

网络出版时间: 2025-03-26 11:24:23 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250325.1729.014>

EZH2 甲基化与甲状腺癌 分化相关标志物的关系及治疗价值的研究

荆琳¹, 蒋奇², 顾江宁³, 罗海峰⁴, 郭晓祎⁴, 沈天赐⁴, 戴子豪⁴, 陈丹¹

(大连医科大学附属第一医院¹ 病理科、⁴ 普通外科, 大连 116011;

² 大连大学附属中山医院病理科, 大连 116001; ³ 北部战区总医院内窥镜科, 沈阳 110016)

摘要 目的 探讨 zeste 基因增强子同源物 2 (EZH2)-H3 第 27 位赖氨酸三甲基化 (H3K27me3) 轴在甲状腺癌去分化过程的作用及作为甲状腺未分化癌 (ATC) 治疗潜在靶点的临床价值。方法 采用免疫组化 SP 法检测 ATC 和甲状腺乳头状癌 (PTC) 及其癌旁正常甲状腺组织中 EZH2、H3K27me3、配对盒基因 8 (PAX8)、甲状腺球蛋白 (TG) 和甲状腺转录因子 1 (TTF1) 的表达。应用基因表达汇编 (GEO) 数据库进一步分析 EZH2 与甲状腺分化标志物 (PAX8、TTF1、TG) 之间的关系。体外培养 ATC 细胞株 8305C 和 BHT-401, 采用实时定量反转录聚合酶链反应 (RT-qPCR) 法检测经 EZH2 抑制剂 (GSK126) 处理后的 ATC 细胞株中甲状腺分化标志物 (TTF1、PAX8) mRNA 的表达变化, 评估 GSK126 在体外潜在的治疗效果。采用细胞增殖实验观察 GSK126 和丝/苏氨酸特异性激酶基因 (BRAF) 抑制剂维罗非尼对 ATC 细胞株增殖的影响。结果 EZH2 在 ATC 组织中的表达明显高于 PTC 及其癌旁正常甲状腺组织 ($P < 0.05$), H3K27me3 在 ATC 组织中的表达明显低于 PTC 组织 ($P < 0.05$)。EZH2 与 PAX8 和 TG 表达水平呈负相关, 而与 TTF1 表达水平无相关性。在体外实验中, GSK126 可以逆转甲状腺分化标志物 PAX8 和 TTF1 在 ATC 细胞株中的表达, GSK126 联合 BRAF 抑制剂维罗非尼可显著抑制 ATC 细胞株的生长。结论 EZH2-H3K27me3 轴在调节甲状腺癌去分化过程中起重要作用, EZH2 可能是 ATC 的潜在治疗靶点。

关键词 EZH2; H3K27me3; 甲状腺未分化癌; 去分化; 甲基化; GSK126

中图分类号 R 736.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2025)04-0691-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.04.015

甲状腺癌是常见的内分泌恶性肿瘤, 在 2022 年全球恶性肿瘤中排名第 11 位^[1], 其中甲状腺乳头状癌 (papillary thyroid carcinoma, PTC) 占甲状腺癌的 80%^[2], 大多预后较好, 免疫表型呈现甲状腺分化

标志物甲状腺球蛋白 (thyroglobulin, TG)、甲状腺转录因子 1 (thyroid transcription factor 1, TTF1)、配对盒基因 8 (paired box gene 8, PAX8) 阳性表达。甲状腺未分化癌 (anaplastic thyroid cancer, ATC) 侵袭性较强, 总生存期仅约 3~5 个月^[3], 甲状腺分化标志物通常阴性表达。关于 ATC 的起源有学者认为 ATC 由 PTC 演变而来, 由此猜测甲状腺癌去分化的机制可能在诱导甲状腺癌的形态转变中起重要作用。

2024-12-15 接收

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 81902382)

作者简介: 荆琳, 女, 硕士研究生;

陈丹, 女, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: chendan78@dmu.edu.cn

group was higher than that in the Anti-IgG group ($P < 0.05$). Compared with control group, cell proliferation activity decreased, cell apoptosis rate increased, migration number and invasion number decreased in si-SOX4 group ($P < 0.05$). Compared with the si-SOX4 group, the ratio of LC3-II/LC3-I protein expression and the relative protein expression of Beclin1 increased in si-SOX4+oe-Beclin1 group, while the relative protein expression of p62 decreased, cell proliferation activity increased, apoptosis rate decreased, migration number and invasion number increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Down-regulation of SOX4 can inhibit autophagy, decrease proliferation activity of NCI-H446 cells, and inhibit cell migration and invasion by inhibiting Beclin1 expression.

Key words small cell lung cancer; sex-determining region Y-box transcription factor 4; autophagy; proliferation; migration; invasion

Fund program Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (No. 2023D01C67)

Corresponding author Liu Jiang, E-mail: liujiang@cscs.org.cn

DNA 甲基化在肿瘤的发生中具有重要作用,如组蛋白的甲基化可增强或抑制基因表达。zeste 基因增强子同源物 2 (enhancer of zeste homolog 2, EZH2) 是多梳抑制复合物 2 的组成部分,通过调节 H3 第 27 位赖氨酸三甲基化(trimethylated lysine 27 of histone H3, H3K27me3) 抑制基因表达。目前 EZH2 在不同的肿瘤中高表达,显示与总生存期呈负相关,如胰腺癌^[4]和乳腺癌^[5]。但 EZH2 在甲状腺癌中的研究鲜有报道。该研究旨在分析 EZH2、H3K27me3 与甲状腺分化标志物的关系并初步探索 EZH2 对甲状腺癌去分化过程的影响,进一步研究 EZH2 在基因调控中的作用和 ATC 潜在的治疗方法。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集大连医科大学附属第一医院 2013 年 1 月—2021 年 2 月病理科归档的病历资料完整的甲状腺癌的石蜡标本 88 例为研究对象。其中 PTC 57 例,远处转移性 PTC 8 例(肺转移 5 例、脑转移 3 例),ATC 6 例,经手术治疗后复发性 PTC 17 例,另外选取 62 例部分 PTC 和 ATC 对应癌旁正常组织。患者的主要临床病理特征总结见表 1。根据美国癌症联合委员会(American joint committee on cancer, AJCC)最新版 TNM 系统进行肿瘤分期,2/3 的患者 AJCC 分期为 I 期(63.16%)。该研究经大连医科大学附属第一医院伦理委员会批准(批准文号: PJ-KS-KY-2023-582)。

表 1 甲状腺癌的临床特征

Tab.1 Clinical features of thyroid carcinoma

Groups	PTC (n=57)	ATC (n=6)	Metastatic PTC (n=8)	Recurrent PTC (n=17)
Age(year)				
≥55	10	5	4	8
<55	47	1	4	9
Gender				
Female	17	4	3	6
Male	40	2	5	11
Tumor size(cm)				
≤1	28	0	3	-
>1	29	6	5	-
Single/Multiple				
Single	47	6	4	-
Multiple	10	0	4	-
Lymphatic metastasis				
No	21	3	-	-
Yes	36	3	-	-

1.2 免疫组化及结果判读 用收集的标本制备组织芯片,进行免疫组织化学染色。严格按照试剂盒使用说明书,采用 SP 方法检测 EZH2、H3K27me3、PAX8 和 TTF1 的表达,阳性对照以乳腺癌组织 1:100 稀释,兔/鼠 IgG 作为阴性对照。EZH2 抗体和 H3K27me3 抗体均购自美国 Cell Signaling Technology 公司(货号: 5246、9733),PAX8 抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司(货号: ZM0468),TTF1 抗体购自福州迈新生物技术开发公司(货号: MAB0599)。由 2 位具有资质的病理科医师采取盲法阅片并进行免疫组化结果判定。以胞核和(或)胞质中出现黄色至棕褐色颗粒视为阳性着色,采用半定量积分法判断结果^[6]。根据染色程度评分:无着色 1 分,浅着色 2 分,棕黄色 3 分;按阳性瘤细胞的百分比分 4 级:无阳性瘤细胞为 0 分,1%~10%为 I 级记 1 分,11%~50%为 II 级记 2 分,51%~80%为 III 级记 3 分,>81%IV 级记 4 分。每例标本最后的得分为 2 次评分的乘积(0~12 分),9~12 分为强阳,5~8 分为中等阳性,1~4 分为弱阳性,0 分为阴性。

1.3 细胞培养及试剂 ATC 细胞株 8305C 和 BHT-101(中国科学院国家认证细胞库)在含 10%胎牛血清(美国 Gibco 公司)、0.1 mmol/ml 丙酮酸钠、50 U/ml 青霉素和 50 μg/ml 链霉素(美国 Gibco 公司)的 EMEM(美国 Invitrogen 公司,货号: 11090081)培养基中,在 37℃、5% CO₂ 恒温恒湿培养箱内培养。实验组 8305C 和 BHT-101 细胞分别用浓度为 10 nmol/L、100 nmol/L、1 μmol/L 的 GSK126(美国 APExBio 公司,货号: A3446)处理,对照组用 DMSO(美国 Gibco 公司)处理。

1.4 RT-qPCR 实验 严格按照 TRIzol 试剂(美国 Invitrogen 公司,货号: AM9738)抽提总 RNA,并用分光光度计检测 RNA 的纯度和浓度。使用逆转录试剂盒(南京 Vazyme 公司,货号: R111-01)以 1 μg 总 RNA 模板将其反转录为 cDNA。实时 RT-PCR 采用 Roche SYBR Green PCR Master Mix,用 Light Cycler LC480 荧光定量 PCR 仪(法国 Roche Diagnostics 公司)扩增 cDNA 片段,总反应体系 20 μg。引物购自上海 Sangon Biotech 公司,TTF-1 上游引物: 5'-CGCGTTTAGACCAAGGAAC-3',下游引物: 5'-GAGTGTGCCAGAGTGAAG-3'; PAX-8 上游引物: 5'-AGGTGGTGGAGAAGATTGG-3',下游引物: 5'-ATAGG-GAGGTTGAATGCTTG-3'; 内参 GAPDH 上游引物: 5'-CACCATGAAGATCAAGATCATTGC-3',下游引

物: 5'-GGCCGGACTCATCGTACTCCTGC-3'。

1.5 CCK-8 法测定 BRAFV600E 抑制剂维罗非尼和 GSK126 作用于 8305C 和 BHT-401 细胞的 OD 值 将 ATC 细胞以 1.5×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔板中,加入含浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$ 的维罗非尼(美国 APEX BIO 公司,货号: A3004)和 500 nmol/L 的 GSK126 的培养基进行处理,作为实验组;加入含有溶剂 DMSO 的培养基处理作为空白对照。随后放置于 37°C 恒温、 $5\%\text{CO}_2$ 细胞培养箱中进行培养,作用 72 h 后,向每孔中加入 CCK-8 试剂,连续完成 5 d 培养。分别在加入 CCK-8 试剂培养后第 1、3、5 天通过使用酶标仪(美国 Epoch, Bio Tek 公司)检测各孔在 450 nm 波长下的 OD 值。

1.6 生物信息学分析 从基因表达汇编 (gene expression omnibus, GEO) 数据库下载了包含 17 个低分化甲状腺癌和 20 个 ATC 的数据集 GSE76039。采用 Pearson 相关系数分析目的基因之间的相关性。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 26.0 软件对数据进行分析。实验数据的差异采用 Fisher 精确检验进行分析。Pearson 相关系数用于 EZH2 的表达水平与甲状腺分化标志物的相关性分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 甲状腺癌组织及癌旁正常组织中 EZH2、H3K27me3 的表达情况 EZH2 在 PTC 组织和癌旁正常组织中的表达水平差异无统计学意义,而在 ATC 组织中 EZH2 的表达水平明显高于 PTC 组织和癌旁正常组织 ($P < 0.05$) (表 2 和图 1)。H3K27me3 在 ATC 组织中的表达水平明显低于 PTC 组织,差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 3 和图 2)。

表 2 EZH2 在甲状腺癌中的表达

Tab.2 The expression of EZH2 in thyroid carcinoma

Groups	Total	EZH2	
		Positive	Negative
Adjacent normal tissues	62	0	62
PTC	57	0	57
Recurrent PTC	17	0	17
Metastatic PTC	8	0	8
ATC	6	3	3
<i>P</i> value		< 0.05	

2.2 EZH2-H3K27me3 轴与甲状腺分化标志物表达的相关性研究 免疫组化结果显示 EZH2 与甲状腺分化标志物 (PAX8、TTF1、TG) 之间的差异无统计

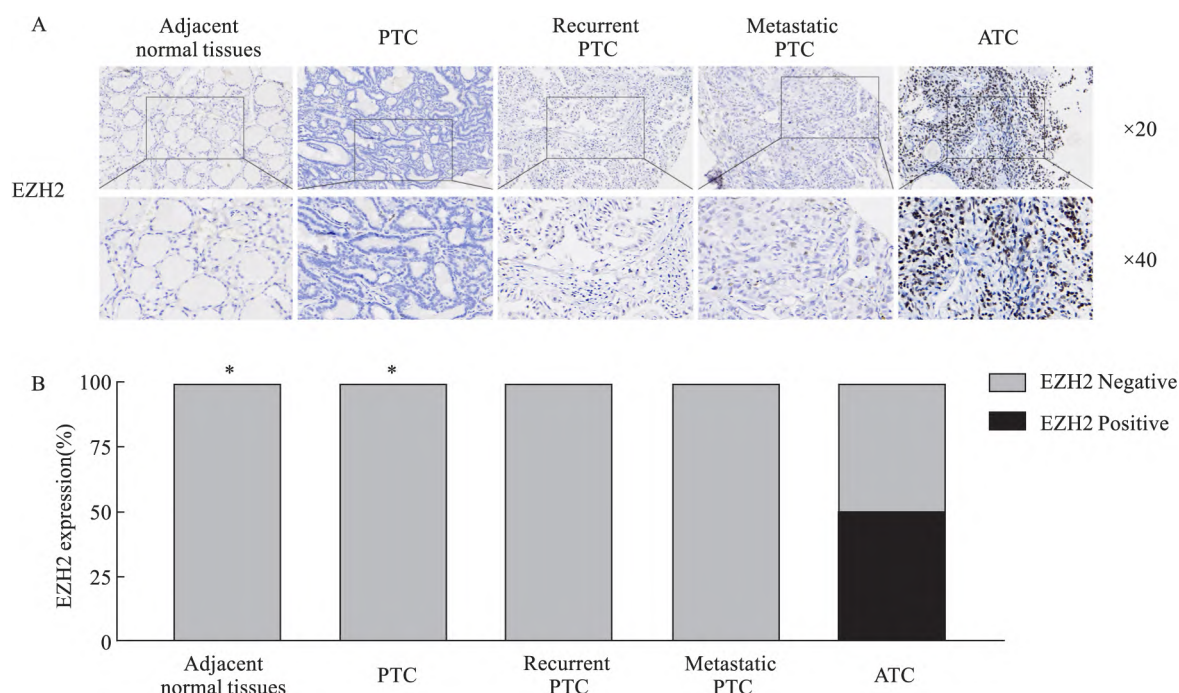


图 1 EZH2 在甲状腺癌组织中的阳性表达比例

Fig.1 The ratio of positive expression of EZH2 in thyroid cancer tissues

A: Expression of EZH2 in adjacent normal tissues, PTC, recurrent PTC, metastatic PTC and ATC; B: The differential expression of EZH2 in adjacent normal tissues, PTC, recurrent PTC, metastatic PTC and ATC; * $P < 0.05$ vs ATC group.

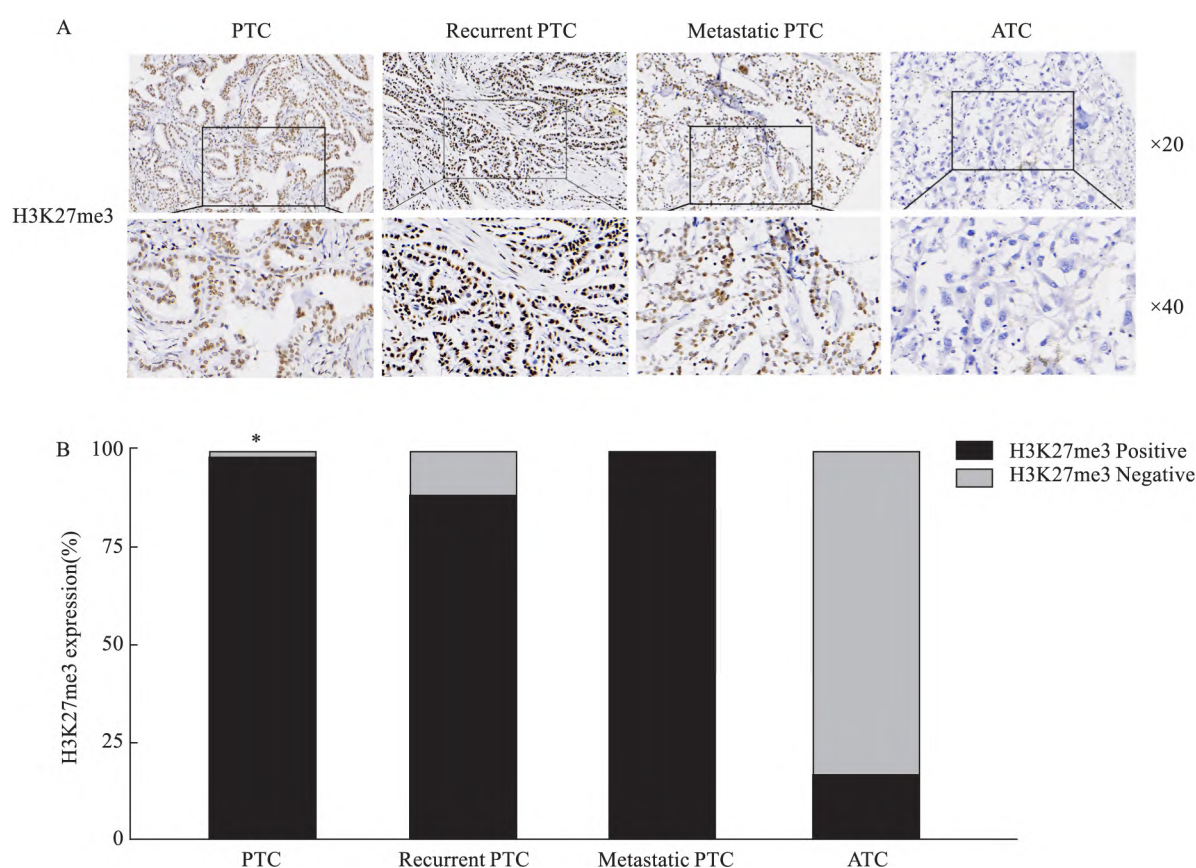


图2 H3K27me3 在甲状腺癌组织中的阳性表达比例

Fig.2 The rate of positive expression of H3K27me3 in thyroid carcinoma tissues

A: Expression of H3K27me3 in PTC ,recurrent PTC ,metastatic PTC and ATC; B: The differential expression of H3K27me3 in PTC ,recurrent PTC , metastatic PTC and ATC; * $P < 0.05$ vs ATC group.

表3 H3K27me3 在甲状腺癌中的表达

Tab.3 The expression of H3K27me3 in thyroid carcinoma

Groups	Total	H3K27me3	
		Positive	Negative
ATC	6	1	5
PTC	57	56	1
Recurrent PTC	17	15	2
Metastatic PTC	8	8	0
<i>P</i> value		<0.05	

学意义(表4)。结合 GEO 数据库分析结果显示, EZH2 与 PAX8 和 TG 的表达水平呈负相关,而 EZH2 与 TTF1 之间差异无统计学意义(图 3A-3C)。在体外实验中,ATC 细胞系 8305C 和 BHT-101 经 GSK126 处理后,PAX8 和 TTF1 mRNA 的表达均显著增强(图 3D-3G),提示抑制 EZH2 可以逆转甲状腺分化标志物在 ATC 细胞中的表达。CCK-8 实验结果显示,高剂量 GSK126 不能抑制 ATC 细胞的生长。后续实验表明,GSK126 能够显著增强 BRAF 抑制剂维罗非尼体外抑制增殖的效果,较单用维罗非

尼效果显著增强(图 3H、3I)。这些结果表明,EZH2 可能参与了甲状腺癌的去分化过程,提示 EZH2 是一个潜在的治疗靶点。

表4 免疫组化实验中 EZH2 与甲状腺分化标志物的关系

Tab.4 The relationship between EZH2 and thyroid differentiation markers in immunohistochemistry experiments

Groups	EZH2	
	<i>r</i> value	<i>P</i> value
PAX8	-0.25	1
TG	0	1
TTF1	0	1

3 讨论

ATC 仅占甲状腺原发性恶性肿瘤的少部分,但由于缺乏有效的治疗方法,其预后很差^[7],而 PTC 经过手术切除、放射性碘治疗联合左甲状腺素治疗可以获得较好的预后。因此,研究肿瘤从 PTC 向 ATC 去分化的分子机制对于开发新药或探索治疗

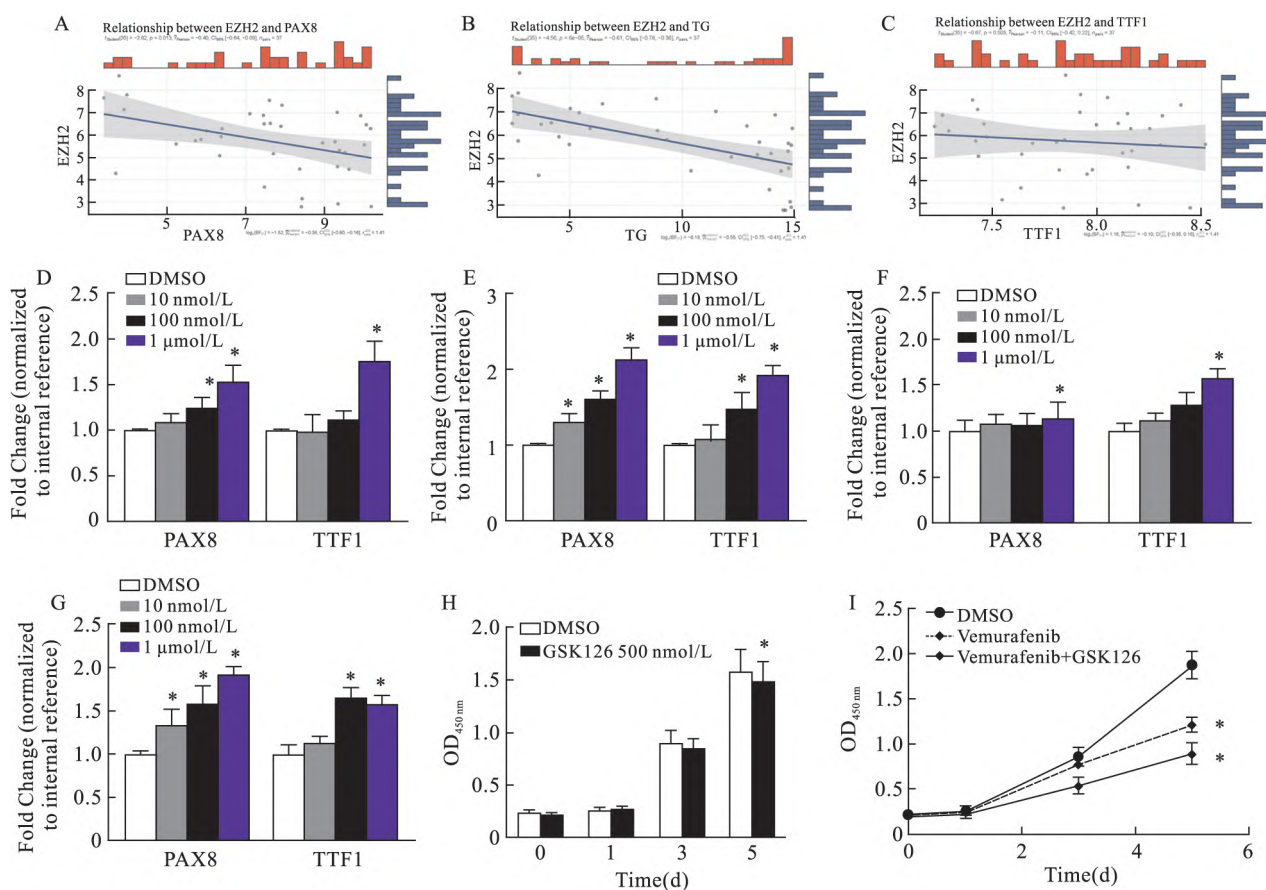


图3 EZH2-H3K27me3 轴与甲状腺分化标志物表达的关系

Fig.3 The relationship between EZH2-H3K27me3 axis and the expression of thyroid differentiation markers

A-C: Correlation analysis of EZH2 and PAX8, TG, TTF1 in GSE76039; D, E: The mRNA levels of PAX8 and TTF1 in ATC cell line 8305C treated with EZH2 inhibitor GSK126 for 24 hours and 48 hours were verified by RT-qPCR; F, G: The mRNA levels of PAX8 and TTF1 in ATC cell line BHT-101 treated with EZH2 inhibitor GSK126 for 24 hours and 48 hours were verified by RT-qPCR; H: CCK-8 was used to detect the effect of high concentration of GSK126 on the growth of ATC cell line 8305C; I: CCK-8 was used to detect the effect of BRAF inhibitor vemurafenib alone and combined with BRAF inhibitor vemurafenib and GSK126 on the activity of ATC cell line 8305C cells; * $P < 0.05$ vs DMSO group.

方法具有重要意义。该研究表明 EZH2 在 ATC 组织中的表达高于 PTC 组织,小分子化合物 EZH2 的特异性抑制剂 GSK126 可以提高 PAX8 和 TTF1 的 mRNA 水平, EZH2 可能在 PTC 向 ATC 的去分化过程中发挥重要作用,有望成为 ATC 的潜在治疗靶点。近年来,表观遗传修饰在癌症中的作用得到了广泛的研究^[8]。组蛋白的异常甲基化,如 H3K27me3、H3K4me3^[9] 或 H3K9me3^[10],在不同情况下可激活或抑制基因的表达,参与肿瘤的发生发展。EZH2 可诱导组蛋白在 27 位赖氨酸发生三甲基化,从而抑制基因表达。以往研究^[11]表明, EZH2 在肿瘤组织中高表达,并且与卵巢癌、食道癌和胰腺癌的总生存期呈负相关,而在甲状腺癌尤其是 ATC 中的作用鲜有报道。

EZH2 诱导 H3K27 的三甲基化,理论上 H3K27me3 的水平应该与 EZH2 的水平呈正相关。

然而在该研究中没有表现出两者的正相关性,可能因为 ATC 的发病率相对较低、样本量较小,存在一定的偏倚。在以往的研究中,也存在 ATC 的样本量较小的情况, Pellecchia et al^[12] 的研究中 ATC 的样本量是 11, Borbone et al^[13] 的研究中 ATC 的样本量是 12。基于 H3K27me3 对基因的抑制作用,该研究推测甲状腺分化标志物(TTF1、PAX8 和 TG)的表达可能被 EZH2-H3K27me3 轴沉默,但该研究结果未能显示 EZH2 和 H3K27me3 与甲状腺分化标志物之间呈正相关,这可能与样本量较小有关。然而,一项体外研究^[14]表明,抑制 EZH2 可以恢复这些标志物的表达水平, GEO 数据库中的相关性分析也进一步支持了这一点。还有相关研究^[15]表明 BRAF 抑制剂维罗非尼在 ATC 患者中表现出较好的反应,并显著改善了患者的生活质量。基于以上结果,该研究联合使用 GSK126 与 BRAF 抑制剂维罗非尼处理

ATC 细胞系 ,表明这两种药物在抑制肿瘤生长方面具有协同作用 ,为未来 ATC 的分子治疗提供了潜在的靶点。

该研究存在一定的局限性。首先 ,ATC 的低发病率限制了免疫组化分析的样本量 ,这可能是该研究未能显示出显著相关性以及与理论 H3K27me3 表达不一致的主要原因。其次 ,该研究只在体外进行 ,没有在体内进行验证。由于体内的调控网络较复杂 ,可能存在体内实验的结果可能与体外实验的结果不一致的情况。第三 ,该研究表明 EZH2 在 PTC 和正常甲状腺组织中的表达水平差异无统计学意义 ,这与以往的研究^[16] 结果不一致。

综上所述 ,与 PTC 组织相比 ,EZH2 在 ATC 组织中高表达。EZH2-H3K27me3 轴在调节甲状腺分化标志物的表达中起重要作用 ,GSK126 对 EZH2 的抑制作用可能成为 ATC 治疗的一个潜在的靶点。

参考文献

- [1] Siegel R L , Miller K D , Fuchs H E , et al. Cancer statistics , 2022 [J]. *CA A Cancer J Clinicians* , 2022 , 72(1) : 7–33. doi: 10.3322/caac.21708.
- [2] Chen D W , Lang B H H , McLeod D S A , et al. Thyroid cancer [J]. *Lancet* , 2023 , 401(10387) : 1531–44. doi: 10.1016/s0140-6736(23) 00020-x.
- [3] Amaral M , Afonso R A , Manuela Gaspar M , et al. Anaplastic thyroid cancer: how far can we go? [J]. *EXCLI J* , 2020 , 19: 800–12. doi: 10.17179/excli2020-1302.
- [4] Patil S , Steuber B , Kopp W , et al. EZH2 regulates pancreatic cancer subtype identity and tumor progression *via* transcriptional repression of GATA6 [J]. *Cancer Res* , 2020 , 80(21) : 4620–32. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-20-0672.
- [5] Mohamad Hanif E A , Shah S A. Overview on epigenetic re-programming: a potential therapeutic intervention in triple negative breast cancers [J]. *Asian Pac J Cancer Prev* , 2018 , 19(12) : 3341–51. doi: 10.31557/APJCP.2018.19.12.3341.
- [6] Zhu Y , Shi M , Chen H , et al. NPM1 activates metabolic changes by inhibiting FBP1 while promoting the tumorigenicity of pancreatic cancer cells [J]. *Oncotarget* , 2015 , 6(25) : 21443–51. doi: 10.18632/oncotarget.4167.
- [7] Saini S , Tulla K , Maker A V , et al. Therapeutic advances in anaplastic thyroid cancer: a current perspective [J]. *Mol Cancer* , 2018 , 17(1) : 154. doi: 10.1186/s12943-018-0903-0.
- [8] Nebbioso A , Tambaro F P , Dell'Aversana C , et al. Cancer epigenetics: moving forward [J]. *PLoS Genet* , 2018 , 14 (6) : e1007362. doi: 10.1371/journal.pgen.1007362.
- [9] Berger L , Kolben T , Meister S , et al. Expression of H3K4me3 and H3K9ac in breast cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol* , 2020 , 146(8) : 2017–27. doi: 10.1007/s00432-020-03265-z.
- [10] Fukuda K , Shinkai Y. SETDB1-mediated silencing of retroelements [J]. *Viruses* , 2020 , 12 (6) : 596. doi: 10.3390/v12060596.
- [11] Cao W , Lee H , Wu W , et al. Multi-faceted epigenetic dysregulation of gene expression promotes esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Nat Commun* , 2020 , 11(1) : 3675. doi: 10.1038/s41467-020-17227-z.
- [12] Pellecchia S , Sepe R , Decaussin-Petrucci M , et al. The long non-coding RNA Prader willi/angelman region RNA5 (PAR5) is downregulated in anaplastic thyroid carcinomas where it acts as a tumor suppressor by reducing EZH2 activity [J]. *Cancers (Basel)* , 2020 , 12(1) : 235. doi: 10.3390/cancers12010235.
- [13] Borbone E , Troncone G , Ferraro A , et al. Enhancer of zeste homolog 2 overexpression has a role in the development of anaplastic thyroid carcinomas [J]. *J Clin Endocrinol Metab* , 2011 , 96(4) : 1029–38. doi: 10.1210/jc.2010-1784.
- [14] de Mello D C , Saito K C , Cristovão M M , et al. Modulation of EZH2 activity induces an antitumoral effect and cell redifferentiation in anaplastic thyroid cancer [J]. *Int J Mol Sci* , 2023 , 24(9) : 7872. doi: 10.3390/ijms24097872.
- [15] Lang M , Longerich T , Anamaterou C. Targeted therapy with vemurafenib in BRAF (V600E) -mutated anaplastic thyroid cancer [J]. *Thyroid Res* , 2023 , 16(1) : 5. doi: 10.1186/s13044-023-00147-7.
- [16] Esposito F , Tornincasa M , Pallante P , et al. Down-regulation of the miR-25 and miR-30d contributes to the development of anaplastic thyroid carcinoma targeting the polycomb protein EZH2 [J]. *J Clin Endocrinol Metab* , 2012 , 97(5) : E710–8. doi: 10.1210/jc.2011-3068.

The relationship between EZH2 methylation and thyroid cancer differentiation-related markers and its therapeutic value

Jing Lin¹ , Jiang Qi² , Gu Jiangning³ , Luo Haifeng⁴ , Guo Xiaoyi⁴ , Shen Tianci⁴ , Dai Zihao⁴ , Chen Dan¹

(¹Dept of Pathology ,⁴Dept of General Surgery , The First Hospital of Dalian Medical University , Dalian 116011;

²Dept of Pathology , Affiliated Zhongshan Hospital of Dalian University , Dalian 116001;

³Dept of Endoscopy , General Hospital of Northern Theater Command , Shenyang 110016)

Abstract Objective To investigate the role of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) –trimethylated lysine 27 of (下转第 706 页)

male SD rats were randomly divided into control group , PCPA model group (PCPA group) , chemical activation group (hM3Dq+CNO group) , and chemical control group (hM3Dq+Saline group) . The anxiety level of experimental rats was evaluated through open field experiments and elevated cross maze experiments. *In vivo* electroencephalography (EEG) was used to record propofol induced sleep and cortical EEG changes , and immunofluorescence staining was used to observe changes in c-Fos positive protein expression in 5-HT neurons. **Results** The behavioral results showed that compared with the chemical control group , the anxiety level of the chemical activation group was significantly lower ($P<0.05$) , and sleep duration was significantly prolonged ($P<0.05$) . The expression level of c-Fos positive protein in DRN5-HT neurons in the chemical activation group was higher ($P<0.05$) . The EEG results showed that the percentage of δ -band power between the chemical activation group and the chemical control group was higher ($P<0.05$) , the power percentage in the α -band was relatively low ($P<0.05$) . **Conclusion** Chemical activation of 5-HT neurons in the DRN region can improve anxiety levels and increase sleep duration in PCPA induced insomnia rats.

Key words 5-hydroxytryptamine; dorsal raphe; chemical genetics; insomnia; anxiety; rat

Fund programs National Natural Science Foundation of China (Nos.82360242 , 81860209) ; Scientific Research Project of Shihezi University(No.ZZZC2022082)

Corresponding author Li Yan , E-mail: 1249623003@qq.com

(上接第 696 页)

histone H3 (H3K27me3) axis in the dedifferentiation of thyroid cancer and its clinical value as a potential target for the treatment of anaplastic thyroid cancer (ATC) . **Methods** Immunohistochemical SP method was used to detect the expression of EZH2 , H3K27me3 , paired box gene 8 (PAX8) , thyroglobulin (TG) and thyroid transcription factor 1 (TTF1) in ATC and papillary thyroid carcinoma (PTC) and their adjacent tissues. The relationship between EZH2 and thyroid differentiation markers (PAX8 , TTF1 , TG) was further analyzed by gene expression omnibus (GEO) database. ATC cell lines 8305C and BHT-101 were cultured *in vitro*. Real-time reverse transcription PCR (RT-qPCR) was used to detect the expression of thyroid differentiation markers (TTF1 , PAX8) mRNA in ATC cell lines treated with EZH2 inhibitor (GSK126) , and evaluate the potential therapeutic effect of GSK126 *in vitro* . The effects of GSK126 and BRAF inhibitor vemurafenib on the proliferation of ATC cell lines were observed by cell proliferation assay. **Results** The expression of EZH2 in ATC tissues was significantly higher than that in papillary thyroid carcinoma and adjacent tissues ($P<0.05$) . The expression of H3K37me3 in ATC tissues was significantly lower than that in PTC tissues ($P<0.05$) . EZH2 was negatively correlated with PAX8 and TG expression levels , but not with TTF1 expression level. *In vitro* experiments , GSK126 could reverse the expression of thyroid differentiation markers PAX8 and TTF1 in ATC cell lines. GSK126 combined with BRAF inhibitor vemurafenib could significantly inhibit the growth of ATC cell lines. **Conclusion** The EZH2-H3K27me3 axis plays an important role in regulating thyroid specific markers , and the inhibition of EZH2 by small molecular compounds is a promising target for ATC treatment in the future.

Key words EZH2; H3K27me3; anaplastic thyroid cancer; dedifferentiation; methylation; GSK126

Fund program National Natural Science Foundation of China (No.81902382)

Corresponding author Chen Dan , E-mail: chendan78@dmu.edu.cn