EBLN3P 可抑制甲状腺癌细胞增殖、迁移和 EMT 过程, 这一调控作用可能是通过 miR-369-3p/CCND1 信号通路实现的。因此, EBLN3P 有望成为甲状腺癌治疗的潜在靶点。然而, 尚未建立完善的动物模型以获取体内实验数据进行验证。因此, 其具体作用机制仍需进一步通过构建动物模型、设计体内实验来深入阐明。

参考文献

- [1] 曹建中, 黄金石, 丁亚亭. 虎杖苷通过 Hippo/YAP 通路影响甲状腺癌 8505C 细胞的恶性生物学行为和顺铂敏感性[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2024, 31(3): 224-230. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2024.03.003.
- [2] HLOZEK J, PEKOVA B, ROTNÁGL J, *et al.* Genetic changes in thyroid cancers and the importance of their preoperative detection in relation to the general treatment and determination of the extent of surgical intervention-a review[J/OL]. Biomedicines, 2022, 10(7): 1515[2024-08-30]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35884820/>. DOI:10.3390/biomedicines10071515.
- [3] SU Z X, BAO W Q, YANG G H, *et al.* SOX12 promotes thyroid cancer cell proliferation and invasion by regulating the expression of POU2F1 and POU3F1[J]. Yonsei Med J, 2022, 63(6): 591-600. DOI:10.3349/ymj.2022.63.6.591.
- [4] TANG H Y, HUANG H, GUO Z, *et al.* Heavy ion-responsive lncRNA EBLN3P functions in the radiosensitization of non-small cell lung cancer cells mediated by TNPO1[J/OL]. Cancers, 2023, 15(2): 511[2024-08-30]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36672460/>. DOI:10.3390/cancers15020511.
- [5] WANG X H, YUE Y Z, TAN J H, *et al.* lncRNA EBLN3P accelerates cell proliferation and invasion of colon cancer through modulating the miR-519d-3p/ZFP91 axis[J/OL]. Cancer Biother Radiopharm, 2024, 2024: Online ahead of print[2025-02-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38597324/>. DOI:10.1089/cbr.2022.0089.
- [6] LI Y S, SUN J M, GRANADOS-LÓPEZ A J, *et al.* In vitro study of miRNA-369-3p targeting TCF4 regulating the malignant biological behavior of colon cancer cells[J]. J Gastrointest Oncol, 2023, 14(5): 2124-2133. DOI:10.21037/jgo-23-628.
- [7] 王雪, 鲍敏丽, 姚炳山. miR-369-3p 在山荷叶素调控甲状腺癌细胞增殖、迁移中的作用[J]. 山东医药, 2022, 62(5): 35-38. DOI: 10.3969/j.issn.1002-266X.2022.05.008.
- [8] ZHU D W, HUANG J, LIU N, *et al.* PSMC2/CCND1 axis promotes development of ovarian cancer through regulating cell growth, apoptosis and migration[J/OL]. Cell Death Dis, 2021, 12(8): 730[2024-08-30]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34294689/>. DOI: 10.1038/s41419-021-03981-5.

- [9] GUO F, FU Q F, WANG Y, *et al.* Long non-coding RNA NR2F1-AS1 promoted proliferation and migration yet suppressed apoptosis of thyroid cancer cells through regulating miRNA-338-3p/CCND1 axis[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(9): 5907-5919. DOI: 10.1111/jcmm.14386.
- [10] 袁宁, 王晓娟, 白亚君, 等. lncRNA LINC00958通过靶向miR-490-3p促进甲状腺乳头状癌细胞增殖、侵袭和迁移[J]. 现代肿瘤医学, 2023, 31(10): 1785-1793. DOI:10.3969/j.issn.1672-4992.2023.10.003.
- [11] 王明政, 金妙妙, 宋佳璐, 等. 过表达lncRNA HCG18调控miR-107/CDKN2B轴对甲状腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的机制研究[J]. 广东医学, 2023, 44(3): 312-319. DOI:10.13820/j.cnki.gdyx.20224021.
- [12] 熊玉圆, 王玲, 向高进, 等. lncRNA BLACAT1 靶向结合 miR-29a-3p 调控甲状腺癌细胞 TPC-1 的生物学行为[J]. 现代肿瘤医学, 2021, 29(19): 3355-3362. DOI:10.3969/j.issn.1672-4992.2021.19.007.
- [13] 彭云, 温美玲, 吕云霞, 等. lncRNA DSCAM-AS1 调节 miR-150-5p/BRAF 轴对甲状腺癌细胞恶性生物学行为的影响[J]. 实用医学杂志, 2023, 39(23): 3043-3050. DOI:10.3969/j.issn.1006-5725.2023.23.004.
- [14] GUENTER R, PATEL Z, CHEN H. Notch signaling in thyroid cancer[J]. Adv Exp Med Biol, 2021, 1287: 155-168. DOI:10.1007/978-3-030-55031-8_10.
- [15] AGOSTO SALGADO S, KAYE E R, SARGI Z, *et al.* Management of advanced thyroid cancer: overview, advances, and opportunities [J/OL]. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2023, 43: e389708[2024-08-30]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37186883/>. DOI: 10.1200/EDBK_389708.
- [16] YANG N L, LIANG Y F, YANG P, *et al.* Flurbiprofen inhibits cell proliferation in thyroid cancer through interrupting HIP1R-induced endocytosis of PTEN[J/OL]. Eur J Med Res, 2022, 27(1): 29[2024-08-30]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35209947/>. DOI: 10.1186/s40001-022-00658-3.
- [17] WANG S T, ZENG X X, GUI P, *et al.* lncRNA EBLN3P facilitates osteosarcoma metastasis by enhancing annexin A3 mRNA stability and recruiting HuR[J]. Ann Surg Oncol, 2023, 30(13): 8690-8703. DOI:10.1245/s10434-023-14032-y.
- [18] LI H, WANG M, ZHOU H, *et al.* Long noncoding RNA EBLN3P promotes the progression of liver cancer *via* alteration of microRNA-144-3p/DOCK4 signal[J]. Cancer Manag Res, 2020, 12: 9339-9349. DOI:10.2147/CMAR.S261976.
- [19] ZOU T, GAO Y, QIE M R. Promotive actions of lncRNA EBLN3P involved in cervical cancer progression via interacting with miR-29c-3p and TAF15 to modify RCC2[J/OL]. Arch Biochem Biophys, 2024, 755: 109980[2024-08-30]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38555043/>. DOI:10.1016/j.abb.2024.109980.
- [20] HOLM T M, YEO S, TURNER K M, *et al.* Targeting autophagy in thyroid cancer: EMT, apoptosis, and cancer stem cells[J/OL]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10: 821855[2024-08-30]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35846375/>. DOI:10.3389/fcell.2022.821855.
- [21] VIANA B P P B, GOMES A V P, GIMBA E R P, *et al.* Osteopontin expression in thyroid cancer: deciphering EMT-related molecular mechanisms[J/OL]. Biomedicines, 2021, 9(10): 1372[2024-08-30]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34680488/>. DOI: 10.3390/biomedicines9101372.
- [22] RODRIGUES L, DA CRUZ PAULA A, SOARES P, *et al.* Unraveling the significance of DGCR8 and miRNAs in thyroid carcinoma[J/OL]. Cells, 2024, 13(7): 561[2024-08-30]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38607000/>. DOI:10.3390/cells13070561.
- [23] YI S J, LIU L Q, CHEN Z W. lncRNA EGFEM1P promotes thyroid cancer progression by acting as an miR-369-3p sponge and upregulating TCF4[J/OL]. Oncol Lett, 2022, 24(6): 456[2024-08-30]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36380872/>. DOI: 10.3892/ol.2022.13576.
- [24] XIE K J. A biomarker and molecular mechanism investigation for thyroid cancer[J]. Cent Eur J Immunol, 2023, 48(3): 203-218. DOI: 10.5114/ceji.2023.132163.

[收稿日期] 2024-08-31

[修回日期] 2025-03-24

[本文编辑] 党瑞山