DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20241212.002
网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/46.1049.R.20241212.1735.004

敲低*NSD2*对三阴性乳腺癌细胞基因表达谱及紫杉醇化疗敏感性的影响研究

陈 艳[1],赵金辉[2],胡诗涵[2],王 禹[2],潘 云[1,3],高 波[1,3]✉
(大理大学 1.医学部临床医学院,2.医学部基础医学院,3.第一附属医院病理科,云南 大理 671000)

[摘要] **目的**:探究敲低*NSD2*基因对三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer,TNBC)细胞基因表达谱及紫杉醇(paclitaxel,PTX)化疗敏感性的影响。**方法**:利用慢病毒shRNA载体介导敲低MDA-MB-231细胞中*NSD2*基因,使用基因表达谱芯片筛选差异表达基因,进行聚类分析、GO和KEGG富集分析。采用Realtime PCR和Western blot检测NSD2的mRNA及蛋白表达水平,在PTX作用条件下,Hoechst染色观察细胞的凋亡形态特征,Annexin V-FITC/PI法检测细胞的凋亡率,Western blot检测程序性细胞死亡通路相关差异基因的蛋白表达水平。利用TIMER2.0、UALCAN和Kaplan-Meier Plotter数据库分析乳腺癌组织、TNBC组织和正常乳腺组织中NSD2、程序性细胞死亡通路相关差异基因的表达以及在接受过化疗的TNBC患者中的预后评估价值。**结果**:基因芯片共筛选483个差异基因,包括324个上调基因和159个下调基因($P<0.01$);GO和KEGG富集分析发现差异表达基因与坏死性凋亡、凋亡等程序性细胞死亡信号通路显著相关($P<0.05$)。敲低*NSD2*基因显著增加PTX作用下MDA-MB-231细胞的凋亡率,程序性细胞死亡相关蛋白TNFSF10、TNFRSF10B、FAS、CASP1以及Cleaved PARP1表达也明显增强($P<0.05$)。与正常乳腺组织相比,乳腺癌和TNBC中NSD2和PARP1表达显著上调,而TNFSF10、FAS、CASP1表达均显著下调($P<0.001$);接受过化疗的TNBC患者中,NSD2高表达患者无复发生存率低于低表达患者,而TNFRSF10B、FAS、CASP1高表达患者预后优于低表达患者($P<0.05$)。**结论**:敲低*NSD2*改变TNBC细胞的基因表达谱,并通过诱导程序性死亡增强细胞对PTX化疗的敏感性,为寻找TNBC化疗耐药的分子靶标提供了新的见解。

[关键词] 三阴性乳腺癌;NSD2;基因表达谱;紫杉醇;化疗敏感性
[中图分类号] R737.9 [文献标志码] A [文章编号] 2097-5953(2025)21-1639-13

Effects of *NSD2* knockdown on gene expression profile and chemosensitivity to paclitaxel in triple negative breast cancer cells

CHEN Yan[1], ZHAO Jinhui[2], HU Shihan[2], WANG Yu[2], PAN Yun[1,3], GAO Bo[1,3]✉
(1. *College of Clinical Medicine, Health Science Center, Dali University, Dali* 671000, *China*; 2. *College of Basic Medicine, Health Science Center, Dali University, Dali* 671000, *China*; 3. *Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Dali University, Dali* 671000, *China*)

[*Foundation Project*]: *This study was supported by the National Natural Science Foundation of China* (82160582); *Yunnan Province Science and Technology Department Fundamental Research Project* (202201AT070003); *Scientific Research Foundation of Dali* (2021KBG036); *the First Affiliated Hospital of Dali University Discipline Building Key Project* (DYFGG2022-01); *the First Affiliated Hospital of Dali University Research Center Project* (DFYXY009)

[*Author*]: *CHEN Yan*, *E-mail*: 3530203711@qq.com.
[*Correspondence to*]: *GAO Bo*, *Associate Professor*, *Master's Supervisor*, *E-mail*: gaobo229@163.com.

Received: 2024-07-30 *Revised*: 2024-11-22 *JHMU*, 2025;31(21):1639-1651

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(82160582);云南省科技厅基础研究计划面上项目(202201AT070003);大理市科研基金资助项目(2021KBG036);大理大学第一附属医院学科建设骨干项目(DFYGG2022-01);大理大学第一附属医院临床医学研究中心项目(DFYXY009)
[作者简介] 陈艳,E-mail:3530203711@qq.com。
[通讯作者] 高波,副教授,硕士研究生导师,E-mail:gaobo229@163.com。
[收稿日期] 2024-07-30 [修回日期] 2024-11-22 网络出版时间:2024-12-13 11:06:17

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[Abstract] Objective: To investigate the effects of *NSD2* knockdown on gene expression profile and the chemosensitivity to paclitaxel (PTX) in triple negative breast cancer (TNBC) cells. Methods: Lentviral shRNA vector was used to mediate *NSD2* gene knockdown in MDA-MB-231 cells. Gene expression microarrays were used to screen for differentially expressed genes and cluster analysis, GO and KEGG enrichment analysis were performed. Realtime PCR and Western blot were used to determine the amount of NSD2 mRNA and protein expression. Upon the treatment of PTX, the morphology of apoptotic cells was observed by Hoechst staining, and the apoptosis rate was assessed by Annexin V-FITC/PI staining. Western blot analysis was performed to detect the protein expression levels of differential genes associated with programmed cell death pathway. TIMER2.0, UALCAN, and Kaplan-Meier Plotter databases were used to analyze the expression of NSD2 and differential genes associated with programmed cell death pathway in breast cancer, TNBC, and normal breast tissues, as well as their prognostic value in TNBC patients who had received chemotherapy. Results: A total of 483 differentially expressed genes were screened by microarray, including 324 up-regulated genes and 159 down-regulated genes ($P<0.01$). GO and KEGG enrichment analysis showed that differentially expressed genes were significantly involved in programmed cell death signaling pathways such as apoptosis and necroptosis ($P<0.05$). Knockdown of NSD2 significantly increased the apoptosis rate of MDA-MB-231 cells upon PTX treatment, and the expression levels of proteins related to programmed cell death, including TNFSF10, TNFRSF10B, FAS, CASP1, and Cleaved PARP1, were also significantly enhanced ($P<0.05$). Compared to normal breast tissues, the expression levels of NSD2 and PARP1 in breast cancer and TNBC were significantly up-regulated, while the expression levels of TNFSF10, FAS and CASP1 were significantly down-regulated ($P<0.001$). Among TNBC patients who had received chemotherapy, the relapse-free survival rate of patients with high NSD2 expression was lower than that of patients with low expression, whereas patients with high expression of TNFRSF10B, FAS, or CASP1 had a better prognosis than those with low expression ($P<0.05$). Conclusion: Knockdown of *NSD2* changes the gene expression profile of TNBC cells and increases the chemosensitivity to PTX by inducing programmed death, providing a novel insight into the molecular targets of chemotherapy resistance in TNBC.

[Key words] Triple-negative breast cancer; NSD2; Gene expression profile; Paclitaxel; Chemosensitivity

乳腺癌是一种高度异质的疾病，其不同类型在生物学特征、诊断方法、治疗手段及预后方面存在显著差异[1]。三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer，TNBC)是一种分子亚型，其特征在于雌激素受体(estrogen receptor，ER)、孕激素受体(progesterone receptor，PR)以及人类表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2，HER2)均为阴性。这种类型的乳腺癌约占所有乳腺癌病例的15%～20%，多见于40岁以下的青年女性[2]。高异质性的TNBC侵袭性较强且易复发，预后不良[3]。目前，TNBC的治疗依然是临床上面临的重大挑战，其治疗策略主要包括手术和化疗，而患者通常无法从内分泌治疗和靶向治疗中获益[4]。研究表明，只有大约30%的TNBC患者对化疗具有敏感性，大部分患者在治疗后会出现耐药及肿瘤转移，导致其复发率和死亡率仍高于其他乳腺癌亚型[5]。因此，迫切需要寻找更多可用于预后评估和治疗的分子靶点，并且提升化疗药物的敏感性，降低耐药性的问题亟待解决。

Nuclear receptor-binding SET domain protein 2 (NSD2)，又称为Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1或multipe myeloma SET domain-containing protein，是组蛋白甲基转移酶NSD家族中的一个重要成员[6]。近年来的研究普遍认为，*NSD2*具有癌基因的特性，在多种恶性肿瘤中表现出高表达，例如多发性骨髓瘤[7]、髓系白血病[8]、前列腺癌[9]、肾细胞癌[10]、肝细胞癌[11]、结直肠癌[12]、浆液性卵巢癌[13]、子宫内膜癌[14]等，其表达水平与肿瘤的分期、分级、患者的生存率低以及预后不良等因素密切相关。目前NSD2在TNBC中的研究成果罕见。研究表明，NSD2通过直接调控ADAM9和EGFR的表达，介导生长因子的释放，并激活EGFR-AKT信号通路，从而导致TNBC细胞对EGFR抑制剂吉非替尼的耐药性[15]。本课题组的前期研究结果显示，NSD2的高表达与乳腺癌的分级、淋巴结转移、无复发生存期及无远处转移生存期密切相关。此外，NSD2在TNBC中的表达水平高于其他乳腺癌亚型；EZH2/NSD2调控轴促进TNBC细胞增殖、迁移、侵袭[16]。

为探究NSD2及其下游信号通路的潜在功能效应，本研究在TNBC细胞系MDA-MB-231中，通过敲低*NSD2*的表达，利用基因芯片技术对差异表达基因进行了筛选，利用GO分析和KEGG分析明确差异基因参与的生物学过程和信号通路，并进一步阐明了敲低*NSD2*通过促进程序性细胞死亡增强TNBC对紫杉醇(paclitaxel，PTX)化疗敏感性的机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

从中国科学院典型培养物保藏委员会昆明细胞库购买人TNBC细胞株MDA-MB-231。该细胞株在含有10%胎牛血清(Gibco公司)的DMEM培养基(Gibco公司)中进行培养,并置于37 ℃、5%的CO_2培养箱中进行培养。

1.2 细胞转染与稳定株筛选

将MDA-MB-231细胞以3×10^5/孔接种于6孔板,将NSD2 shRNA干扰慢病毒载体(上海吉玛基因股份有限公司)、Polybrene(5 μg/mL)(上海吉玛基因股份有限公司)加入培养基感染细胞,感染复数为20。感染72 h后,嘌呤霉素(1 μg/mL)(上海吉玛基因股份有限公司)筛选48 h,建立稳定敲低*NSD2*基因的MDA-MB-231细胞株。

1.3 Realtime PCR

使用TRIzol法提取各组细胞的总RNA,利用FastKing cDNA第一链合成试剂盒(天根生化科技有限公司)合成cDNA。采用Talent荧光定量检测试剂盒(天根生化科技有限公司)进行Realtime PCR,检测各组细胞*NSD2*基因mRNA表达,以*GAPDH*作为内参基因。反应条件为:95 ℃预变性3 min,95 ℃ 5 s、60 ℃ 15 s,共40个循环。*NSD2*上游引物序列为5′-ACTCCTCAAAAGACGGCAGA-3′,下游引物序列为5′-TGGTGTTGTAGCGTGCTCTC-3′。*GAPDH*上游引物序列为5′-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3′,下游引物序列为5′-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3′。$2^{-\Delta\Delta CT}$计算各组细胞*NSD2*基因表达差异。

1.4 基因芯片

基因芯片检测委托吉凯生物科技有限公司完成。提取各组细胞总RNA,经过RNA质检及杂交后,使用Gene Chip Fluidics Station 450仪器对芯片进行自动洗染,并扫描后获取原始数据。对原始芯片进行评估合格后,将原始数据归一化处理。随后,通过计算组间样本基因表达差异倍数(fold change,FC)和*P*值,筛选出差异表达基因。最终,计算结果经过错误发现率(false discovery rate,FDR)校正,筛选标准为|FC|>1.5且FDR<0.05。

1.5 基因功能及信号通路富集分析

使用DAVID数据库(https://david.ncifcrf.gov/)对筛选出来的差异表达基因进行了GO功能富集和KEGG信号通路富集分析。$P<0.05$为差异具有统计学意义。

1.6 Hoechst染色

将稳定转染shNC、shNSD2#1、shNSD2#2的细胞以3×10^5接种到6孔板中,加入终浓度为80 ng/mL的PTX工作液并设阴性对照,使用Hoechst 33258染色试剂盒(碧云天生物技术有限公司)进行染色:培养48 h后加固定液1 mL/孔固定20 min,加染色液避光孵育,荧光显微镜随机计算5个视野(400×)中的凋亡细胞比率。

1.7 流式细胞术凋亡检测

将稳定转染shNC、shNSD2#1、shNSD2#2的细胞以3×10^5接种到6孔板中,加入终浓度为80 ng/mL的PTX工作液并设阴性对照,培养48 h后,采用细胞凋亡Annexin V-FITC/PI双染试剂盒(碧云天生物技术有限公司),通过流式细胞术检测细胞凋亡率。

1.8 Western blot

将稳定转染shNC、shNSD2#1、shNSD2#2的细胞以3×10^5接种到6孔板中,加入终浓度为80 ng/mL的PTX工作液并设阴性对照,培养48 h后,利用RIPA裂解液(康为生物科技有限公司)提取各组细胞总蛋白,紫外分光光度计测定各组细胞蛋白浓度。随后按试剂盒说明书进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。蛋白转印至PVDF膜,使用5%脱脂牛奶封闭2 h,随后以1∶1 000的稀释比例进行一抗4 ℃过夜孵育,最后以1∶2 000的稀释比例在室温下孵育二抗1 h。所有抗体购自Abcam公司。使用ECL试剂盒(碧云天生物技术有限公司)显影,在蛋白印迹检测系统进行检测,利用ImageJ分析蛋白表达差异。

1.9 数据库中基因表达差异分析

利用TIMER2.0数据库和UALCAN数据库分析乳腺癌组织、TNBC组织和正常乳腺组织中*NSD2*、*TRAIL*、*FAS*、*DR5*、*CASP1*、*PARP1*基因表达差异。

1.10 生存分析

使用Kaplan-Meier Plotter(https://kmplot.com/analysis/)分析*NSD2*、*TRAIL*、*FAS*、*DR5*,*CASP1*、*PARP1*基因表达水平与接受过化疗的TNBC患者无复发生存期之间的关系。筛选条件为ER negative、PR negative、HER2 negative、patients with chemotherapy。

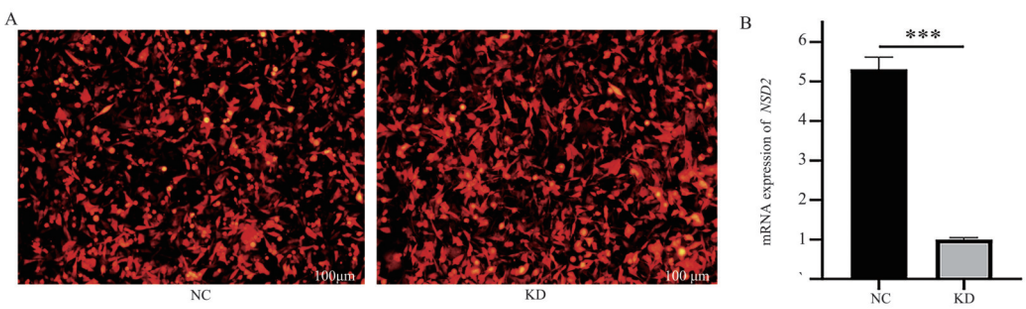
1.11 统计学处理

本研究采用SPSS 17.0软件对所获得的结果进行了统计分析。计量资料使用均值±标准差($\bar{x}\pm s$)进行描述,两组间数据采用*t*检验进行分析,多组间数据采用单因素方差分析进行比较。$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　慢病毒介导敲低MDA-MB-231细胞中NSD2的表达

本研究采用携带红色荧光蛋白的慢病毒载体，将shNSD2#1（KD组）和阴性对照shRNA-NC（NC组）转染入MDA-MB-231细胞中。转染72 h后，通过荧光倒置显微镜观察，发现红色荧光的表达强度超过90%（图1A）。为评估*NSD2*的mRNA水平，本研究进行了Realtime PCR检测，结果显示，与NC组相比，KD组中*NSD2*的mRNA表达水平显著降低，敲低效率达到81.2%，且差异具有统计学意义（$P<0.001$）（图1B）。



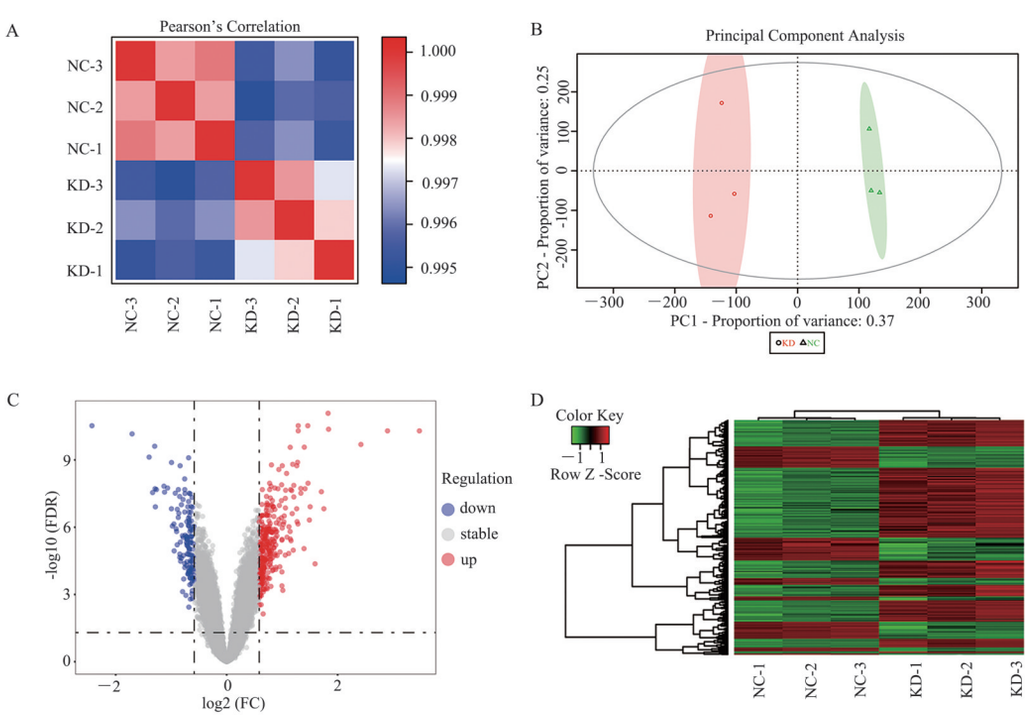
A：MDA-MB-231细胞通过慢病毒shRNA-NSD2侵染后的荧光图像；B：Realtime PCR检测NC组与KD组细胞中*NSD2* mRNA表达水平的变化；$^{***}P<0.001$

图1　在MDA-MB-231细胞系中敲低*NSD2*基因表达的结果

Fig 1　Knockdown of *NSD2* gene in MDA-MB-231 cell line

2.2　敲低*NSD2*的MDA-MB-231细胞差异基因表达谱

为探究*NSD2*敲低对TNBC细胞基因表达的影响，本课题组使用基因芯片检测MDA-MB-231^{NC}和MDA-MB-231^{KD}细胞的基因表达谱。不同样本中基因表达水平的皮尔森相关性分析表明生物学可重复性，提示同一组内重复样本的基因表达趋势相似度高（图2A）。主成分分析表明在同一组内，样



A：基因芯片样本之间的皮尔森相关系数分布图；B：基因芯片样本的主成分分析图；C：基因表达谱芯片数据中差异基因的火山图；D：差异表达基因的层次聚类热图

图2　敲低*NSD2*改变MDA-MB-231细胞基因表达谱

Fig 2　Knockdown of *NSD2* changed the gene expression profile of MDA-MB-231 cells

本之间的聚集趋势十分明显,而在NC组与KD组之间则呈现出显著的分离趋势。这表明组内样本的相似性较高,而组间存在显著差异(图2B)。通过对*NSD2*表达进行敲低处理后,MDA-MB-231细胞的基因表达谱发生了显著变化,最终识别出483个差异基因,其中上调基因有324个,下调基因有159个(|FC|>1.5且FDR<0.05)。差异表达基因的火山分布图在文中显示(图2C)。层次聚类分析显示MDA-MB-231^{NC}和MDA-MB-231^{KD}细胞的基因表达模式有显著差异(图2D)。表达倍数变化排名前20的上调及下调基因见表1、2。

表1 MDA-MB-231细胞中敲低*NSD2*后显著上调的差异基因(排名前20)

Tab 1 Significantly differentially upregulated genes after knockdown of *NSD2* in MDA-MB-231 cells (top 20)

Gene symbol	Gene title	|FC|	*P*	FDR
HSPA7	heat shock protein family A (Hsp70) member 7	7.45	9.41E−15	3.37E−11
HSPA6	heat shock protein family A (Hsp70) member 6	5.34	4.21E−14	1.18E−10
CH25H	cholesterol 25-hydroxylase	3.57	7.38E−15	2.95E−11
CXCL10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	3.36	2.72E−10	9.64E−08
EGR1	early growth response 1	3.32	1.28E−08	1.58E−06
MAL2	mal, T-cell differentiation protein 2 (gene/pseudogene)	3.26	2.31E−11	1.59E−08
CAPN8	calpain 8	3.01	7.37E−07	3.09E−05
IFIT2	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 2	2.90	3.49E−15	2.29E−11
UCA1	urothelial cancer associated 1 (non-protein coding)	2.76	7.50E−12	7.91E−09
OASL	2′-5′-oligoadenylate synthetase-like	2.75	2.03E−15	1.90E−11
RSAD2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2	2.66	1.30E−11	1.14E−08
IFIT1	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1	2.63	8.39E−14	1.96E−10
RAB17	RAB17, member RAS oncogene family	2.63	8.11E−08	6.06E−06
NCF2	neutrophil cytosolic factor 2	2.52	4.00E−11	2.28E−08
RAB37	RAB37, member RAS oncogene family	2.52	1.38E−11	1.18E−08
ELF3	E74-like factor 3 (ets domain transcription factor, epithelial-specific)	2.45	3.17E−10	1.06E−07
HSPA1A	heat shock protein family A (Hsp70) member 1A	2.45	5.33E−12	5.99E−09
HSPA1B	heat shock protein family A (Hsp70) member 1B	2.45	5.33E−12	5.99E−09
ATF3	activating transcription factor 3	2.41	1.91E−09	3.96E−07
IFIH1	interferon induced, with helicase C domain 1	2.40	1.13E−12	1.48E−09

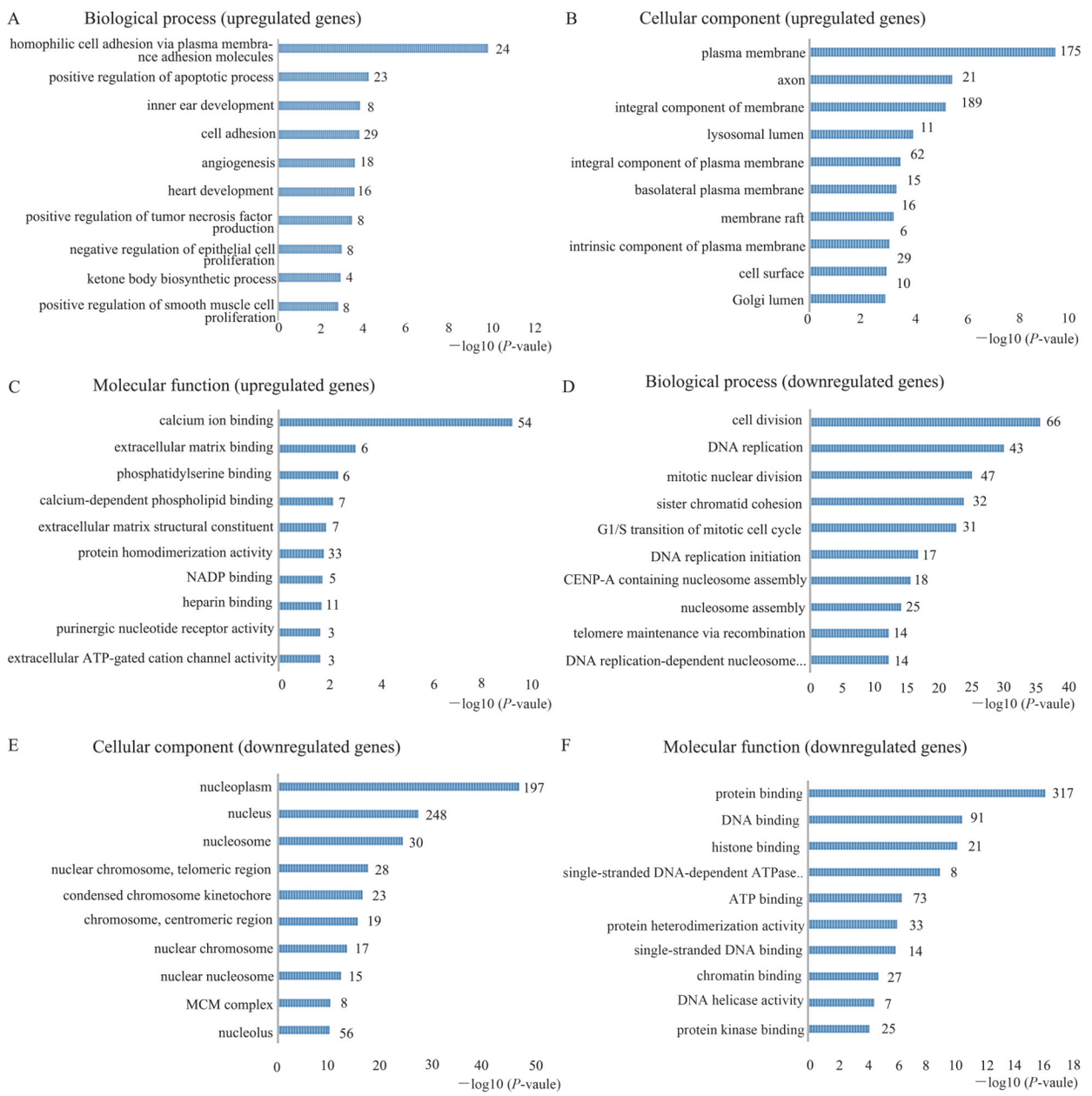
表2 MDA-MB-231细胞中敲低*NSD2*后显著下调的差异基因(排名前20)

Tab 2 Significantly differentially downregulated genes after knockdown of *NSD2* in MDA-MB-231 cells (top 20)

Gene symbol	Gene title	|FC|	*P*	FDR
GNPDA1	glucosamine-6-phosphate deaminase 1	2.63	3.05E−13	5.46E−10
AMD1P3	adenosylmethionine decarboxylase 1 pseudogene 3	2.52	3.60E−11	2.10E−08
SGMS2	sphingomyelin synthase 2	2.48	7.53E−11	3.59E−08
ISCA1	iron-sulfur cluster assembly 1	2.46	8.48E−14	1.96E−10
KDM3A	lysine (K)-specific demethylase 3A	2.45	1.78E−11	1.41E−08
HOMER1	homer scaffolding protein 1	2.22	5.76E−09	9.08E−07
ATP2B1	ATPase, Ca^{2+} transporting, plasma membrane 1	2.19	1.28E−11	1.14E−08
SERPINB9	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 9	2.17	3.48E−11	2.10E−08
SCYL2	SCY1-like, kinase-like 2	2.09	1.70E−11	1.40E−08
AMD1	adenosylmethionine decarboxylase 1	2.00	1.53E−10	6.45E−08
TMX4	thioredoxin-related transmembrane protein 4	1.99	3.60E−10	1.18E−07
XK	X-linked Kx blood group	1.97	3.38E−09	6.08E−07
RRP15	ribosomal RNA processing 15 homolog	1.93	2.69E−09	5.00E−07
GAL	galanin/GMAP prepropeptide	1.93	1.00E−07	7.12E−06
LCLAT1	lysocardiolipin acyltransferase 1	1.90	4.45E−11	2.40E−08
HGSNAT	heparan-alpha-glucosaminide N-acetyltransferase	1.88	5.30E−09	8.63E−07
LIN9	lin-9 DREAM MuvB core complex component	1.87	7.27E−09	1.04E−06
AEBP2	AE binding protein 2	1.86	4.22E−08	3.70E−06
PMEPA1	prostate transmembrane protein, androgen induced 1	1.85	3.98E−10	1.28E−07
C7orf60	chromosome 7 open reading frame 60	1.83	1.20E−09	2.75E−07

2.3　差异表达基因的功能富集分析

为了全面了解差异基因的功能，本课题组使用DAVID在线分析工具对显著性差异基因进行GO功能富集分析。依据*P*值大小排序，在上调差异基因中，生物学过程主要涉及质膜黏附分子介导的同型细胞黏附（homophilic cell adhesion *via* plasma membrane adhesion molecules）、凋亡过程的正向调控（positive regulation of apoptotic process）、内耳发育（inner ear development）、细胞黏附（cell adhesion）、血管生成（angiogenesis）等（图3A）；细胞成分主要涉及质膜（plasma membrane）、轴突（axon）、膜整体成分（integral component of membrane）、溶酶体管腔（lysosomal lumen）、质膜整体成分（integral component of plasma membrane）等（图3B）；分子功能主要涉及钙离子结合（calcium ion binding）、细胞外基质结合（extracellular matrix binding）、磷脂酰丝氨酸结合（phosphatidylserine binding）、钙依赖性磷脂结合（calcium-dependent phospholipid binding）、细



A：上调差异基因的生物学过程富集分析；B：上调差异基因的细胞成分富集分析；C：上调差异基因的分子功能富集分析；D：下调差异基因的生物学过程富集分析；E：下调差异基因的细胞成分富集分析；F：下调差异基因的分子功能富集分析

图3　差异表达基因的GO功能富集分析

Fig 3　GO functional enrichment analysis of differentially expressed genes

胞外基质结构成分(extracellular matrix structural constituent)等(图3C)。在下调差异基因中,生物学过程主要涉及细胞分裂(cell division)、DNA复制(DNA replication)、有丝分裂核分裂(mitotic nuclear division)、姐妹染色单体凝聚(sister chromatid cohesion)、有丝分裂细胞周期的G1/S期转变(G1/S transition of mitotic cell cycle)等(图3D);细胞成分主要涉及核质(nucleoplasm)、细胞核(nucleus)、核小体(nucleosome)、核染色体,端粒区(nuclear chromosome,telomeric region)、染色体着丝粒浓缩(condensed chromosome kinetochore)等(图3E);分子功能主要涉及蛋白质结合(protein binding)、DNA连接(DNA binding)、组蛋白结合单链(histone binding single-stranded)、DNA依赖的ATP酶活性(DNA-dependent ATPase activity)、ATP连接(ATP binding)等(图3F)。

2.4 差异表达基因的KEGG通路富集分析

使用DAVID在线分析工具对差异基因进行KEGG注释,表3显示了$P<0.05$的前20个通路。表3中差异表达基因富集较多的信号通路分别为细胞因子-细胞因子受体相互作用(cytokine-cytokine receptor interaction)、坏死性凋亡(necroptosis)、NOD样受体信号通路(NOD-like receptor signaling pathway)、MAPK信号通路(MAPK signaling pathway)、TNF信号通路(TNF signaling pathway)、凋亡(Apoptosis)信号通路等。

2.5 敲低*NSD2*促进程序性细胞死亡增加MDA-MB-231细胞对PTX的化疗敏感性

鉴于差异表达基因富集于坏死性凋亡、凋亡等程序性细胞死亡信号通路,本课题组探究了敲低*NSD2*是否能通过促进细胞程序性死亡增强对化疗药物的敏感性。通过慢病毒载体介导转染shNSD2#1、shNSD2#2及阴性对照shNC,用嘌呤霉素筛选48 h并传代,建立稳定敲低*NSD2*的MDA-MB-231细胞株。稳定敲低*NSD2*后,其mRNA及蛋白表达水平均显著下调($P<0.01$)(图4A、B)。为研究敲低*NSD2*对细胞化疗敏感性的影响,观察细胞的形态学变化。光镜下,给药前shNC组细胞生长良好,shNSD2#1组、shNSD2#2组细胞略有减少,但未见明显差异;加入PTX后细胞数量减少,与shNC组相比,敲低*NSD2*组出现细胞不规则收缩、变圆等形态(图4C)。Hoechst染色显示给药前各组细胞数量未见明显差异,细胞核染色均匀,呈椭圆形,其间未见明显凋亡细胞,PTX作用48 h的情况下,shNSD2#1组、shNSD2#2组细胞数量显著减少,凋亡细胞显著增多(图4D)。通过An-

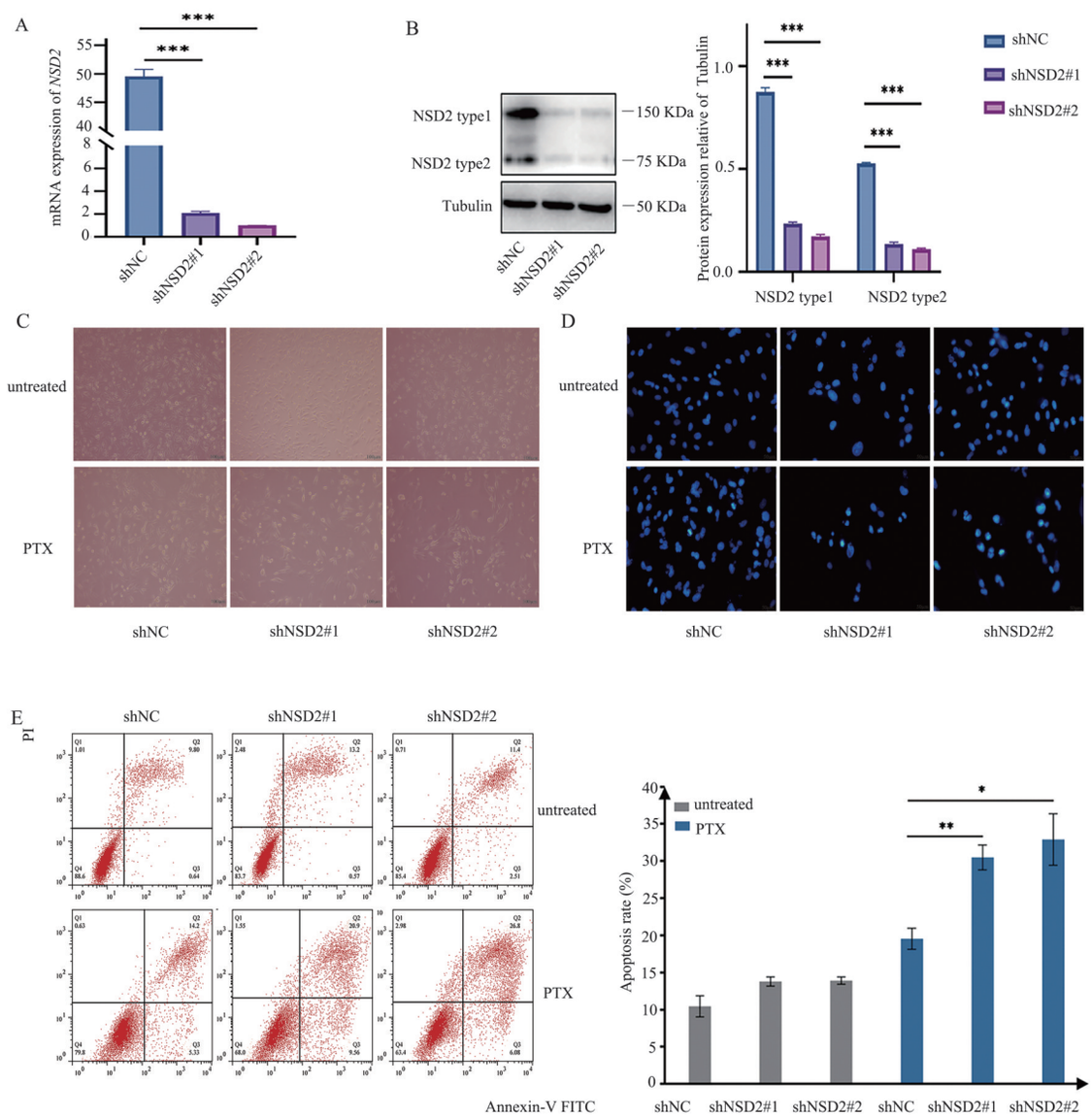
表3 MDA-MB-231细胞中敲低*NSD2*后差异基因KEGG信号通路富集分析

Tab 3 KEGG signaling pathway enrichment analysis of differentially expressed genes after knockdown of *NSD2* in MDA-MB-231 cells

ID	Description	Gene ratio	*P*	Count
hsa04060	Cytokine-cytokine receptor interaction	17/206	3.57E−03	17
hsa04217	Necroptosis	14/206	1.34E−04	14
hsa04621	NOD-like receptor signaling pathway	14/206	5.14E−04	14
hsa04010	MAPK signaling pathway	14/206	3.55E−02	14
hsa04668	TNF signaling pathway	11/206	2.74E−04	11
hsa05130	Pathogenic Escherichia coli infection	10/206	4.89E−02	10
hsa05133	Pertussis	9/206	2.44E−04	9
hsa04064	NF-kappa B signaling pathway	9/206	2.41E−03	9
hsa04926	Relaxin signaling pathway	9/206	9.88E−03	9
hsa04210	Apoptosis	9/206	1.37E−02	9
hsa04141	Protein processing in endoplasmic reticulum	9/206	4.98E−02	9
hsa04933	AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	8/206	6.67E−03	8
hsa05142	Chagas disease	8/206	7.45E−03	8
hsa04620	Toll-like receptor signaling pathway	8/206	8.40E−03	8
hsa04728	Dopaminergic synapse	8/206	3.12E−02	8
hsa00500	Starch and sucrose metabolism	7/206	5.02E−05	7
hsa05134	Legionellosis	7/206	9.68E−04	7
hsa04623	Cytosolic DNA-sensing pathway	7/206	1.76E−03	7
hsa04970	Salivary secretion	7/206	1.45E−02	7
hsa04061	Viral protein interaction with cytokine and cytokine receptor	7/206	2.15E−02	7

nexin V-FITC/PI双染，采用流式细胞仪来分析细胞凋亡的状况。敲低*NSD2*，细胞凋亡率略有升高，但差异不具有统计学意义。PTX作用下，敲低NSD2细胞的早期凋亡率、晚期凋亡率和总凋亡率均明显增加（$P<0.05$）（图4E）。

敲低*NSD2*基因后，基因芯片分析发现的MDA-MB-231细胞中一些程序性细胞死亡通路相关的差异基因表达发生变化，见表4。进一步通过Western blot检测程序性细胞死亡通路相关的差异表达基因，包括3个肿瘤坏死因子超家族成员如TNFSF10、TNFRSF10B、FAS，1个CASP家族成员CASP1，2个细胞凋亡标志物PARP1、Cleaved PARP1。结果显示PTX作用情况下，敲低NSD2的细胞中TNFSF10、TNFRSF10B、FAS、CASP1以及Cleaved PARP1表达均明显高于NC组（$P<0.05$），PARP1表达变化不明显（图5）。以上结果提示，敲低*NSD2*可以通过调节程序性细胞死亡通路相关差异基因，促进程序性细胞死亡增加MDA-MB-231细胞对PTX的化疗敏感性。



A：Realtime PCR检测细胞中*NSD2* mRNA表达水平；B：Western blot检测细胞中NSD2蛋白表达水平；C：光镜下观察敲低NSD2联合PTX处理后对细胞形态学变化；D：Hoechst染色观察敲低NSD2联合PTX处理后细胞形态学变化；E：Annexin V-FITC/PI法结合流式细胞术检测敲低NSD2联合PTX处理后细胞凋亡率；$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$

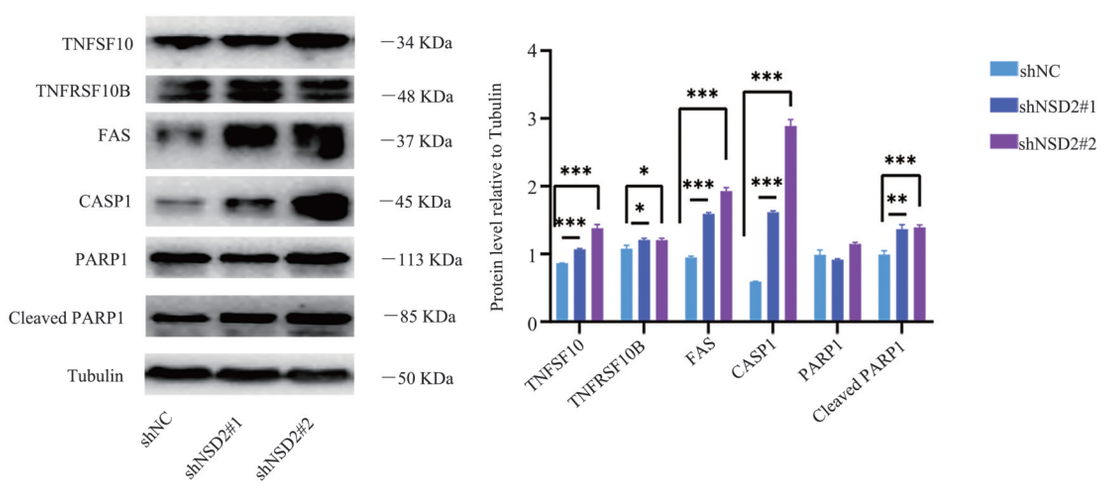
图4　敲低*NSD2*增加MDA-MB-231细胞对紫杉醇的化疗敏感性

Fig 4　Knockdown of *NSD2* increased the chemosensitivity to paclitaxel in MDA-MB-231 cells

表4　MDA-MB-231细胞中敲低*NSD2*后程序性细胞死亡相关差异基因

Tab 4　Significantly expressed genes associated with programmed cell death after knockdown of *NSD2* in MDA-MB-231 cells

Gene symbol	Gene title	|FC|	*P*
TNFSF10	tumor necrosis factor superfamily member 10	2.33	2.16E−11
TNFSF15	tumor necrosis factor superfamily member 15	1.99	2.35E−06
TNFSF9	tumor necrosis factor superfamily member 9	1.73	2.37E−08
FAS	Fas cell surface death receptor	1.67	2.98E−07
CASP1	caspase 1	1.66	1.93E−07
TNFAIP3	TNF alpha induced protein 3	1.65	2.52E−07
CASP4	caspase 4	1.61	9.72E−08
TNFRSF9	tumor necrosis factor receptor superfamily member 9	1.59	1.47E−06
TNFRSF10B	tumor necrosis factor receptor superfamily member 10b	1.56	9.13E−07
TRAF1	TNF receptor associated factor 1	1.51	3.00E−06
THRIL	TNF and HNRNPL related immunoregulatory long non-coding RNA	1.50	4.17E−05
PARP1	Poly (ADP-ribose) polymerase 1	1.68	2.08E−08



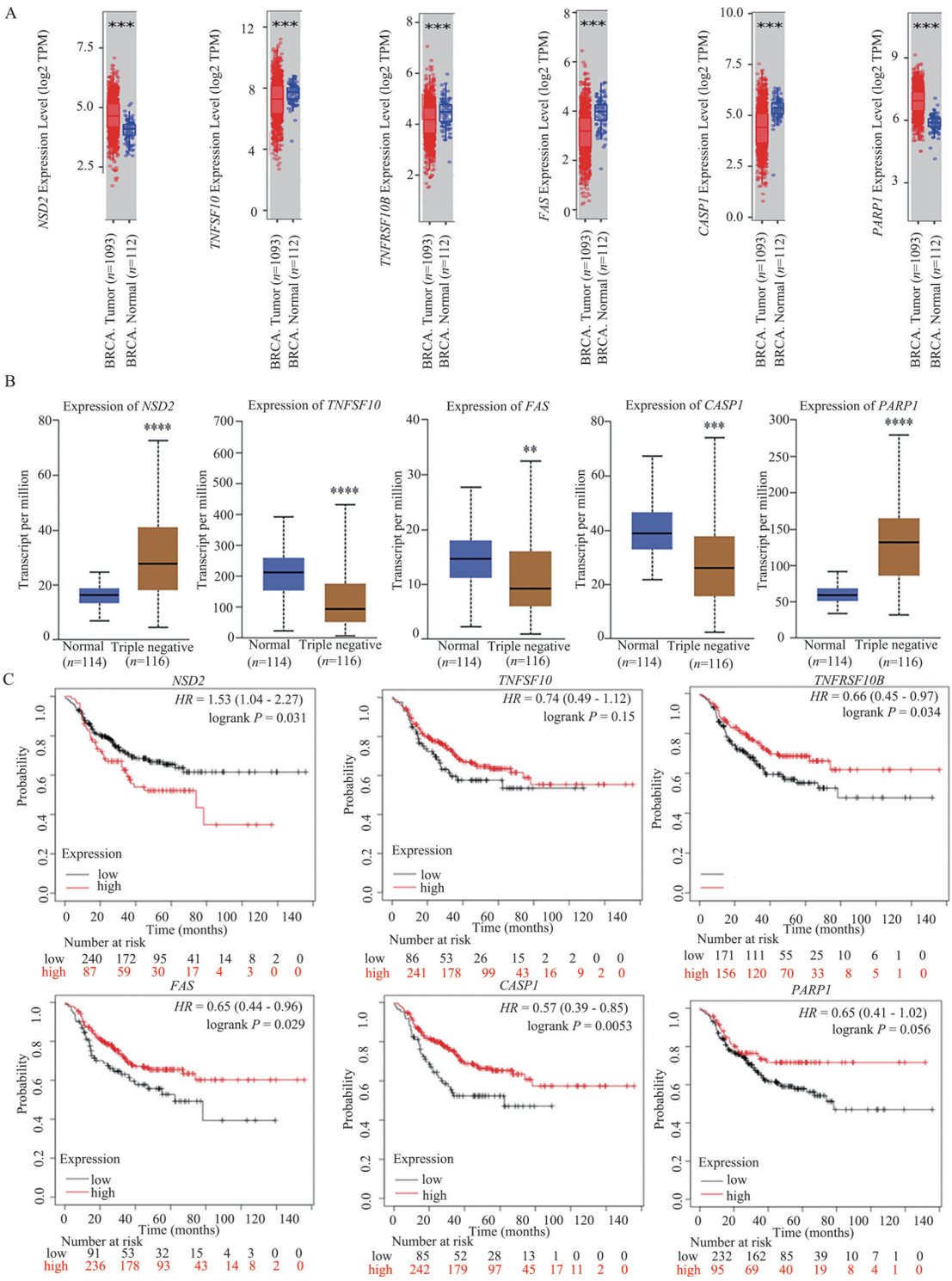
$^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$

图5　敲低*NSD2*联合紫杉醇处理对细胞程序性死亡相关蛋白表达的影响

Fig 5　Effects of *NSD2* knockdown on the expression of programmed cell death related proteins upon paclitaxel treatment

2.6　程序性细胞死亡通路相关差异基因对TNBC预后的影响

为探究*NSD2*及程序性细胞死亡通路相关差异基因在肿瘤组织中的表达及预后评估价值，通过TIMER2.0数据库分析*NSD2*及程序性细胞死亡通路相关差异基因在乳腺癌中表达情况，发现与正常乳腺组织相比，乳腺癌中*NSD2*和*PARP1*表达均显著上调（$P<0.001$），而*TNFSF10*、*TNFRSF10B*、*FAS*、*CASP1*表达均显著下调（图6A）。通过UALCAN数据库进一步分析显示，TNBC中*TNFSF10*、*FAS*、*CASP1*表达均显著下调，*NSD2*和*PARP1*表达显著上调（$P<0.001$）（图6B）。Kaplan-Meier Plotter数据库显示，接受过化疗的TNBC患者中，*NSD2*高表达患者预后差于低表达患者（*HR*=1.53，*P*=0.031），*TNFRSF10B*（*HR*=0.66，*P*=0.034）、*FAS*（*HR*=0.65，*P*=0.029）、*CASP1*（*HR*=0.57，*P*=0.0053）高表达患者预后优于低表达患者。*TNFSF10*（*HR*=0.74，*P*=0.15）、*PARP1*（*HR*=0.65，*P*=0.056）表达与接受过化疗的TNBC患者预后无显著相关性。



A：TIMER2.0数据库分析*NSD2*及程序性细胞死亡相关差异基因在乳腺癌中的表达情况；B：UALCAN数据库分析*NSD2*及程序性细胞死亡相关差异基因在TNBC中的表达情况；C：Kaplan-Meier Plotter数据库分析*NSD2*及程序性细胞死亡相关差异基因表达与接受过化疗的TNBC患者无复发生存期之间的关系；$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$，$^{****}P<0.000\ 1$

图6　NSD2及程序性细胞死亡相关差异基因在乳腺癌中表达和预后评估价值

Fig 6　Expression and prognostic value of NSD2 and differential genes related to programmed cell death in breast cancer

3　讨论

越来越多的研究证据表明，*NSD2*基因在乳腺癌的发生与发展中扮演着重要角色。在乳腺癌中，*NSD2*的高表达与乳腺癌患者的肿瘤大小、转移和病理分期有关，敲除*NSD2*可抑制乳腺癌细胞株的生长、增殖、迁移、侵袭和上皮-间质转化[17]。前期研

究发现,*NSD2*在乳腺癌组织中明显高表达,并与患者的肿瘤病理分级及淋巴结转移和预后显著相关[16]。高表达的NSD2可通过激活EGFR-AKT信号通路从而促进TNBC细胞对EGFR抑制剂的耐药性[15],组蛋白甲基转移酶的间接抑制剂DZNep,能有效诱导NSD2蛋白降解,减少细胞产生的GSH和NADPH,并激发活性氧升高,抑制他莫西芬耐药的乳腺癌细胞存活和异种移植瘤生长[18]。*NSD2*能够增强FoxM1的表达,促进β-catenin的核内定位,从而激活Wnt/β-catenin信号通路,促进乳腺癌的发生发展[17]。高频表达的*NSD2*是治疗化生性乳腺癌的潜在靶点[19]。

本课题组前期证实*NSD2*在TNBC中的表达高于其他乳腺癌亚型;EZH2通过调控*NSD2*促进TNBC细胞增殖、迁移、侵袭[16]。本研究在TNBC细胞系MDA-MB-231中敲低*NSD2*表达,观察基因表达谱的改变,以探索与*NSD2*作用相关的差异基因。对基因芯片数据进行分析后发现,*NSD2*敲低可导致MDA-MB-231细胞基因表达谱发生显著改变,共发现表达具有明显差异的基因483个,其中324个基因表达显著上调,159个基因表达显著下调。GO功能富集分析显示,上调基因在正向调控凋亡过程、正向调控肿瘤坏死因子的产生、负向调控上皮细胞的增殖等过程中得到富集,下调基因在细胞分裂、DNA复制、有丝分裂细胞周期G1/S转变等过程中得到富集。KEGG通路富集分析发现,差异基因在多条肿瘤相关通路被富集,如坏死性凋亡、TNF信号通路、细胞凋亡等多条程序性死亡相关信号通路,提示敲低*NSD2*可能会影响TNBC细胞的程序性死亡。

本研究发现敲低*NSD2*表达可以降低TNBC细胞对PTX的耐受力,显著增加PTX诱导的细胞凋亡。进一步检测程序性死亡相关的差异表达基因,显示PTX作用下,敲低*NSD2*的细胞中*TNFSF10*、*TNFRSF10B*、*FAS*、*CASP1*以及Cleaved *PARP1*表达均明显高于NC组,提示敲低*NSD2*可以通过调节程序性细胞死亡通路相关差异基因,促进细胞死亡,增加MDA-MB-231细胞对PTX的化疗敏感性。生存分析显示,NSD2可作为接受化疗的TNBC患者的预后指标,NSD2高表达的患者预后较差,也提示NSD2高表达可能与患者化疗耐药相关。

肿瘤坏死因子超家族包括19个配体和29个不同的受体[20]。TNFSF10、TNFRSF10B、FAS均属于肿瘤坏死因子超家族,在细胞的坏死性凋亡和凋亡过程中均发挥着重要的作用[21]。使用TNFSF10/TNFRSF10B激动剂或增加细胞对TNFSF10的敏感性可以诱导细胞凋亡、使原位肿瘤消散同时抑制转移性TNBC的生长[22]。FAS及其配体FASL可通过介导外源性凋亡信号通路诱导细胞凋亡,FAS/FASL的表达与肿瘤干细胞的维持有关,导致肿瘤的侵袭、转移、复发和化疗耐药[23]。研究表明乳腺癌组织中FAS mRNA和蛋白表达水平均显著降低,高表达的FAS表明患者具有更好的转移无复发生存率,来自Cell Miner Tool的数据显示,*FAS* mRNA的表达与一线化疗紫杉烷制剂和包括奥拉帕尼和依维莫司在内的靶向药物的疗效相关[24]。本研究发现乳腺癌中TNFSF10、TNFRSF10B、FAS均显著下调,接受过化疗的TNBC患者中,TNFRSF10B、FAS高表达患者预后好于低表达患者。敲低*NSD2*表达与PTX处理具有明显的协同效应,可能激活TNFSF10/TNFRSF10B和FAS/FASL信号通路诱导细胞程序性死亡。

CASP1是caspase家族中的一个重要成员,既参与细胞因子所介导的炎症反应,又与细胞凋亡过程紧密相关[25]。研究表明,细胞焦亡是一种依赖于CASP1的细胞死亡模式。经典炎性小体在激活CASP1后,可诱导其他炎性细胞因子、趋化因子及黏附分子的合成,从而加剧局部和全身的炎症反应[26]。CASP1的表达水平与乳腺癌组织学分级、肿瘤大小、临床分期、淋巴结转移及死亡风险负相关,与乳腺癌预后良好呈正相关[27]。本次研究结果表明CASP1高表达患者倾向于更好的结局,*NSD2*敲低可以促使CASP1表达升高,提示NSD2也可能通过CASP1介导TNBC的细胞焦亡过程。

PARP参与了细胞DNA修复、转录调控、基因表达、炎症反应和免疫应答等多种生物学过程。TNBC中PARP1的表达与肿瘤的大小、组织学分级、淋巴结转移、临床分期及EMT等恶性表型相关[28]。PARP抑制与PD-L1/PD-1免疫检查点轴之间存在串扰,PARP抑制剂可上调PD-L1在肿瘤细胞中的表达,多种PARP抑制剂正在TNBC中进行新辅助临床试验[29]。研究显示,乳腺癌患者*PARP1*基因改变的频率在乳腺癌患者中最高为12.35%,且约11.82%的改变为扩增,PARP1的改变对肿瘤的预后具有预测价值[30]。而Cleaved PARP则是PARP受到caspase切割的产物,其产生标志着细胞凋亡程序的执行。本次研究结果提示敲低*NSD2*表达对PARP1表达无显著影响,但促进Cleaved PARP1表达增加。

广泛凋亡(PANoptosis)是一种炎性程序性细胞死亡途径,由广泛凋亡复合体PANoptosome调控,这种死亡方式同时具有细胞焦亡、凋亡和坏死性凋亡的关键特征,是多种死亡方式的交互[31]。本研究结果显示敲低*NSD2*能显著下调细胞焦亡、凋亡和坏死性凋亡相关的一些基因。同时一些炎症反应相关因子也发生显著变化,如白介素家族(IL1A、IL1RAP、IL7R、IL24)、趋化因子(CCL5、CCL26、CXCL10、CXCL11)、干扰素相关基因(*GBP2*、*IRF1*、*IFIH1*、*ISG20*、*IFIT3*、*IFITM1*、*IFIT1*、*IFIT2*、*IFI44*)、AIF1L等。有研究表明,IRF1在自发性结直肠癌小鼠模型中能阻止肿瘤的发生,IRF1缺失的小鼠结肠细胞死亡减弱是由于缺乏细胞焦亡、凋亡和坏死性凋亡(PANoptosis),确定IRF1是PANoptosis的上游调节因子,在结肠炎相关肿瘤发生过程中诱导细胞死亡,以阻止结直肠癌的发生[32]。以上结果提示NSD2可能参与细胞的广泛凋亡过程,但在后续工作中还有待进一步深入研究NSD2是否参与广泛凋亡复合体的形成。

综上所述,敲低*NSD2*改变TNBC细胞的基因表达谱,通过诱导程序性细胞死亡增强细胞对PTX化疗的敏感性,NSD2有望成为改善TNBC化疗耐药的分子靶标。然而,本研究也存在一定的局限性。首先,本研究仅使用公共数据库中的现有数据集对NSD2及相关基因的预后价值进行分析,数据库可能在样本量、患者群体特征等方面具有局限性。由于研究采用了回溯性特征,可能会引发选择性偏差。因此,未来将计划开展前瞻性研究,以验证NSD2在临床治疗和患者个性化管理中的应用,并将进一步尝试收集和分析更多样化、更大样本量的独立数据集,以增强本研究结果的普适性和可靠性。其次,本研究对*NSD2*影响TNBC化疗敏感性的机制进行了初步探索,但尚未明确*NSD2*对相关基因的调控方式或相互作用,未来将进一步深入探究*NSD2*在TNBC中的作用机制以及相关基因在TNBC发生、发展中的综合影响。

作者贡献度说明:

高波、潘云:负责研究选题、论文修改和定稿;陈艳:负责数据收集及写作;赵金辉:负责数据收集与分析;胡诗涵:负责绘制图表;王禹:负责文献检索。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

1 Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.

2 Lee KL, Kuo YC, Ho YS, et al. Triple-negative breast cancer: Current understanding and future therapeutic breakthrough targeting cancer stemness[J]. Cancers (Basel), 2019, 11(9): 1334.

3 Zhu S, Wu Y, Song B, et al. Recent advances in targeted strategies for triple-negative breast cancer[J]. J Hematol Oncol, 2023, 16: 100.

4 Bianchini G, De Angelis C, Licata L, et al. Treatment landscape of triple-negative breast cancer-expanded options, evolving needs[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2022, 19(2): 91-113.

5 Li Y, Zhang H, Merkher Y, et al. Recent advances in therapeutic strategies for triple-negative breast cancer[J]. J Hematol Oncol, 2022, 15(1): 121.

6 He L, Cao Y, Sun L. NSD family proteins: Rising stars as therapeutic targets[J]. Cell Insight, 2024, 3(2): 100151.

7 Chong PS, Chooi JY, Lim JS, et al. SMARCA2 is a novel interactor of NSD2 and regulates prometastatic PTP4A3 through chromatin remodeling in t(4;14) multiple myeloma[J]. Cancer Res, 2021, 81(9): 2332-2344.

8 Park JW, Kang JY, Hahm JY, et al. Proteosomal degradation of NSD2 by BRCA1 promotes leukemia cell differentiation[J]. Commun Biol, 2020, 3(1): 462.

9 Want MY, Tsuji T, Singh PK, et al. WHSC1/NSD2 regulates immune infiltration in prostate cancer[J]. J Immunother Cancer, 2021, 9(2): e001374.

10 Han X, Piao L, Xu X, et al. NSD2 promotes renal cancer progression through stimulating Akt/Erk signaling[J]. Cancer Manag Res, 2020, 12: 375-383.

11 Yan J, Zhang M, Lin J, et al. WHSC1 is involved in DNA damage, cellular senescence and immune response in hepatocellular carcinoma progression[J]. J Cell Mol Med, 2023, 27(10): 1436-1441.

12 Chen L, Zhi Z, Wang L, et al. NSD2 circular RNA promotes metastasis of colorectal cancer by targeting miR-199b-5p-mediated DDR1 and JAG1 signalling[J]. J Pathol, 2019, 248(1): 103-115.

13 Kojima M, Sone K, Oda K, et al. The histone methyltransferase WHSC1 is regulated by EZH2 and is important for ovarian clear cell carcinoma cell proliferation[J]. BMC Cancer, 2019, 19: 455.

14 Zhu L, Yu C, Zheng Y. NSD2 inhibition suppresses metastasis in cervical cancer by promoting TGF-β/TGF-βRI/SMADs signaling[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 519(3): 489-496.

15 Wang J, Zou J, Wang H, et al. Histone methyltransferase NSD2 mediates the survival and invasion of triple-negative breast cancer cells *via* stimulating ADAM9-EGFR-AKT signaling[J]. Acta Pharmacol Sin, 2019, 40(8): 1067-1075.

16 Gao B, Liu X, Li Z, et al. Overexpression of EZH2/NSD2 histone methyltransferase axis predicts poor prognosis and accelerates tumor progression in triple-negative breast cancer[J]. Front Oncol, 2020, 10: 600514.

17 Zhang J, Lu J, Chen Y, et al. WHSC1 promotes wnt/β-catenin signaling in a FoxM1-dependent manner facilitating proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition in breast cancer[J]. J Recept Signal Transduct Res, 2020, 40(5): 410-418.

18 Wang Q, Zheng J, Zou J, et al. S-adenosylhomocysteine (AdoHcy)-dependent methyltransferase inhibitor DZNep overcomes breast cancer tamoxifen resistance *via* induction of NSD2 degradation and suppression of NSD2-driven redox homeostasis[J]. Chem Biol Interact, 2020, 317: 108965.

19 Nakayama H, Kawachi K, Suganuma N, et al. EZH2 and MMSET were identified as potentially useful therapeutic targets in metaplastic breast carcinoma[J]. Anticancer Res, 2020, 40(4): 2133-2139.

20 Holbrook J, Lara-Reyna S, Jarosz-Griffiths H, et al. Tumour necrosis factor signalling in health and disease[J]. F1000Res, 2019, 8: F1000 Faculty Rev-111.

21 Nash M, Mcgrath JP, Cartland SP, et al. Tumour necrosis factor superfamily members in ischaemic vascular diseases[J]. Cardiovasc Res, 2019, 115(4): 713-720.

22 Greer YE, Gilbert SF, Gril B, et al. MEDI3039, a novel highly potent tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor 2 agonist, causes regression of orthotopic tumors and inhibits outgrowth of metastatic triple-negative breast cancer[J]. Breast Cancer Res, 2019, 21(1): 27.

23 Abou Shousha S, Baheeg S, Ghoneim H, et al. The effect of Fas/FasL pathway blocking on apoptosis and stemness within breast cancer tumor microenvironment (preclinical study)[J]. Breast Dis, 2023, 42(1): 163-176.

24 Zhang Y, Shao X, Gao C, et al. High FAS expression correlates with a better prognosis and efficacy of taxanes and target regents in breast cancer[J]. Cancer Biomark, 2021, 32(2): 207-219.

25 Peng J, Wei Q, Zhou S, et al. Effect of caspase-1 (CASP1) combined with multimodal ultrasound features on the prognosis of breast cancer patients[J]. Transl Cancer Res, 2023, 12(8): 2138-2154.

26 Hong W, Gu Y, Guan R, et al. Pan-cancer analysis of the *CASP* gene family in relation to survival, tumor-infiltrating immune cells and therapeutic targets[J]. Genomics, 2020, 112(6): 4304-4315.

27 Wu X, Mao X, Huang Y, et al. Detection of proteins associated with the pyroptosis signaling pathway in breast cancer tissues and their significance[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2020, 13(6): 1408-1414.

28 陈机琼, 冯慧艳, 林丹丽, 等. PARP1在三阴性乳腺癌组织中的表达及其与EMT的相关性[J]. 现代肿瘤医学, 2020, 28(3): 402-405.
Chen JQ, Feng HY, Lin DL, et al. Expression of PARP1 in triple negative breast cancer and its relationship with EMT[J]. J Mod Oncol, 2020, 28(3): 402-405.

29 Won KA, Spruck C. Triple-negative breast cancer therapy: Current and future perspectives (review)[J]. Int J Oncol, 2020, 57(6): 1245-1261.

30 Zhang X, Wang Y, Gari A, et al. Pan-cancer analysis of PARP1 alterations as biomarkers in the prediction of immunotherapeutic effects and the association of its expression levels and immunotherapy signatures[J]. Front Immunol, 2021, 12: 721030.

31 Samir P, Malireddi RK, Kanneganti TD. The PANoptosome: A deadly protein complex driving pyroptosis, apoptosis, and necroptosis (PANoptosis)[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020, 10: 238.

32 Karki R, Sharma BR, Lee E, et al. Interferon regulatory factor 1 regulates PANoptosis to prevent colorectal cancer[J]. JCI Insight, 2020, 5(12): e136720.

[**本文编辑**] 宋睿璞 陈思润