

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.23.006
网络首发 https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210628.1408.002.html(2021-06-28)

KLF4 通过 Wnt 信号通路抑制甲状腺癌细胞 EMT 及侵袭迁移的实验研究^{*}

陈翔,刘利敏,张琰,陈勇,屈悦,徐宙,陆宝华[△]
(上海市宝山区中西医结合医院甲状腺外科 201999)

[摘要] **目的** 探讨 Kruppel 样因子 4(KLF4)对甲状腺癌细胞上皮间质转化(EMT)、侵袭和迁移的影响及机制。**方法** 免疫组织化学(IHC)检测 45 份甲状腺癌标本中 KLF4 的表达情况。常规体外人甲状腺乳头状癌细胞株 KTC1 培养,将其分为空白对照组(不作任何处理)、阴性对照组(转染 LipofectamineTM 2000)、KLF4 过表达组(转染 LipofectamineTM 2000+KLF4)、siRNA-NC 组(转染 LipofectamineTM 2000+ NC-siRNA)和 KLF4-siRNA 组(转染 LipofectamineTM 2000+KLF4-siRNA)。免疫荧光检测细胞中 KLF4 与 β -catenin 的分布和共表达;Transwell 检测癌细胞侵袭和迁移的能力,实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)和 Western blot 检测 EMT 和 Wnt 信号通路相关的基因和蛋白质表达水平。蛋白质免疫共沉淀(Co-IP)检测 KLF4 和 β -catenin 间的互作情况。**结果** 免疫荧光标记显示,KLF4 和 β -catenin 在 KTC1 细胞质中共定位。qRT-PCR 结果显示,KLF4 过表达组上皮型钙黏蛋白(E-cad)mRNA 表达明显高于其他组($P<0.05$),神经型钙黏蛋白(N-cad)和基质金属蛋白酶 7(MMP7) mRNA 表达水平明显低于其他组($P<0.05$);沉默干扰 KLF4 后,与其他组相比,KLF4-siRNA 组中的 E-cad mRNA 明显降低($P<0.05$),N-cad 和 MMP7 mRNA 明显升高($P<0.05$)。Western blot 结果显示,KLF4 过表达组中 E-cad 表达较其他组明显升高($P<0.05$),而 N-cad、MMP7 表达则明显低于其他组($P<0.05$);当沉默干扰 KLF4 时,上皮标志物减少($P<0.05$),间质标志物增加($P<0.05$)。Transwell 结果显示,过表达 KLF4 可以抑制 KTC1 细胞的迁移和侵袭,干扰沉默 KLF4 可增强 KTC1 细胞的迁移和侵袭。Co-IP 结果显示,KLF4 与 β -catenin 之间存在相互作用。KLF4 在甲状腺癌及癌旁组织中的阳性表达率分别为 24.44%(11/45)和 71.11%(32/45),二者比较差异有统计学意义($\chi^2=19.639,P<0.001$)。45 份甲状腺癌标本中,伴淋巴结转移 18 份标本中 KLF4 表达 4 份阳性,而不伴淋巴结转移 27 份标本中,KLF4 表达 15 份阳性,二者比较差异有统计学意义(22.22% vs. 55.56%, $\chi^2=4.919,P=0.027$)。**结论** KLF4 通过 Wnt 信号通路调节相关下游靶基因的表达,从而影响了甲状腺癌的侵袭和迁移能力。

[关键词] 甲状腺癌;Kruppel 样因子 4;上皮间质转化;侵袭;迁移
[中图法分类号] R736.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2021)23-3982-06

Experimental study on inhibition of KLF4 on EMT,invasion and migration of thyroid cancer cells by Wnt signaling pathway^{*}

CHEN Xiang,LIU Liming,ZHANG Yan,CHEN Yong,QU Yue,XU Zhou,LU Baohua[△]
(Department of Thyroid Surgery,Baoshan District Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine,Shanghai 201999,China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect and mechanism of Kruppel like factor 4 (KLF4) on epithelial mesenchymal transition (EMT),invasion and migration of thyroid cancer cells.**Methods** The immunohistochemistry (IHC) was used to detect the KLF4 expression level in 45 thyroid cancer samples. The human thyroid papillary carcinoma cells (KTC1) were routinely cultured in vitro and divided into the blank control group (without any treatment),negative control group (transfected with LipofectamineTM 2000),KLF4 overexpression group (transfected with LipofectamineTM 2000 and KLF4),siRNA NC group (transfected with LipofectamineTM 2000 and NC-siRNA) and KLF4 siRNA group (transfected with LipofectamineTM 2000 and KLF4 siRNA). Furthermore,the immunofluorescence was used to detect the distribution and co-expression of KLF4 and β -catenin in cells. The migration and invasion ability of cancer cells was examined by Transwell. The

^{*} **基金项目:**上海市卫生健康委员会卫生行业临床研究专项(201940363);上海市宝山区科技创新专项资金项目(18-E-8)。 **作者简介:**陈翔(1979—),副主任医师,博士,主要从事甲状腺、乳腺相关疾病研究。 [△] **通信作者,**E-mail:lubaohua777@sohu.com。

EMT and Wnt signaling pathways related genes and protein expression levels were detected by Western blot and qRT-PCR, respectively. The protein co-immunoprecipitation test was employed to determine the potential interaction between KLF4 and β -catenin. **Results** The immunofluorescence labeling showed that KLF4 and β -catenin were co-localized in the cytoplasm of KTC1. The qRT-PCR results showed that E-cadherin (E-cad) mRNA expression level in the KLF4 overexpression group was significantly higher than that in the other groups ($P < 0.05$), the N-cadherin (N-cad) and MMP7 mRNA expression levels were significantly lower than those in the other groups ($P < 0.05$); after silent interference on KLF4, compared with other groups, the E-cad mRNA in the KLF4-siRNA group was significantly decreased ($P < 0.05$), while N-cad and MMP7 mRNA were significantly increased ($P < 0.05$). The Western blot results showed that the E-cad expression in the KLF4 overexpression group was significantly increased compared with the other groups ($P < 0.05$), while the N-cad and MMP7 expressions were significantly lower than those in the other groups ($P < 0.05$); when silent interference on KLF4, the epithelial markers were decreased ($P < 0.05$), while the mesenchymal markers were increased ($P < 0.05$). The Transwell results showed that the KLF4 overexpression could inhibit the migration and invasion of KTC1 cells. Interfering and silencing KLF4 could enhance the migration and invasion of KTC1 cells. The Co-IP results demonstrated that the interaction existed between KLF4 and β -catenin. The positive expression rates of KLF4 in thyroid carcinoma and paracancerous tissues were 24.44% (11/45) and 71.11% (32/45) respectively, the difference between them was statistically significant ($\chi^2 = 19.639, P < 0.001$). Among 45 cases of thyroid cancer samples, 4 cases in 18 cases of lymph node metastasis were KLF4 expression positive, while 15 cases in 27 cases of non-lymph node metastasis were KLF4 expression positive (22.22% vs. 55.56%, $\chi^2 = 4.919, P = 0.027$). **Conclusion** KLF4 regulates the expression of related downstream target gene by Wnt signal pathway, thus affect the invasion and migration abilities of thyroid cancer.

[Key words] thyroid carcinoma; Kruppel-like factor 4; epithelial-mesenchymal transition; invasion; metastasis

甲状腺癌的发生、发展和转移是一个复杂的过程,涉及许多因素。目前关于上皮间质转化(EMT)在甲状腺癌中的研究表明,EMT 参与了甲状腺癌的进展^[1-2]。EMT 过程涉及转录因子、生长因子、信号级联、表观遗传调控和肿瘤微环境等组成的复杂网络。据文献报道,Kruppel 样因子 4(KLF4)可以通过上调上皮基因表达和下调间质基因表达来调节 EMT 的进程^[3-4]。而在恶性肿瘤中调控这些关键性分子的表达,能促进或抑制细胞的侵袭和转移^[5-6]。本课题组前期报道了 KLF4 在甲状腺癌中的表达及对肿瘤侵袭转移的影响^[7]。本研究从 Wnt/ β -catenin 信号通路角度探讨 KLF4 调节甲状腺癌细胞侵袭和迁移的分子机制,以阐释对 KLF4 在甲状腺癌侵袭迁移过程的认识。

1 材料与方法

1.1 材料

细胞:甲状腺乳头状癌细胞株 KTC1 购自武汉普罗赛尔公司(CL-0649)。主要试剂及器材:DMEM 培养基购自杭州四季青公司;RNA 提取试剂 TRIzol 购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司(15596-026);逆转录试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司(R101-01/02);PCR 引物等由上海擎科生物公司合成;二喹啉甲酸(BCA)试剂盒购自上海碧云天公司(P0010);一抗 β -catenin,基质金属蛋白酶 7(MMP7)和 KLF4 均为兔源性单抗购自美国 Abcam 公司;兔源性多抗上皮型钙黏蛋白(E-cad)和神经型钙黏蛋白(N-cad)分别购自美国 Affinity 公司和武汉三鹰生物

公司;定量 PCR 仪购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司(Quant Studio 6);分光光度计购自杭州奥盛仪器有限公司(Nano-100)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、转染及分组

体外细胞培养密度约为 80%,对数生长期消化细胞,接种至培养板,每孔密度约 5×10^5 个,培养达 80%融合度。慢病毒载体的组装和测试等均由上海 GenePharma 公司承担。KLF4-siRNA 及阴性对照 siRNA 引物序列为见表 1。相关转染操作参阅 LipofectamineTM 2000 说明。将 KTC1 细胞分成 5 组:(1)空白对照组,不作任何处理;(2)阴性对照组,转染 LipofectamineTM 2000;(3)KLF4 过表达组,转染 LipofectamineTM 2000+KLF4;(4)siRNA-NC 组,转染 LipofectamineTM 2000+NC-siRNA;(5)KLF4-siRNA 组,转染 LipofectamineTM 2000+KLF4-siRNA。取 5 μ L 脂质体融入培养液中混匀,在 26 $^{\circ}$ C 下放置 20 min。向每个孔中加入 200 μ L 混合溶液,并转移到 37 $^{\circ}$ C 的培养箱中 48 h,获得的细胞 RNA 或蛋白质留待进一步检测。

1.2.2 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 EMT 过程中 Wnt 通路相关基因的表达水平

从对数生长期细胞中提取总 RNA 后将其逆转录为 cDNA,并以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。反应体系和反应条件见说明书。E-cad、N-cad、MMP7 引物序列见表 1,GAPDH 为内参,绘制溶解曲线,以计

算公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 算出 EMT 相关基因 mRNA 的表达水平。

表 1 引物序列(5'-3')

项目	正向	反向
KLF4-siRNA	GGACUUUUAUUCUCUCCAAUTT	AUUGGAGAGAAUAAAGUCCTT
NC-siRNA	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	ACGUGACACGUUCGGAGAATT
GAPDH	TCAAGAAGGTGGTGAAGCAGG	TCAAAGGTGGAGGAGTGGGT
E-cad	CGTAGCAGTGACGAATGTGG	CTGGGCAGTGTAGGATGTGA
N-cad	CTTGCCAGAAACTCCAGGG	TGTGCCCTCAAATGAAACCG
MMP7	AGAAGCCAAACTCAAGGA	CCACTGTAATATGCGGTAA

1.2.3 Western blot 检测 EMT 过程中 Wnt 通路相关蛋白的表达

提取对数生长期细胞的总蛋白并检测蛋白水平,变性后加样,每孔 40 μg,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),重复 3 次。转膜后添加一抗,然后在冰箱中-4 ℃环境下过夜。24 h 后加二抗稀释,37 ℃孵育 2 h,洗膜后增强化学发光法(ECL)显像并保存图像,BandScan 计算图像的灰度值。

1.2.4 免疫荧光检测细胞中 KLF4 和 β-catenin 的定位

制作细胞爬片并固定、穿孔,加入正常山羊血清并静置 20 min,添加一抗:兔抗 KLF4(工作浓度为 1:50),小鼠抗 β-catenin(工作浓度 5 μg/mL),放入 4 ℃湿盒中静置 24 h。磷酸盐缓冲液(PBS)清洗后加第二抗体,山羊抗兔 IgG(Cy3 标记)和山羊抗小鼠 IgG[异硫氰酸荧光素(FITC)标记],工作浓度均为 1:100。添加荧光染色剂后在避光条件下进行核染,最后在荧光显微镜下分析和收集图像。

1.2.5 蛋白质免疫共沉淀(Co-IP)检测 KLF4 和 β-catenin 间的蛋白质相互作用

将 KTC1 细胞分为 3 组:KLF4 处理组,予以 2.0 mmol/L 二硫苏糖醇(DTT)处理 24 h;input 阳性对照组,加入等体积的裂解液处理;IgG 阴性对照组,加入等体积的 IgG 处理。提取并定量细胞总蛋白 500 μg,加入蛋白-A/G 琼脂糖珠,静置 1 h 时。回收上清液,添加兔抗人 β-catenin 或 KLF4 单抗(工作浓度均为 1:200),4 ℃孵育 24 h。第 2 天,将蛋白-G 琼脂糖珠加入并混合 4 h。用低强度放射免疫沉淀法(RIPA)裂解液洗涤并收集琼脂糖珠;加入裂解液和蛋白上样溶液,在 99 ℃加热 10 min;离心后保留上清液,除去琼脂糖珠,余下步骤与常规 Western blot 相同。

1.2.6 免疫组织化学(IHC)检测甲状腺癌组织及癌旁组织中 KLF4 蛋白表达

选取本院 2019 年 7—12 月甲状腺癌标本 45 份,均为常规行单侧腺叶+峡部切除或双侧全切+中央区淋巴结清扫。采用 SP 法检测 KLF4 的表达水平,第一抗体购自武汉博士德生物有限公司,工作浓度为 1:150。

1.3 统计学处理

数据采用 SPSS19.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用最小显著差异检验。检验水准为 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 KLF4 和 β-catenin 在 KTC1 细胞质中的定位

免疫荧光检测结果显示,KLF4 显示绿色荧光,β-catenin 显示红色荧光,图像叠加后 KLF4 和 β-catenin 在部分 KTC1 细胞质中同时表达,KLF4 和 β-catenin 有部分共定位,见图 1。

2.2 各组 KTC1 细胞 EMT 过程中 Wnt 信号通路中相关基因和蛋白表达水平比较

qRT-PCR 结果显示,KLF4 过表达组 E-cad mRNA 表达明显高于其他组($P<0.05$),N-cad 和 MMP7 mRNA 表达明显低于其他组($P<0.05$);沉默干扰 KLF4 后,与其他组相比,KLF4-siRNA 组中的 E-cad mRNA 明显降低($P<0.05$),N-cad 和 MMP7 mRNA 明显升高($P<0.05$),见表 2。Western blot 结果显示,KLF4 过表达组中 E-cad 表达较其他组明显升高($P<0.05$),而 N-cad、MMP7 表达则明显低于其他组($P<0.05$),显示 KLF4 过表达可以逆转 EMT;当沉默干扰 KLF4 时,上皮标志物减少,间质标志物增加,见表 3、图 2。

表 2 各组 KTC1 细胞 Wnt 通路相关基因表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

项目	空白对照组	阴性对照组	KLF4 过表达组	siRNA-NC 组	KLF4-siRNA 组
E-cad/GAPDH	1.107±0.125 ^{ab}	1.096±0.243 ^{ab}	2.713±0.226	1.150±0.211 ^b	0.409±0.106 ^a
N-cad/GAPDH	1.072±0.239 ^{ab}	1.005±0.208 ^{ab}	0.513±0.061	1.004±0.109 ^{ab}	1.971±0.248 ^a
MMP7/GAPDH	1.069±0.087 ^{ab}	0.868±0.352 ^{ab}	0.700±0.175	1.118±0.226 ^{ab}	2.413±0.274 ^a

^a: $P<0.05$,与 KLF4 过表达组比较;^b: $P<0.05$,与 KLF4-siRNA 组比较。

表 3 各组 KTC1 细胞 Wnt 通路相关蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s,n=3$)

项目	空白对照组	阴性对照组	KLF4 过表达组	siRNA-NC 组	KLF4-siRNA 组
E-cad/GAPDH	0.467±0.031 ^{ab}	0.482±0.050 ^{ab}	0.823±0.113	0.482±0.073 ^{ab}	0.165±0.098 ^a
β-catenin/GAPDH	0.495±0.087 ^{ab}	0.499±0.094 ^{ab}	0.232±0.066	0.546±0.063 ^{ab}	0.843±0.045 ^a
N-cad/GAPDH	0.507±0.080 ^{ab}	0.491±0.056 ^{ab}	0.181±0.057	0.506±0.095 ^{ab}	0.848±0.068 ^a
MMP7/GAPDH	0.478±0.124 ^{ab}	0.466±0.093 ^{ab}	0.183±0.164	0.514±0.098 ^{ab}	0.800±0.052 ^a

^a: $P<0.05$,与 KLF4 过表达组比较;^b: $P<0.05$,与 KLF4-siRNA 组比较。

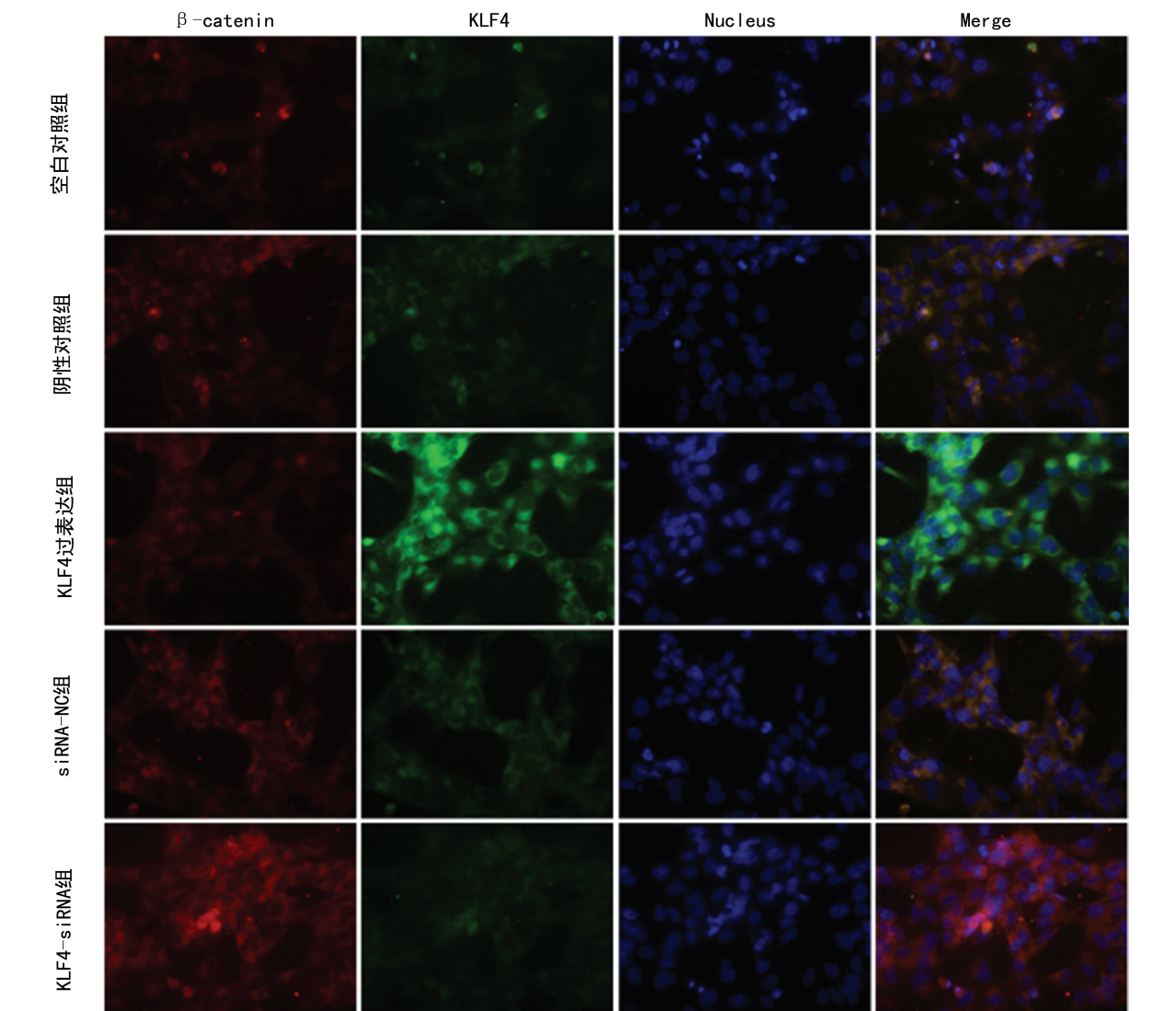
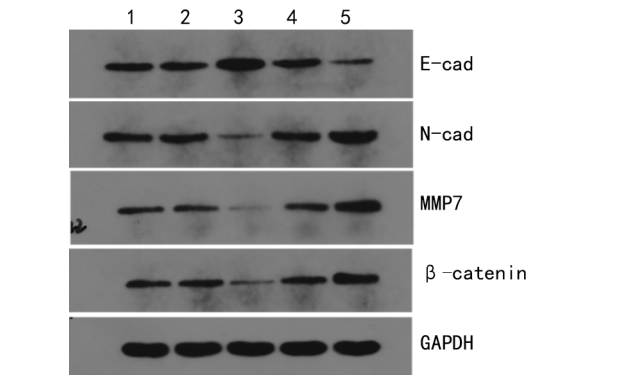


图 1 各组细胞中 KLF4 和 β-catenin 蛋白表达



1:空白对照组;2:阴性对照组;3:KLF4 过表达组;4:siRNA-NC 组;5:KLF4-siRNA 组。

图 2 各组细胞 Wnt 通路相关蛋白表达水平

2.3 各组 KTC1 细胞的迁移和侵袭能力比较

Transwell 结果显示,KLF4 过表达组侵袭和迁移细胞数量最低,而 KLF4-siRNA 组中侵袭和迁移细胞数量最高($P<0.05$),见表 4、图 3。

2.4 KLF4 和 β-catenin 蛋白间的相互作用

Co-IP 结果显示,将 KLF4 抗体或 β-catenin 抗体进行正向或反向的 Co-IP,均可以检测出 KLF4 与 β-catenin 间的相互作用,见图 4。

2.5 KLF4 在甲状腺癌中的表达情况

KLF4 在甲状腺癌及癌旁组织中的阳性表达率分别为 24.44%(11/45)和 71.11%(32/45),二者比较差异有统计学意义($\chi^2=19.639,P<0.001$)。45 份标本中,伴淋巴结转移 18 份中 KLF4 表达 4 份阳性,而不伴淋巴结转移 27 份中 KLF4 表达 15 份阳性,二

者比较差异有统计学意义(22. 22% vs. 55. 56%, $\chi^2=4.919,P=0.027$)。

表 4 各组 KTC1 细胞迁移和侵袭细胞数比较($\bar{x}\pm s,n=3$)

项目	空白对照组	阴性对照组	KLF4 过表达组	siRNA-NC 组	KLF4-siRNA 组
迁移细胞数	59.000±3.674 ^{ab}	57.000±6.083 ^{ab}	20.222±1.716	59.000±4.743 ^{ab}	98.444±4.333 ^a
侵袭细胞数	52.000±3.317 ^{ab}	48.667±4.153 ^{ab}	17.778±1.986	50.222±5.142 ^{ab}	87.000±5.172 ^a

^a: $P<0.05$,与 KLF4 过表达组比较;^b: $P<0.05$,与 KLF4-siRNA 组比较。

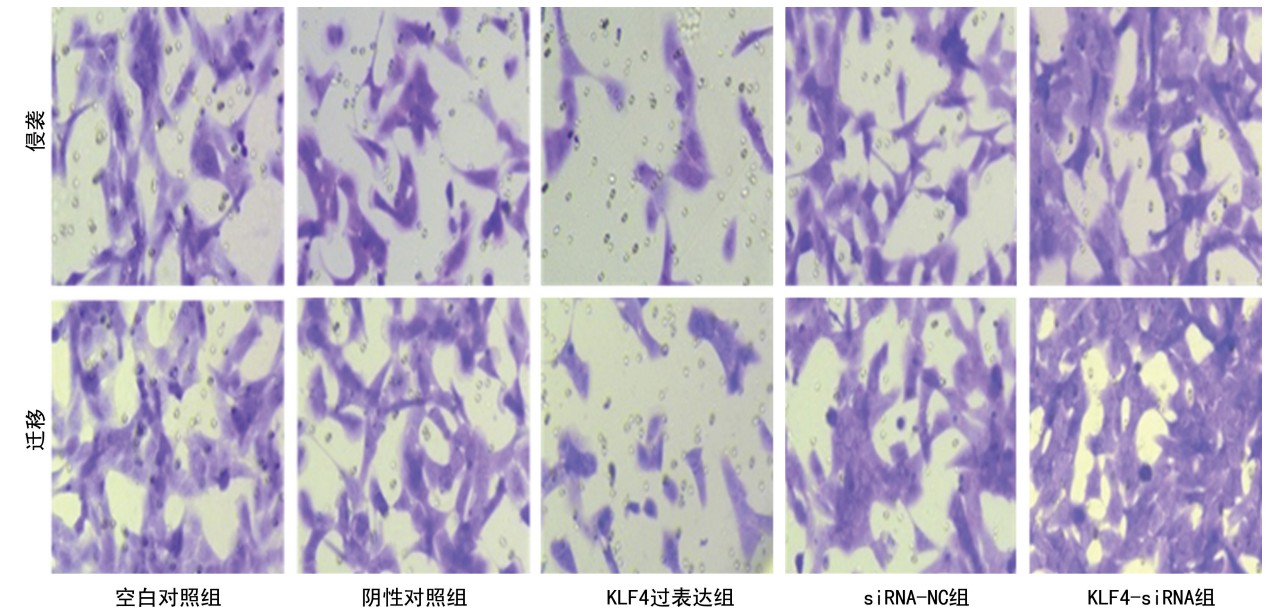


图 3 各组 KTC1 细胞迁移、侵袭情况

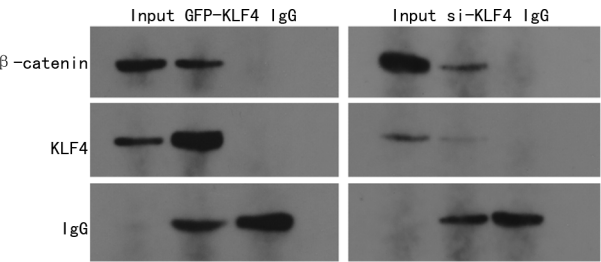


图 4 KTC1 细胞中 KLF4 和 β -catenin 的相互作用

3 讨 论

甲状腺癌总体预后良好,若伴有腺外侵犯和淋巴转移等重要独立预后因素,预后明显不佳^[8-9]。EMT 在肿瘤的侵袭、血行播散和微转移形成等过程中扮演重要角色^[10]。本课题组先前的研究^[7]及本次临床标本检测均表明,KLF4 在甲状腺癌中低表达,并起着抑癌基因的作用。在本研究中,由于 KLF4 过表达处理癌细胞后,结果上皮标志物增加,间质标志物减少,并抑制了 EMT 过程;沉默 KLF4 表达后,结果却相反,从而加速了 EMT 的过程。通过临床标本检测发现转移淋巴结 KLF4 阳性率低,未转移淋巴结阳性率高,可能提示 KLF4 表达缺失可能促进癌细胞淋巴结转移。表明甲状腺癌中 KLF4 水平的升高有望在逆转 EMT 中发挥作用,KLF4 可能通过参与甲状腺癌的 EMT 过程而发挥重要作用。

有研究表明,多个信号通路与 EMT 相关^[11-13]。

据文献报道,Wnt/ β -catenin 信号通路与甲状腺癌细胞的 EMT 过程密切相关,并起重要作用^[14]。KLF4 作为一种广泛存在于人体各种组织中的转录因子,可以参与多种细胞生物学行为的调节,并在肿瘤的抑制或发展中发挥作用^[15-16],这些差异可能取决于不同的条件和细胞类型。本研究通过 Co-IP 证实了 KLF4 下游的信号分子是 β -catenin;免疫荧光显示 KLF4 和 β -catenin 可以共表达。而且 KLF4 的过表达可降低 β -catenin 和 N-cad 蛋白的表达,增加 E-cad 的表达,并减弱肿瘤细胞的侵袭和迁移。表明细胞中过量的 E-cad 可以与游离的 β -catenin 结合形成结合物,这在一定程度上提高了细胞间的黏附性,而减轻了癌细胞的侵袭性^[17]。体外实验表明,癌细胞中 β -catenin 基因的缺失会削弱细胞的侵袭性^[18],推测原因是低水平的 β -catenin 不能与淋巴细胞增强因子/T 细胞因子(TCF/LEF)转录因子有效结合。因此,本研究认为在 KTC1 细胞过表达 KLF4 之后, β -catenin 表达降低,从而阻止 β -catenin 与 TCF/LEF 结合并有效地防止下游靶基因被激活。

与此同时,当 KLF4 在癌细胞中过表达后,MMP7 低表达,这削弱了细胞迁移和侵袭的能力;而将 KLF4 干扰后,MMP7 表达上调,肿瘤的侵袭和迁移能力得到增强。MMP7 与恶性肿瘤的侵袭性生长和远处转移有关。VOÛKA 等^[19]发现,MMP7 是转

移性大肠癌敏感性较好的生物标志物,外周血中 MMP7 的水平与肝转移程度和生存预后密切相关。YUAN 等^[20]发现,人舌鳞状细胞癌组织中 MMP7 的表达明显高于非肿瘤组织,且与淋巴结转移有关;细胞试验表明 MMP7 能提高癌细胞的侵袭能力。本实验中,KLF4 过表达可以降低细胞内 β -catenin 和 MMP7 蛋白的表达,而 KLF4 干扰敲除后可促进 β -catenin 和 MMP7 的上调,表明 KLF4 可通过 Wnt 信号通路调节相关下游靶基因的表达,从而影响了肿瘤的侵袭和迁移能力。

综上所述,本研究认为,在甲状腺癌中,KLF4 过表达可以抑制 EMT 过程,影响肿瘤的侵袭和迁移,并且该过程的实现取决于 Wnt 信号传导通路的参与和调节。KLF4 和甲状腺癌间的关系表明,KLF4 可能是有前途的预后标志物,也是甲状腺癌的潜在治疗靶标。

参考文献

- [1] REVILLA G,CORCOY R,MORAL A,et al. Cross-talk between inflammatory mediators and the epithelial mesenchymal transition process in the development of thyroid carcinoma[J]. *Int J Mol Sci*,2019,20(10):2466.
- [2] SHAKIB H,RAJABI S,DEHGHAN M H,et al. Epithelial-to-mesenchymal transition in thyroid cancer:a comprehensive review[J]. *Endocrine*,2019,66(3):435-455.
- [3] ZHU Z,YU Z,WANG J,et al. Krüppel-like factor 4 inhibits pancreatic cancer epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis by down-regulating caveolin-1 expression[J]. *Cell Physiol Biochem*,2018,46(1):238-252.
- [4] LIU S,YANG H,CHEN Y,et al. Krüppel-like factor 4 enhances sensitivity of cisplatin to lung cancer cells and inhibits regulating epithelial-to-mesenchymal transition[J]. *Oncol Res*,2016,24(2):81-87.
- [5] FERRALLI J,CHIQUET-EHRISMANN R,DEGEN M,et al. KLF4 alpha stimulates breast cancer cell proliferation by acting as a KLF4 antagonist[J]. *Oncotarget*,2016,7(29):45608-45621.
- [6] TANG W,ZHU Y,GAO J,et al. MicroRNA-29a promotes colorectal cancer metastasis by regulating matrix metalloproteinase 2 and E-cadherin via KLF4[J]. *Br J Cancer*,2014,110(2):450-458.
- [7] WANG Q,XU J,CHEN Y,et al. KLF4 overexpression decreases the viability, invasion and migration of papillary thyroid cancer cells[J]. *Exp Ther Med*,2019,18(5):3493-3501.
- [8] TAVARELLI M,SARFATI J,CHEREAU N,et al. Heterogeneous prognoses for pT3 papillary thyroid carcinomas and impact of delayed risk stratification[J]. *Thyroid*,2017,27(6):778-786.
- [9] MORITANI S. Impact of gross extrathyroidal extension into major neck structures on the prognosis of papillary thyroid carcinoma according to the American Joint Committee on Cancer eighth edition [J]. *Endocr J*,2020,67(9):941-948.
- [10] SUN L R,LI S Y,GUO Q S,et al. SPOCK1 involvement in epithelial-to-mesenchymal transition;a new target in cancer therapy? [J]. *Cancer Manag Res*,2020,12:3561-3569.
- [11] ZHOU B,XU J,CHEN Y,et al. miR-200b/c-RAP1B axis represses tumorigenesis and malignant progression of papillary thyroid carcinoma through inhibiting the NF- κ B/Twist1 pathway[J]. *Exp Cell Res*,2020,387(2):111785.
- [12] WU Y C,LI S Y,JIA Y F. MicroRNA-26a suppresses the malignant biological behaviors of papillary thyroid carcinoma by targeting ROCK1 and regulating PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*,2019,23(20):8940-8949.
- [13] WANG D P,TANG X Z,LIANG Q K,et al. microRNA-599 promotes apoptosis and represses proliferation and epithelial-mesenchymal transition of papillary thyroid carcinoma cells via downregulation of Hey2-dependent Notch signaling pathway[J]. *J Cell Physiol*,2020,235(3):2492-2505.
- [14] LIU L,WU B,CAI H,et al. Tiam1 promotes thyroid carcinoma metastasis by modulating EMT via Wnt/ β -catenin signaling[J]. *Exp Cell Res*,2018,362(2):532-540.
- [15] CHEN J,ZHANG L,MA S,et al. The aberrant expressions of MACC1,ZEB1,and KLF4 in hepatocellular carcinoma and their clinical significance [J]. *Int J Clin Exp Pathol*,2019,12(9):3653-3661.
- [16] ZHOU Q,FAN D,HUANG K,et al. Activation of KLF4 expression by small activating RNA promotes migration and invasion in colorectal epithelial cells[J]. *Cell Biol Int*,2018,42(4):495-503.
- [17] 席剑铭,张能,李晓光,等. 过表达 KLF4 通过 Wnt/ β -catenin 信号途径调控膀胱癌细胞上皮间质转化及迁移[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*,2019,26(8):862-867. (下转第 3993 页)

- Lancet,2017,389(10074):1134-1150.
- [2] MILLER K D, NOGUEIRA L, MARIOTTO A B, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(5): 363-385.
 - [3] HOU Y, SUN X, YAO S, et al. Cryoablation-activated enhanced nanodoxorubicin release for the therapy of chemoresistant mammary cancer stem-like cells[J]. J Mater Chem B, 2020, 8(5): 908-918.
 - [4] HAO P, KANG B, LI Y, et al. UBE2T promotes proliferation and regulates PI3K/Akt signaling in renal cell carcinoma[J]. Mol Med Rep, 2019, 20(2): 1212-1220.
 - [5] ZHANG W, ZHANG Y, YANG Z, et al. High expression of UBE2T predicts poor prognosis and survival in multiple myeloma[J]. Cancer Gene Ther, 2019, 26(11/12): 347-355.
 - [6] PEREZ-PENA J, CORRALES-SANCHEZ V, AMIR E, et al. Ubiquitin-conjugating enzyme E2T (UBE2T) and denticleless protein homolog (DTL) are linked to poor outcome in breast and lung cancers[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 17530.
 - [7] GONG Y Q, PENG D, NING X H, et al. UBE2T silencing suppresses proliferation and induces cell cycle arrest and apoptosis in bladder cancer cells[J]. Oncol Lett, 2016, 12(6): 4485-4492.
 - [8] STEWART M D, RITTERHOFF T, KLEVIT R E, et al. E2 enzymes: more than just middle men[J]. Cell Res, 2016, 26(4): 423-440.
 - [9] LUO C, YAO Y, YU Z, et al. UBE2T knock-down inhibits gastric cancer progression[J]. Oncotarget, 2017, 8(20): 32639-32654.
 - [10] ZHENG Y W, GAO P F, MA M Z, et al. Role of ubiquitin-conjugating enzyme E2T in the carcinogenesis and progression of pancreatic cancer[J]. Oncol Lett, 2020, 20(2): 1462-1468.
 - [11] 罗何三, 吴盛喜, 许鸿鹑, 等. 基于 TCGA 数据乳腺癌组织 UBE2T 表达临床意义分析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2017, 24(13): 901-905.
 - [12] LIU L L, ZHU J M, YU X N, et al. UBE2T promotes proliferation via G₂/M checkpoint in hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Manag Res, 2019, 11: 8359-8370.
 - [13] LI P, ZHOU L, ZHAO T, et al. Caspase-9: structure, mechanisms and clinical application[J]. Oncotarget, 2017, 8(14): 23996-24008.
 - [14] LIU J, LIU X. UBE2T silencing inhibited non-small cell lung cancer cell proliferation and invasion by suppressing the wnt/beta-catenin signaling pathway[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2017, 10(9): 9482-9488.
 - [15] SHANG S, HUA F, HU Z W. The regulation of beta-catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities[J]. Oncotarget, 2017, 8(20): 33972-33989.
 - [16] DREYER J H, HAUCK F, BARROS M, et al. pRb and CyclinD1 Complement p16 as Immunohistochemical Surrogate Markers of HPV Infection in Head and Neck Cancer[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2017, 25(5): 366-373.
 - [17] MASTRONIKOLIS N, RAGOS V, KYRODIMOS E, et al. Mechanisms of C-myc oncogenic activity in head and neck squamous cell carcinoma [J]. J BUON, 2019, 24(6): 2242-2244.
 - [18] GAO X, LIU X, LU Y, et al. PIM1 is responsible for IL-6-induced breast cancer cell EMT and stemness via c-myc activation[J]. Breast Cancer, 2019, 26(5): 663-671.
 - [19] LI G, SU Q, LIU H, et al. Frizzled7 promotes epithelial-to-mesenchymal transition and stemness via activating canonical wnt/beta-catenin pathway in gastric cancer[J]. Int J Biol Sci, 2018, 14(3): 280-293.
 - [20] 张益玮, 彭秀达, 肖帅. 上皮-间充质转变的概念变迁及与肿瘤转移研究进展[J]. 中国普通外科杂志, 2020, 29(2): 241-247.

(收稿日期: 2021-03-02 修回日期: 2021-06-22)

(上接第 3987 页)

- [18] 刘全海, 申骏龙, 李晶, 等. β -catenin 在膀胱癌上皮-间质转化中的作用及相关机制[J]. 现代肿瘤医学, 2018, 26(11): 1671-1674.
- [19] VOÛKA M, LANGER D, FRYBA V, et al. Serum levels of TIMP-1 and MMP-7 as potential biomarkers in patients with metastatic colorectal cancer[J]. Int J Biol Markers, 2019, 34(3): 292-301.
- [20] YUAN S, LIN L S, GAN R H, et al. Elevated matrix metalloproteinase 7 expression promotes the proliferation, motility and metastasis of tongue squamous cell carcinoma[J]. BMC Cancer, 2020, 20(1): 33.

(收稿日期: 2021-02-07 修回日期: 2021-06-23)