

DOI: 10.19296/j.cnki.1008-2409.2024-03-006

· 论 著 ·

· ORIGINAL ARTICLE ·

剪切 DR3 第 10 外显子促进乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株增殖

李长青¹, 辛林峰¹, 秦琴¹, 黄慧梅², 倪慧¹, 李佳乐¹, 张琳¹

(1. 桂林医学院附属医院, 桂林 541001; 2. 贵港市人民医院, 贵港 537100)

摘要 目的 探讨死亡受体 3(DR3) 第 10 外显子在乳腺癌中的表达与作用。方法 利用基因表达谱交互分析数据库(GEPIA)分析 DR3 在乳腺癌中的表达和预后价值, 运用 log-rank 检验进行生存差异比较。通过 CRISPR/Cas9 技术构建剪切 DR3 第 10 外显子的质粒载体, 对三阴性乳腺癌细胞株(MDA-MB-231)DR3 第 10 外显子进行剪切。分析 DR3 第 10 外显子剪切对 MDA-MB-231 细胞增殖和相关剪接变异体表达的影响。结果 生物信息分析结果表明, DR3 在乳腺癌患者中呈低表达, 这种低表达预示总体生存期较短。剪切 DR3 第 10 外显子增强了 DR3 剪接变异体 2、3、7 的表达, 并且这种改变伴随 MDA-MB-231 细胞增殖能力增强。结论 DR3 在乳腺癌患者中呈现低表达且预示患者总体生存期较短, DR3 第 10 外显子与乳腺癌密切相关。

关键词: DR3 第 10 外显子; 剪接变异体; 乳腺癌; 增殖

中图分类号: R737.9

文献标志码: A

文章编号: 1008-2409(2024)03-0041-07

Cutting the tenth exon of DR3 promotes the proliferation of breast cancer cell line MDA-MB-231

LI Changqing¹, XIN Linfeng¹, QIN Qin¹, HUANG Huimei², NI Hui¹, LI Jiale¹, ZHANG Lin¹

(1. Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001, China;

2. The People's Hospital of Guigang City, Guigang 537100, China)

Abstract Objective To investigate the expression and role of the tenth exon of death receptor 3 (DR3) in breast cancer cells. **Methods** Gene expression profiling interactive analysis (GEPIA) was used to analyze the expression and prognostic value of DR3 in breast cancer, and log-rank test was used to compare the survival differences. Construction of the plasmid vector splicing the tenth exon of DR3 was

基金项目: 广西自然科学基金项目(2020GXNSFAA297100)。

第一作者: 李长青, 硕士研究生, 住院医师, 研究方向为乳腺甲状腺外科; 辛林峰, 硕士研究生, 住院医师, 研究方向为乳腺甲状腺外科。

通信作者: 张琳, 5671380@qq.com。

constructed and the tenth exon of DR3 in triple negative breast cancer cell line (MDA-MB-231) was knocked down using CRISPR/Cas9 technology. **Results** Bioinformatics analysis showed that DR3 expression was low in breast cancer patients, and low expression predicted poor overall survival. In vitro experiments revealed that knockdown of the tenth exon of DR3 enhanced the expressions of DR3 transcript variants 2, 3 and 7, and this alteration resulted in enhanced proliferation of TNBC cell lines. **Conclusion** The low expression of DR3 in the patients with breast cancer is indicative of shorter overall survival, and the tenth exon of DR3 is closely related to breast cancer.

Keywords: the tenth exon of DR3; transcript variants; breast cancer; proliferation

乳腺癌是全世界女性中最常见的恶性肿瘤,它也发生于男性^[1-2]。在我国女性人群中,乳腺癌是发病率仅次于肺癌的最常见恶性肿瘤类型^[3]。至今,治疗乳腺癌的主要方法仍是手术、放疗、化疗和内分泌治疗^[4-7]。尽管大多数乳腺癌都到了较好的控制,但由于疾病发现不及时、对化疗药物的耐药性或不良反应等,仍有部分患者治疗效果不理想。乳腺癌是一种具有高度异质性的疾病^[8],目前,临床上常常依据乳腺癌免疫表型差异,将乳腺癌分为 Luminal A 型、Luminal B 型、HER-2 阳性型和三阴性乳腺癌等 4 种临床亚型。其中,三阴性乳腺癌因为其肿瘤的异质性及化疗方案耐药问题导致其正成为预后最差的乳腺癌亚型。三阴性乳腺癌因缺失雌激素、孕激素、人表皮生长因子受体 2 的表达而得名,具有患病年龄小、侵袭转移性强、复发率高、生存期短等恶性临床特征^[9-10]。随着生物技术的不断发展,三阴性乳腺癌在肿瘤生物学中的特征也被逐渐揭示,从肿瘤细胞的基因特征去进行个体化的靶向治疗正成为诊断、治疗乳腺癌的重要手段。因此,明确乳腺癌发生发展的分子信号通路和潜在的分子生物标志物对有效治疗乳腺癌显得尤为重要。

肿瘤坏死因子 (TNF) 和肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 超家族在免疫调节和宿主免疫反应中起着至关重要的作用。死亡受体 3 (death receptor 3, DR3) 由位于人类 1p36.3 位的 *TNFRSF25* 基因编码^[4], 是肿瘤坏死因子受体超家族的成员之一。DR3 与多种自身免疫性疾病有关,如炎症性肠病、类风湿性关节炎和银屑病^[11-12]。此外,DR3 参与生物调控的机制与

其自身结构的特征有关。首先,DR3 有 10 个外显子,其中第 10 外显子主要参与编辑 DR3 分子死亡结构域,DR3 的死亡结构域在细胞凋亡过程中具有重要作用。一些学者^[13]认为,DR3 可介导炎症、免疫反应及细胞凋亡,这与其胞质区域包含的死亡结构域相关。其次,DR3 另一个重要特征是其人类基因中存在 21 种剪接变异体。有研究^[14]显示,不同变异体编码的蛋白常存在差异,DR3 剪接变异体的作用机制目前尚不明确。既往研究发现^[15],DR3 在乳腺癌组织中的表达低于癌旁组织,而在正常组织中 DR3 剪接变异体 1、4、7 表达高于肿瘤组织。在 DR3 的 21 个剪接变异体中,1、2、3、4、5、7、12 剪接变异体参与 DR3 编码蛋白产物的 CDS 序列。由于剪接变异体 5 所涉及 CDS 序列的碱基数仅为 6 个,故不在本研究中探讨。因此,本研究将选择 1、2、3、4、7、12 剪接变异体作为研究重点,探讨 DR3 的生物学作用与机制。

本研究通过分析基因表达谱 (gene expression profiling interactive analysis, GEPIA) 数据库,发现 DR3 表达下降的乳腺癌患者预后不良。为此,本研究构建剪切 DR3 第 10 外显子的质粒载体,探究 DR3 剪接变异体的表达及其对乳腺癌细胞的作用。

1 材料与方法

1.1 生物信息学分析

通过 GEPIA 数据库 (<http://gepia2.cancer-pku.cn>) 对 DR3 在乳腺癌中的表达和预后进行分析,采用 log-rank 检验分析 DR3 的表达与生存期的关系。

1.2 细胞培养和试剂

本研究使用的人乳腺癌细胞(MDA-MB-231)购自青旗(上海)生物技术发展有限公司,并使用含有10%胎牛血清的DMEM培养基在37℃、5%CO₂环境中进行培养。

1.3 细胞转染与筛选

为了在MDA-MB-231细胞中剪切DR3第10外显子,以未特殊处理的空白载体质粒为对照组质粒,以插入sgRNA(sgRNA序列包括序列1:GGGCTCGGAGCCGTTTACGCGG和序列2:GCTCTACGACGTGATGGACGCGG)质粒为实验组质粒。本研究基于CRISPR/Cas9技术构建了由对照组质粒制成的对照组慢病毒液和由实验组质粒制成的实验组慢病毒液。将生长状态良好的MDA-MB-231细胞分为实验组及对照组,按2.00 μg/mL浓度分别加入实验组慢病毒液、对照组慢病毒液,两组细胞转染质粒16 h后更换为完全培养基继续培养细胞,转染72 h后,通过荧光显微镜观察两组细胞转染效率。通过预实验得知MDA-MB-231细胞在5 μg/mL嘌呤霉素的完全培养液中培养72 h或在2.5 μg/mL嘌呤霉素的完全培养液中培养14 d均不可存活。因此,待转染质粒的

对照组细胞和实验组细胞生长状态良好时,将两组细胞置于含5 μg/mL嘌呤霉素的完全培养液中筛选72 h后,再将细胞置于含2.5 μg/mL嘌呤霉素的完全培养液中筛选14 d,再将细胞更换为完全培养液进行培养,收集两组细胞;采用实时荧光定量PCR(quantitative PCR, qPCR)检测剪切DR3第10外显子的效率,将鉴定DR3第10外显子已剪切的实验组细胞和DR3第10外显子未剪切的对照组细胞冻存保种,以便于研究。

1.4 实时荧光定量PCR

先使用日本TaKaRa公司的RNA提取试剂盒提取细胞总RNA,采用荧光分光光度计检测RNA纯度;再使用ThermoFisher公司的RevertAid预混液(含DNase I)反转录试剂盒合成第一链cDNA;然后使用莫纳生物科技有限公司的SYBR Green I嵌合染料法专用qPCR试剂RapidStart SYBR Green qPCR Mix、引物、cDNA模板等检测DR3第10外显子、DR3的1、2、3、4、7、12剪接变体表表达水平。以β-actin为参照,采用2^{-ΔΔC_t}法确定基因表达量^[16],qPCR引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司,引物序列如表1所示。

表1 引物序列

引物	上游引物	下游引物
β-actin	5'-CTACCTCATGAAGATCCTGACCGA-3'	5'-TTCTCCTTAATCTCACGCACGATT-3'
DR3 变体 1	5'-GGAGGCAGAGTAGGTGTGTTTC-3'	5'-GGCGGTATGTGTAGGTCAGG-3'
DR3 变体 2	5'-GTGTGTGCCCAAGACACCTT-3'	5'-ACCCAGAACATCTGCCTCCA-3'
DR3 变体 3	5'-CACACGGCTACTCTGTTCCT-3'	5'-CCATCCCAGCTTCATTCTGC-3'
DR3 变体 4	5'-AGCGGCCTCCCAGGTG-3'	5'-AACAGAGTAGCCGTGTGTGG-3'
DR3 变体 7	5'-TGAAGGGGAACCACGAC-3'	5'-CATCCCAGCTTCATCCGCTG-3'
DR3 变体 12	5'-CCCTATCCCCTTTCCTATTG-3'	5'-TTCACCCTTCTACTGCCAACC-3'
DR3 第 10 外显子 a1	5'-CGGTGGGAAGTTGTGGTTT-3'	5'-AGCATCTCGTACTGCTGGTCT-3'
DR3 第 10 外显子 a2	5'-TGCGGTGGGAAGTTGTGG-3'	5'-AGCATCTCGTACTGCTGGTCT-3'
DR3 第 10 外显子 b1	5'-CGAGACCAGCAGTACGAGATG-3'	5'-CCGCAGAAACGCCAAGAA-3'
DR3 第 10 外显子 b2	5'-CGAGACCAGCAGTACGAGATG-3'	5'-GCAGAAACGCCAAGAAGC-3'

1.5 CCK-8 法检测细胞增殖

将未剪切 DR3 第 10 外显子的 MDA-MB-231 细胞株设置为对照组,已剪切 DR3 第 10 外显子的 MDA-MB-231 细胞株设置为实验组,将完全培养液设置为空白组。将对照组及实验组细胞消化、离心后,用完全培养液重悬制为 5 000 个/mL 的细胞悬液。将制备好的对照组及实验组细胞悬液接种到 96 孔板中,设置空白组,每孔 200 μ L,每组 6 个复孔;并在其余孔中加入 200 μ L PBS,以防止液体蒸发。将接种好的 96 孔板置于 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 恒温条件下培养 24 h、48 h、72 h。在各时间点,除去孔中液体后,加入 100 μ L CCK-8 工作液(由 10 μ L CCK-8 试剂与 90 μ L 完全培养液混合制成),混匀后,将 96 孔板放入培养箱,恒温孵育 2 h。使用酶标仪检测吸光度值(OD 值),波长为 450 nm。根据各组各时间点计算相应的 OD 值。以 OD 值作为纵坐标,以时间为横坐标,绘制细胞增殖能力图谱。

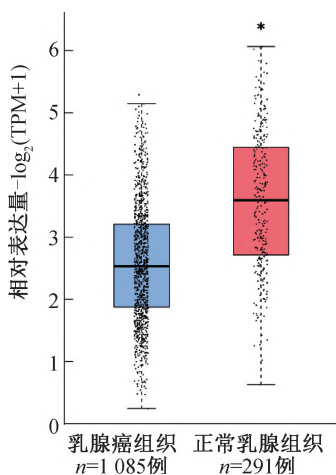
1.6 统计学方法

实验数据使用 SPSS 25.0 及 GraphPad Prism 9 软件分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 DR3 在乳腺癌中的表达及预后

依据来源于 GEPIA 数据库中的 1 085 例乳腺癌组织和 291 例正常乳腺组织的研究数据分析,结果表明,DR3 在乳腺癌组织中表达明显低于在正常组织中的表达,差异有统计学意义($P < 0.05$),结果如图 1 所示。



注:与乳腺癌组织组比较,* $P < 0.05$ 。

图 1 DR3 在乳腺癌中的表达

以中位表达值为截断点,Kaplan-Meier 曲线分析显示,DR3 低表达乳腺癌患者的总生存期较短,结果如图 2 所示。

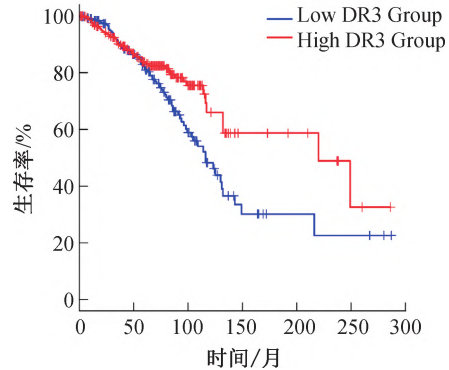
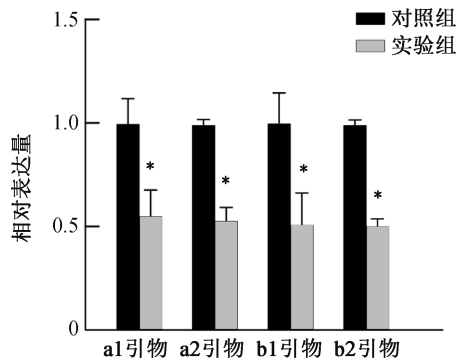


图 2 DR3 表达水平与乳腺癌患者总生存期的分析

2.2 剪切 DR3 第 10 外显子 MDA-MB-231 细胞株的构建

采用 CRISPR/Cas9 技术构建剪切 DR3 第 10 外显子的 MDA-MB-231 细胞株(实验组)与未剪切 DR3 第 10 外显子的 MDA-MB-231 细胞株(对照组),细胞株中,DR3 第 10 外显子表达的水平如图 3 所示。

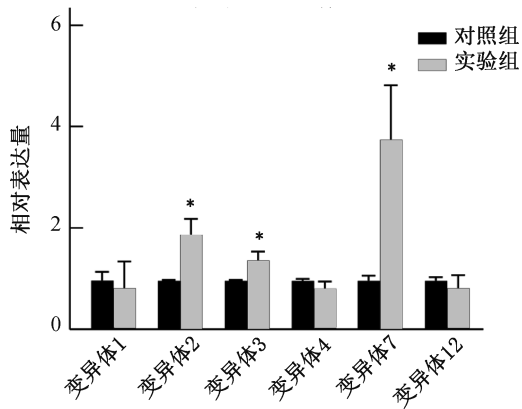


注:与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

图 3 DR3 第 10 外显子的表达水平分析

2.3 DR3 第 10 外显子对 2、3、7 剪接变异体的影响

三阴性乳腺癌细胞株剪切了 DR3 第 10 外显子后的实验组,DR3 的 2、3、7 剪接变异体明显升高($P < 0.05$),结果如图 4 所示。

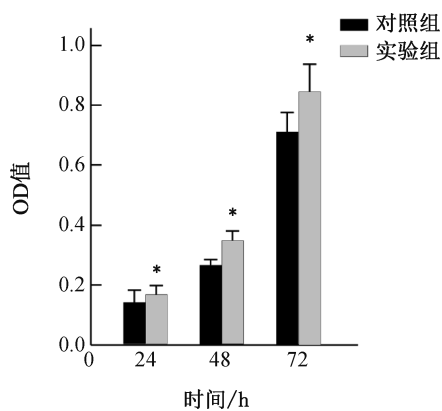


注:与对照组比较,* $P<0.05$ 。

图4 DR3 第 10 外显子剪切后的剪接变异体表达分析

2.4 DR3 第 10 外显子剪切后可促进三阴性乳腺癌细胞增殖

细胞培养 24、48、72 h 后,CCK-8 细胞增殖实验结果显示,实验组 OD 值高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),结果如图 5 所示。



注:与对照组比较,* $P<0.05$ 。

图5 DR3 第 10 外显子剪切后细胞增殖能力分析

3 讨论

三阴性乳腺癌占乳腺癌病理类型的 15%~20%,有较强的分子遗传学异质性^[17]。三阴性乳腺癌的治疗效果不如其他亚型的乳腺癌,靶向治疗正成为治疗三阴性乳腺癌的重要手段。肿瘤坏死因子受体超家族包含 8 个死亡结构域(DD)的受体,包括 TNFR1(也称为 DR1), Fas(也称为 DR2)、DR3、DR4、DR5、DR6、NGFR 和 EDAR。DR3 是肿瘤坏死因子受体超家族的一个亚组,其功能与细胞凋亡和

坏死性凋亡密切相关^[18]。DR3 在慢性淋巴细胞白血病、肝癌、乳腺癌、结直肠癌等疾病中起重要作用^[19-23]。

生物信息学分析揭示,DR3 在乳腺癌组织中呈现低表达,且 DR3 低表达乳腺癌患者的总生存期短于 DR3 高表达患者。GE 等^[21]研究发现,乳腺癌患者 DR3 表达水平低预示着生存期短,DR3 对乳腺癌患者预后有重要作用。剪切 DR3 第 10 外显子后的三阴性乳腺癌细胞的增殖能力大于未剪切 DR3 第 10 外显子的三阴性乳腺癌细胞。细胞存活实验结果表明,DR3 在结肠癌细胞中可通过与内皮细胞 E-选择素的黏附触发细胞存活途径,从而减缓细胞凋亡,这一现象与 DR3 剪接变异体的替代机制相关^[23]。本研究结果表明,在剪切了 DR3 第 10 外显子的三阴性乳腺癌细胞株中,DR3 的 2、3、7 剪接变异体表达水平增强。DR3 具有 10 个外显子,这些外显子可组建不同的剪接变异体,其表达的蛋白产物可调控细胞的生物学行为。1 剪接变异体与 2 剪接变异体都含有第 10 外显子,但剪切 DR3 第 10 外显子后,2 剪接变异体表达明显升高,而 1 剪接变异体的表达没有明显改变,提示 DR3 不同变异体所受的外显子剪接调控不尽相同。DR3 中存在与死亡结构域密切关联的某些外显子表达改变可引起剪接变异体替代机制,最终影响到细胞增殖能力变化。研究结果显示,DR3 可在淋巴细胞、癌细胞中以随机剪接方式产生剪接变异体发挥作用^[14,24-27]。虽然调控 DR3 不同剪接变异体形成的机制尚不明确,但根据目前已有的研究结果推测,DR3 第 10 外显子可能通过剪接变异体的替代机制来调控三阴性乳腺癌细胞的增殖能力。

4 结论

剪切三阴性乳腺癌细胞 DR3 第 10 外显子后,三阴性乳腺癌细胞的增殖能力增强,DR3 的 2、3、7 剪接变异体表达升高。DR3 可通过剪接变异体调控三阴性乳腺癌细胞的增殖能力并最终影响乳腺癌患者的预后。DR3 第 10 外显子有望成为临床上治疗乳腺癌的重要分子靶点。

参考文献

- [1] PARK M, KIM D, KO S, et al. Breastcancer metastasis: mechanisms and therapeutic implications[J]. *Int J Mol Sci*, 2022,23(12):6806.
- [2] AUMEERUDDY M Z, MAHOMOODALLY M F. Combating breast cancer using combination therapy with 3 phytochemicals: piperine, sulforaphane, and thymoquinone[J]. *Cancer*, 2019,125(10):1600-1611.
- [3] 何思怡,李贺,曹毛毛,等.全球及我国女性乳腺癌疾病负担年龄分布及变化趋势[J].*中国肿瘤*,2023,32(1):1-7.
- [4] DAHAN M, CORTET M, LAFON C, et al. Combination of focused ultrasound, immunotherapy, and chemotherapy: new perspectives in breast cancer therapy[J]. *J Ultrasound Med*, 2023,42(3):559-573.
- [5] MAGNONI F, ALESSANDRINI S, ALBERTI L, et al. Breastcancer surgery: new issues[J]. *Curr Oncol*, 2021, 28(5):4053-4066.
- [6] KUNKLER I H, WILLIAMS L J, JACK W J L, et al. Breast-conserving surgery with or without irradiation in early breast cancer[J]. *N Engl J Med*, 2023,388(7):585-594.
- [7] HANKER A B, SUDHAN D R, ARTEAGA C L. Overcoming endocrine resistance in breast cancer[J]. *Cancer Cell*, 2020,37(4):496-513.
- [8] 徐灵亚,刘雪,曹洋洋,等.ACE2对乳腺癌预后的影响及其潜在机制[J].*中国药科大学学报*,2023,54(5):586-598.
- [9] 蒋飘,姚伟荣,沈庆林.三阴性乳腺癌免疫检查点抑制剂的治疗现状与挑战[J].*中华肿瘤防治杂志*,2023,30(17):1062-1068.
- [10] ZAGAMI P, CAREY L A. Triple negative breast cancer: Pitfalls and progress[J]. *NPJ Breast Cancer*, 2022,8(1):95.
- [11] AIBA Y, NAKAMURA M. The role of TL1A and DR3 in autoimmune and inflammatory diseases [J]. *Mediators Inflamm*, 2013,2013:258164.
- [12] MEYLAN F, DAVIDSON T S, KAHLE E, et al. The TNF-family receptor DR3 is essential for diverse T cell-mediated inflammatory diseases[J]. *Immunity*, 2008,29(1):79-89.
- [13] VALATAS V, KOLIOS G, BAMIAS G. TL1A (TNFSF15) and DR3 (TNFRSF25): a co-stimulatory system of cytokines with diverse functions in gut mucosal immunity[J]. *Front Immunol*, 2019,10:583.
- [14] WANG E C, KITSON J, THERN A, et al. Genomic structure, expression, and chromosome mapping of the mouse homologue for the WSL-1 (DR3, Apo3, TRAMP, LARD, TR3, *TNFRSF12*) gene [J]. *Immunogenetics*, 2001, 53(1):59-63.
- [15] 张琳,管玉满,秦琴,等.死亡受体3亚型分子及mRNA变异体在人乳腺癌组织中的表达[J].*中华实验外科杂志*,2019,36(5):798-800.
- [16] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-DeltaDelta C(T)) Method[J].*Methods*,2001,25(4):402-408.
- [17] 骆广涛,汤为香,叶元滋,等.雄激素受体在三阴性乳腺癌中的研究进展[J].*临床与实验病理学杂志*,2023,39(08):977-980.
- [18] BITTNER S, KNOLL G, EHRENSCHWENDER M. Death receptor 3 mediates necroptotic cell death[J].*Cell Mol Life Sci*, 2017,74(3):543-554.
- [19] CAVALLINI C, LOVATO O, BERTOLASO A, et al. Expression and function of the TL1A/DR3 axis in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(31):32061-32074.
- [20] ZHANG Y C, GUO L Q, CHEN X, et al. The role of death receptor 3 in the biological behavior of hepatocellular carcinoma cells[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(2):797-804.
- [21] GE Z C, SANDERS A J, YE L, et al. Expression of death receptor-3 in human breast cancer and its functional effects on breast cancer cells *in vitro* [J]. *Oncol Rep*, 2013, 29(4):1356-1364.
- [22] UTKIN O V, STARIKOVA V D, PERENKOV A D, et al. DR3/LARD mRNA spliced variants' frequency at colorectal cancer [J]. *Molekuliarnaia Biologiia*, 2013, 47(5):828-834.
- [23] PORQUET N, POIRIER A, HOULE F, et al. Survival advantages conferred to colon cancer cells by E-selectin-induced activation of the PI3K-NFκB survival axis downstream of Death receptor-3 [J]. *BMCCancer*, 2011, 11:285.
- [24] KITSON J, RAVEN T, JIANG Y P, et al. A death-domain-containing receptor that mediates apoptosis [J]. *Nature*, 1996, 384(6607):372-375.
- [25] SCREATON G R, XU X N, OLSEN A L, et al. LARD: a

- new lymphoid-specific death domain containing receptor regulated by alternative pre-mRNA splicing[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(9):4615-4619.
- [26] TAN K B, HARROP J, REDDY M, et al. Characterization of a novel TNF-like ligand and recently described TNF ligand and TNF receptor superfamily genes and their constitutive and inducible expression in hematopoietic and non-hematopoietic cells[J]. Gene, 1997, 204(1/2):35-46.
- [27] WARZOCHA K, RIBEIRO P, CHARLOT C, et al. A new death receptor 3 isoform: expression in human lymphoid cell lines and non-Hodgkin's lymphomas[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 242(2):376-379.

[收稿日期:2024-03-19]

[责任编辑:涂剑,向秋 英文编辑:周寿红]