

Expression and Clinicopathological Significance of BTG3 in Gastric Cancer

Renxiang Liu Donghui Ren Huachuan Zheng*

Department of Oncology, Affiliated Hospital of Chengde Medical University, Chengde, Hebei, 067000, China

Abstract

Objective: To explore the expression and clinicopathological significance of BTG3 in gastric carcinogenesis. **Methods:** The expression of BTG3 in gastric cancer and its relationship with prognosis were analysed using UALCAN, xiantao and Kaplan-Meier. Tumour tissues and normal mucosal tissues were collected from the First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University and the Affiliated Hospital of Kanagawa Prefectural Cancer Centre, and BTG3 protein expression was detected using immunohistochemistry to investigate the relationship between BTG3 protein expression and clinicopathological features of gastric cancer. **Results:** The expression of BTG3 was higher than that of normal tissues in gastric cancer in both paired and unpaired samples ($P < 0.05$), and the relationship between BTG3 expression and overall survival and recurrence-free survival were negatively correlated. Immunohistochemistry showed that BTG3 expression was higher in non-cancerous tissues than gastric cancer ($P < 0.05$); BTG3 had higher expression in T2-T4, lymphatic and venous invasion ($P < 0.05$), but did not correlate with age, gender, lymph node metastasis, TNM stage and distant metastasis (all $P > 0.05$). **Conclusion:** BTG3 can be used as a predictor of prognosis in gastric cancer and a potential target for gene therapy.

Keywords

BTG3; gastric cancer; prognosis; bioinformatics

BTG3 在胃癌中的表达及临床病理意义

刘仁祥 任东辉 郑华川*

承德医学院附属医院肿瘤科, 中国·河北承德 067000

摘要

目的: 探讨BTG3在胃癌发生发展中的表达及临床病理意义。**方法:** 利用UALCAN, 仙桃和Kaplan-Meier分析BTG3在胃癌的表达及与预后的关系。收集锦州医科大学附属第一医院和神奈川县癌症中心附属医院的肿瘤组织和正常黏膜组织, 使用免疫组化检测BTG3蛋白表达, 探讨BTG3蛋白表达与胃癌临床病理特征之间的关系。**结果:** 胃癌中BTG3在配对样本和不配对样本中表达均高于正常组织 ($P < 0.05$), BTG3表达与总体生存率和无复发生存期呈负相关。免疫组化显示, BTG3表达在非癌性组织中高于胃癌 ($P < 0.05$); BTG3在T2-T4, 淋巴及静脉侵袭中有更高表达 ($P < 0.05$), 但与年龄、性别、淋巴结转移、TNM分期和远处转移不相关 ($P > 0.05$)。 **结论:** BTG3可作为胃癌预后的预测因子, 也可作为胃癌基因治疗的潜在靶标。

关键词

BTG3; 胃癌; 预后; 生物信息学

1 引言

胃癌是消化道常见恶性肿瘤, 具有较高的发病率和高死亡率, 是一个全球性问题, 有研究调查表明, 胃癌的全球发病率排名第五, 死亡率排名第四^[1]。近几十年来基因测序和肿瘤因子检测技术发展迅速, 肿瘤相关基因已经成为人们关注重点。因此, 在胃癌发生和进展过程中, 寻找新的生

物标志物, 并阐明其相关信号传导通路, 有助于诊断、治疗和预防胃癌。BTG3 是 BTG/TOB 蛋白家族成员之一, 该家族由具有抗增殖特性的结构相关蛋白组成^[2]。BTG3 位于人染色体 21q21.1, 编码含 252 个氨基酸的蛋白质分子^[3]。BTG3^[4] 对细胞周期具有负性调控作用, BTG3 可以与 E2F1 相互作用, 从而阻碍 E2F1 和 DP1 转录因子与 DNA 相结合, 导致其对细胞周期的负性调控。为了阐明 BTG3 在胃癌中的表达及临床意义, 本研究对胃癌 BTG3 进行了生物信息学分析, 同时采用免疫组化检测 BTG3 蛋白表达来进行验证。

【作者简介】 刘仁祥 (1996-), 男, 中国河北沧州人, 在读硕士, 从事肿瘤发生发展研究。

【通讯作者】 郑华川 (1975-), 男, 中国辽宁沈阳人, 博士, 主任医师, 从事肿瘤发生发展的治疗研究。

2 材料与方法

2.1 生物信息学分析

①仙桃数据库 (<https://www.xiantaozi.com/>)：利用仙桃数据库分析胃癌中 BTG3 的表达，下载 BTG3 的相关数据并进行统计分析并绘制图像。②Kaplan-Meier 平台 (<http://kmpplot.com>)：使用 Kaplan-Meier 分析 BTG3 表达与胃癌患者预后的关系；筛选条件：启动 KM 绘图仪用于胃癌；基因符号：BTG3。③UALCAN：使用 UALCAN 数据库 (<http://ualcan.path.uab.edu>) 分析 BTG3 在胃癌中的表达。

2.2 实验方法

2.2.1 临床资料

收集锦州医科大学附属第一医院和神奈川县癌症中心附属医院的手术切除组织 (n=515)、正常黏膜组织 (n=474, 距癌组织 ≥ 4cm 处获取) 及临床资料。①纳入标准：18~90 岁；试验前诊断为胃癌，未经任何相关抗肿瘤治疗；愿进行随访访问且愿签署相关知情同意书。②排除标准：病人不能进行任何身体活动；病人拒绝给予知情同意。本研究获得医院伦理委员会批准。部分患者的临床信息未能获得。

2.2.2 免疫组化染色

将组织二甲苯去蜡、高梯度酒精溶液洗除二甲苯后，将组织浸入抗原修复液中，进行微波技术修复，使用 H₂O₂ 甲醇溶液封闭内源性过氧化物酶，再使用牛血清白蛋白封闭非特异性着色。然后将组织芯片与 BTG3 抗体 (MERCCK, 1 : 80) 4 度孵育过夜，后使用羊抗兔抗体 (Proteintech,

1 : 200) 室温孵育约 2h。抗体孵育间歇使用 PBS 清洗，DAB 显色后苏木素复染，芯片脱水、透明、封片后镜下观察。

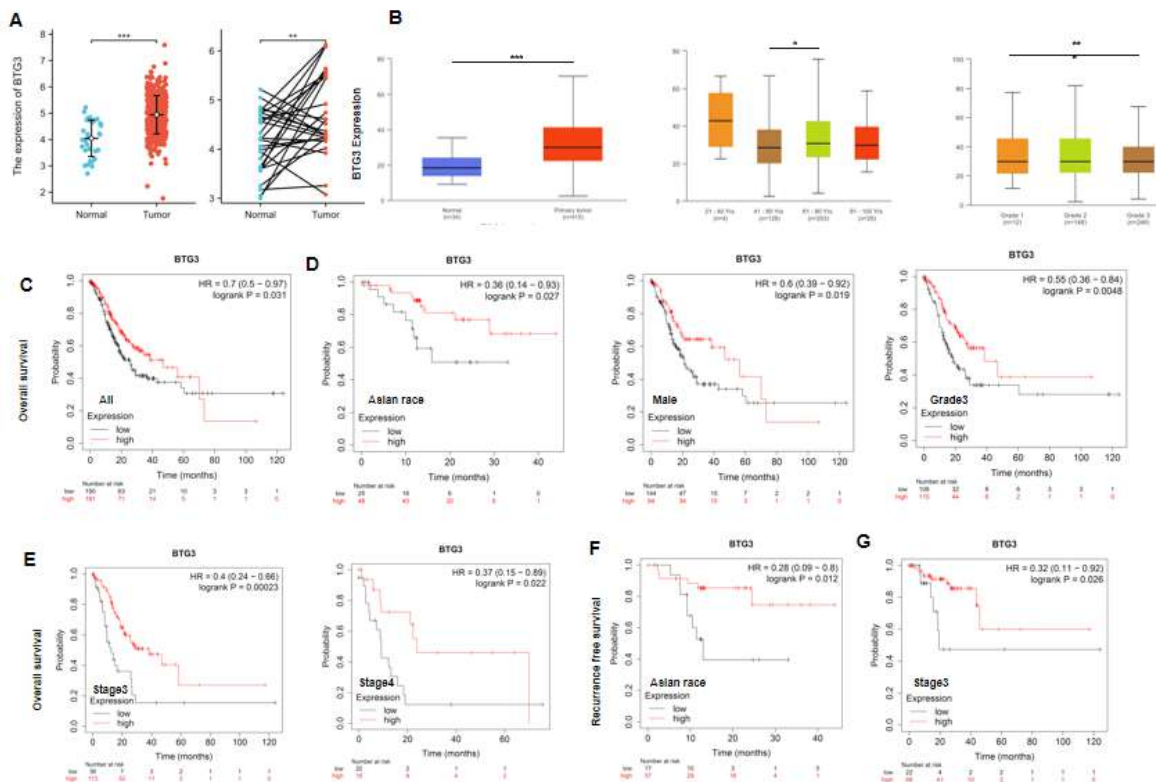
2.3 统计学分析

利用 SPSS 22.0 软件进行统计分析，均数资料比较采用 Wilcoxon 秩和检验，阳性率比较采用卡方检验。使用 Kaplan-Meier 绘制生存曲线，组间生存率差异比较采用 Log-rank 分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

根据仙桃数据库，胃癌中 BTG3 mRNA 在配对样本和不配对样本中表达相比于正常组织均高 (图 1A, P < 0.05)。根据 UALCAN 数据库中，胃癌中 BTG3mRNA 的表达高于正常组织，在不同年龄段中，BTG3mRNA 80-100 岁年龄段的表达要高于 40~60 岁年龄人群中的表达，在不同的分级中，G1 级胃癌 BTG3mRNA 表达高于 G3 级胃癌的表达 (图 1B, P < 0.05)。

Kaplan-Meier 数据库分析显示，胃癌患者 BTG3 表达与总体生存率呈负相关 (图 1C, P < 0.05)，在亚洲患者，男性患者，Grade3 级患者，Stage3 期患者，Stage4 期患者中也得到相同的结果 (图 1DE, 均 P < 0.05)。无复发生存期分析结果显示，胃癌患者 BTG3 表达与无复发生存率呈负相关 (图 1F, P < 0.05)，在亚洲人患者和 stage3 级患者中，BTG3 表达与无复发生存率呈负相关 (图 1G, 均 P < 0.05)，由此所知，BTG3 低表达可能提示胃癌患者预后不良。



A. xiantao database; B.UALCAN; C.G, Kaplan-Meier

图 1 胃癌中 BTG3 mRNA 的表达差异和 Kaplan-Meier 中胃癌患者 BTG3 表达与预后的关系

免疫组化显示, BTG3 蛋白定位细胞质, 提示其可能在细胞质中发挥作用。BTG3 表达结果显示非肿瘤组织 (90.5%)、胃癌 (33.4%) 中 BTG3 表达比较有统计学差异 ($P < 0.05$, 表 1)。BTG3 阳性表达与患者各项临床指标关系的分析显示, BTG3 在 T2-T4, 淋巴及静脉侵袭中有更高表达 ($P < 0.05$), 但与年龄、性别、淋巴结转移、TNM 分期和远处转移不相关 (均 $P > 0.05$), 见表 2。

表 1 BTG3 在非肿瘤性黏膜和肿瘤中的表达

Groups	n	BTG3 expression		
		-	+	PR (%)
Non-neoplastic mucosa	474	45	429	90.5
Cancer	515	343	172	33.4 ^a

注: PR, positive rate. a: compared with non-neoplastic mucosa, $P < 0.001$ 。

表 2 BTG3 的表达与胃癌临床病理参数的关系

Clinicopathological features	n	BTG3 expression			p value
		-	+	PR (%)	
Age (years)					0.137
< 65	300	208	92	30.7	
≥ 65	211	133	78	37.0	
Sex					0.758
Female	153	104	49	32.0	
Male	356	237	119	33.4	
Depth of invasion					0.041
T _{is} -T ₁	240	174	66	27.5	
T ₂ -T ₄	255	163	92	36.1	
Lymphatic invasion					0.011
-	299	212	87	29.1	
+	216	130	86	39.8	
Venous invasion					<0.001
-	288	218	70	24.3	
+	227	125	102	44.9	
Lymph node metastasis					0.273
-	288	198	90	31.3	
+	226	145	81	35.8	
Distant metastasis					0.778
-	483	323	160	33.1	
+	28	18	10	35.7	
TNM staging					0.008
I/II	303	212	91	30.0	
III/IV	208	122	86	41.3	

注: PR, positive rate; T_{is}: carcinoma in situ; T₁: involvement of the lamina propria and submucosa; T₂: muscularis propria and subserosa; T₃: serosa; T₄: invasion through the serosa; TNM: tumor, node, metastasis.

4 讨论

BTG3 编码有 252 个氨基酸的蛋白质分子, 在胃癌发生发展的过程中 BTG3 蛋白可能在细胞质中发挥作用^[5]。先

前研究表明, BTG3 是 p53 的下游靶标, 可通过与 E2F1 作用, 从而阻止 E2F1 转录因子结合 DNA, 抑制 DNA 合成, 抑制细胞周期进展^[4]。BTG3 可通过其 C 端含有富含脯氨酸的结构域结合 Src 蛋白, 并下调 Src 酪氨酸激酶活性, 同时阻碍 Ras/MAP 激酶信号传导通路的传导, 最终抑制细胞的增殖以及调节细胞周期的改变, 此外下调 BTG3 可以激活 Src 酪氨酸激酶活性, 这些证据表明 BTG3 构成了 Src 介导信号传导的重要负调节机制^[6]。此外, BTG3 缺失可通过 ERK-JMJD3-p16 信号参与 DNA 损伤轴触发急性细胞衰老^[7]。BTG3 被证实多种恶性肿瘤中表达降低。与良性肺组织相比, 肺癌中 BTG3 的表达减少^[8]。在肝细胞癌和肾癌中, BTG3 表达下降, 启动子甲基化可能是其沉默表达的原因^[9,10]。本研究显示 BTG3 在胃癌中表达升高, 可能原因是肿瘤发生发展是多种因素作用。我们的免疫组化结果与我们之前研究的结果符合, 正常胃黏膜中 BTG3 表达高于胃癌表达, 我们之前的研究通过细胞实验证明, 在胃癌细胞中过表达 BTG3, 可以抑制胃癌细胞的恶性生物学行为并诱导促进凋亡和对药物的化学敏感性^[11]。

先前研究表明, BTG3 在多项研究中被证实与抑制肿瘤的恶性表型相关。研究表明 BTG3 可与 AKT 结合并抑制 AKT 从而作为肿瘤抑制因子发挥作用^[12], BTG3 过表达可能通过调节 AKT/GSK3 β / β - 连环蛋白信号传导来抑制 EOC 细胞的增殖和侵袭同时促进了 EOC 细胞的凋亡^[13], BTG3 过表达后可以诱导食道癌细胞凋亡并抑制侵袭^[14], BTG3 过表达后可以抑制甲状腺癌细胞的增殖和转移^[15]。BTG3 还可能与某些 microRNA 作用, 如 miR-106b, 这种 miRNA 在癌症的发生和发展中扮演至关重要的角色, BTG3 的表达水平可能受到这些 miRNA 的调控, 进而影响细胞周期和肿瘤的发展。BTG3 mRNA 水平在肝细胞癌中下调, 与 miR-519c-3p 表达呈负相关, BTG3 在肝细胞癌中可作为 MicroRNA-519c-3p 的下游靶基因, MicroRNA-519c-3p 可以作为肿瘤启动因子发挥作用^[16], 此外, miR-106b-5p 可以通过使非小细胞肺癌 (NSCLC) 中 BTG3 的表达下调来促进增殖并抑制细胞凋亡^[17]。这些研究证实 BTG3 可在细胞实验层面抑制肿瘤进展。此外, 有研究^[18]表明了 BTG3 在抑制肿瘤进展的同时存在对肿瘤微环境的非自主调节, 因此, BTG3 可能被用作癌症基因治疗的治疗靶点。

综上所述, 我们的研究在生物信息学上发现了 BTG3 在胃癌可能存在的信号通路, 生存分析显示其表达水平与胃癌患者总体生存率和无复发生存率呈负相关, 免疫组化验证 BTG3 在胃癌组织中表达降低。因此, BTG3 可作为胃癌预后后的预测因子, 可以作为胃癌发生的分子标志物, 可作为胃癌基因治疗的潜在靶标。本研究的不足之处在于使用的样本具有一定局限性, 需要从细胞和动物多层面进行实验验证, 进一步开展临床相关研究, 探究 BTG3 在胃癌中的作用。

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 Clin*, 2021,71(3):209-249.
- [2] Winkler GS. The mammalian anti-proliferative BTG/Tob protein family[J]. *Cell Physiol*, 2010,222(1):66-72.
- [3] Majid S, Dar AA, Ahmad AE, et al. BTG3 tumor suppressor gene promoter demethylation, histone modification and cell cycle arrest by genistein in renal cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2009,30(4):662-670.
- [4] Ou YH, Chung PH, Hsu FF, et al. The candidate tumor suppressor BTG3 is a transcriptional target of p53 that inhibits E2F1[J]. *EMBO*, 2007,26(17):3968-3980.
- [5] 郑华川,申道福,杨雪峰,等.胃癌中BTG3表达的临床病理意义及抑瘤作用的机制[J].*中国医科大学学报*,2015,44(10):877-882.
- [6] Rahmani Z. APRO4 negatively regulates Src tyrosine kinase activity in PC12 cells[J]. *Cell Sci*, 2006,119(4):646-658.
- [7] Lin TY, Cheng YC, Yang HC, et al. Loss of the candidate tumor suppressor BTG3 triggers acute cellular senescence via the ERK-JMJD3-p16(INK4a) signaling axis[J]. *Oncogene*, 2012,31(27):3287-3297.
- [8] Chen X, Chen G, Cao X, et al. Downregulation of BTG3 in non-small cell lung cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013,437(1):173-178.
- [9] Lv Z, Zou H, Peng K, et al. The suppressive role and aberrant promoter methylation of BTG3 in the progression of hepatocellular carcinoma[J]. *PLoS One*, 2013,8(10):e77473.
- [10] Majid S, Dar AA, Ahmad AE, et al. BTG3 tumor suppressor gene promoter demethylation, histone modification and cell cycle arrest by genistein in renal cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2009,30(4):662-670.
- [11] Gou WF, Yang XF, Shen DF, et al. The roles of BTG3 expression in gastric cancer: a potential marker for carcinogenesis and a target molecule for gene therapy[J]. *Oncotarget*, 2015,6(23):19841-19867.
- [12] Cheng YC, Chen PH, Chiang HY, et al. Candidate tumor suppressor B-cell translocation gene 3 impedes neoplastic progression by suppression of AKT[J]. *Cell Death Dis*, 2015,6(1):e1584.
- [13] An Q, Zhou Y, Han C, et al. BTG3 Overexpression Suppresses the Proliferation and Invasion in Epithelial Ovarian Cancer Cell by Regulating AKT/GSK3 β / β -Catenin Signaling[J]. *Reprod Sci*, 2017,24(10):1462-1468.
- [14] Du Y, Liu P, Zang W, et al. BTG3 upregulation induces cell apoptosis and suppresses invasion in esophageal adenocarcinoma[J]. *Mol Cell Biochem*, 2015,404(1-2):31-38.
- [15] 杜静海,陈春悠,郭欣,等.BTG3在甲状腺乳头状癌组织中的表达及其对细胞增殖、侵袭、迁移的影响[J].*东南大学学报(医学版)*,2019,38(6):984-988.
- [16] Wang L, Mo H, Jiang Y, et al. MicroRNA-519c-3p promotes tumor growth and metastasis of hepatocellular carcinoma by targeting BTG3[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019(118):109267.
- [17] Wei K, Pan C, Yao G, et al. MiR-106b-5p Promotes Proliferation and Inhibits Apoptosis by Regulating BTG3 in Non-Small Cell Lung Cancer[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017,44(4):1545-1558.
- [18] Cheng YC, Chiang HY, Cheng SJ, et al. Loss of the tumor suppressor BTG3 drives a pro-angiogenic tumor microenvironment through HIF-1 activation[J]. *Cell Death Dis*, 2020,11(12):1046.