

Clinical Pathology and Prognostic Significance of BTG3 in Colorectal Cancer

Donghui Ren Renxiang Liu Huachuan Zheng*

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

Abstract

B cell translocation gene 3 (BTG3) is a tumor suppressor gene, which plays an important role in regulating cell differentiation, cell cycle and inhibiting the unlimited proliferation of cancer cells. BTG3 belongs to the B cell migration gene / ErbB2 transcription factor family (BTG/Tob). Its N-terminus inhibits the binding of DP1 and E2F1 transcription factors to DNA by binding to E2F1 protein, thereby blocking DNA synthesis. In this study, we used GEO database, TCGA database, Xiantao, UALCAN database and Kaplan-Meier plotter database to analyze the expression of BTG3 by immunohistochemistry and bioinformatics. The results showed that compared with normal tissues, BTG3 expression was increased and methylation was decreased in colorectal cancer. The expression of BTG3 directly or indirectly affects the interaction between immune cells and tumor cells. BTG3-related genes may be functionally synergistic or in the same regulatory pathway, thus providing research clues for the occurrence and development of cancer. The expression of BTG3 may be used as a potential marker to reflect the occurrence, development, invasion and prognosis of colorectal cancer.

Keywords

BTG3; colorectal cancer; immunohistochemistry; bioinformatics analysis

BTG3 在结直肠癌中的临床病理学和预后意义

任东辉 刘仁祥 郑华川*

承德医学院附属医院肿瘤科, 中国·河北承德 067000

摘要

B细胞转位基因3 (BTG3) 是一种抑癌基因, 对调节细胞分化、细胞周期及抑制癌细胞无限增殖等具有重要作用。BTG3属于B细胞迁移基因/ErbB2转录因子家族 (BTG/Tob), 其N端通过结合E2F1蛋白, 阻碍DP1和E2F1转录因子结合DNA, 进而使DNA合成受阻。在这项研究中, 我们使用GEO数据库、TCGA数据库、仙桃、UALCAN数据库和Kaplan-Meier绘图仪数据库等对BTG3表达进行了免疫组化及生物信息学分析。结果显示与正常组织相比, BTG3在结直肠癌表达升高而甲基化降低。BTG3的表达直接或间接地影响免疫细胞与肿瘤细胞之间的相互作用。BTG3相关基因在功能上可能存在协同作用或者处于同一调控通路, 从而为癌症的发生、发展提供研究线。因此, BTG3的表达有可能作为反映结直肠癌发生、发展、侵袭和预后的潜在标志物。

关键词

BTG3; 结直肠癌; 免疫组化; 生信分析

1 引言

结直肠癌是常见的消化道系统肿瘤之一, 其发病初期无显著症状, 发现时多为晚期, 导致其病死率较高^[1]。根据国际癌症研究机构 (IARC) 最新癌症数据库 GLOBOCAN2020, 中国结直肠癌的新发病例已从 2015 年

的 38.8 万例增加到了 2020 年的 55.5 万例, 以每年 7.4% 的速度快速攀升^[2]。结直肠癌和其他恶性肿瘤一样, 发病原因仍不清楚, 可以发生在结肠或直肠的任何部位, 但以直肠、乙状结肠最为多见。大多数结直肠癌的筛查是使用内窥镜检查完成的, 但其准确性、可靠性和安全性受到其侵入性筛查方法、内窥镜医师技术水平和病理学家以及费用的限制。因此寻找潜在的新型诊断生物标志物和治疗靶点具有重要的意义。

B 细胞易位基因 3 (BTG3) 编码的蛋白质是 BTG 基因家族 / 人表皮生长因子受体 2 (ErbB2 或 HER2) 基因家族转导子 (BTG/Tob) 的成员, 该家族还包括 BTG1、BTG2/ 人类细胞中的小鼠 12-O- 十四烷酰佛波醇 -13- 乙酸酯诱导

【作者简介】任东辉 (1983-), 男, 满族, 中国河北承德人, 硕士, 主治医师, 从事肿瘤治疗研究。

【通讯作者】郑华川 (1975-), 男, 中国辽宁沈阳人, 博士, 病理学主任医师、消化内科副主任医师, 从事肿瘤治疗研究。

序列 21 (TIS21) / 前蛋白转化酶 3 (PC3)、BTG3、BTG4/PC3B、Tob 和 Tob2^[3]。据报道, BTG3 是一种肿瘤抑制基因, 在多种恶性肿瘤中表达, 如卵巢癌、胃癌、肺癌、食管腺癌、前列腺癌^[4-8]。研究发现 BTG3 过表达通过调节 AKT/GSK3 β / β -Catenin 信号抑制上皮性卵巢癌细胞的增殖和侵袭^[9]。本研究的目标是利用生物信息学数据库及免疫组化阐明 BTG3 的表达以及相关信号通路在结直肠癌中的临床和病理学意义。

2 材料与方法

2.1 TCGA 数据库分析

使用 TCGA (<https://cancergenome.nih.gov/>) 数据库并使用 R 软件 (4.2.1) 中的 (TCGA-assemblyer) (R package: ggplot2 3.3.6, stats 4.2.1, car) 下载结直肠癌患者的表达 (RNA-seqV2) 和临床病理数据。我们整合了原始数据, 分析了 BTG3 mRNA 在癌症中的表达, 并将数据与患者的临床病理和预后数据进行了比较。

2.2 GEO 数据库分析

从美国国立生物技术信息中心 GEO 数据库中获得 GSE9348 (平台: Affymetrix-GPL570, 结直肠癌) 数据集的 BTG3 mRNA 表达谱 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), 用于分析癌症和正常组织之间的 BTG3 mRNA 表达。

2.3 KM plotter 分析

将 BTG3 输入 KM plotter (<http://kmplot.com>) 后, 我们分析了 BTG3 mRNA 在结直肠癌中的预后意义。

2.4 UALCAN 分析

我们使用 UALCAN 数据库 (<http://ualcan.path.uab.edu>) 分析 BTG3 在结直肠癌中的表达水平, 并将数据与癌症临床病理和预后参数进行比较。

2.5 仙桃分析

利用仙桃平台 (<https://www.xiantao.love/>) 分析 BTG3 基因的表达和甲基化情况。此外, 我们还利用仙桃平台寻找 BTG3 的差异及相关基因。通过 KEGG\GO KEGG 分析这些基因以构建信号通路。

2.6 免疫组织化学

结直肠癌和正常组织的芯片来源于神奈川县癌症中心附属医院及锦州医科大学附属医院用于免疫组化 (正常: 392 例; 癌症: 384 例)。所有患者术前均未接受化疗、放疗或辅助治疗。他们都提供了使用肿瘤组织进行临床研究的书面同意, 并且于医院伦理委员会批准了研究方案。过程: 结直肠癌基因组织芯片分别脱蜡、复水 3 次, 微波炉 20 分钟完成抗原修复。分别使用 3% 过氧化氢 (H₂O₂) 和 5% 牛血清白蛋白 (BSA) 阻断内源性过氧化物酶活性和非特异性结合位点 30 分钟。然后将载玻片与兔抗 BTG3 (1 : 100, MERCK, 德国, HPA018400) 在室温下孵育 4 小时。用 PBS 漂洗 3 次后, 将载玻片与含 HRP 的多克隆羊抗兔抗体 (1 : 200, DabIOSS, 中国, bs-0295G-HRP) 在室温下孵

育 2 小时。二氨基联苯胺 (DAB) 用于可视化特异性结合位点。用苏木精染色后, 将载玻片脱水、透明、封固并通过显微镜 (Nikon, Nikon Corporation, 日本) 观察、评估。

2.7 统计学分析

均数资料比较采用 Wilcoxon 秩和检验, 阳性率比较采用卡方检验。采用 Cox 比例风险模型进行多因素分析。双侧 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。所有数据均在 SPSS 17.0 软件 (IBM Corp, Armonk, NY, USA) 中进行分析。

3 结果

3.1 BTG3 mRNA 在结直肠癌中的表达、临床病理学和预后意义

根据仙桃数据库 (图 1A)、TCGA 数据库 (图 1B) 和 GEO 数据库 (图 1C) 显示 BTG3 在结直肠癌中的表达高于正常组织 ($P < 0.05$)。在 UALCAN 中, 结直肠癌中的 BTG3 甲基化低于正常组织 (图 1D, $P < 0.05$)。我们使用 Kaplan-Meier 生存曲线分析结果显示, 所有 BTG3 高表达的癌症患者比低表达的癌症患者表现出更长的无复发生存期 (1E, $P < 0.05$)。据仙桃数据库分析, BTG3 mRNA 表达与结直肠癌中 T helper cells、Th2 cells、Tcm、Th1 cells、CD8 T cells、Macrophages 细胞的浸润呈正相关。同时, 它与 iDC、Mast cells、NK CD56dim cells、pDC、TFH、NK CD56bright cells、Eosinophils、NK cells、Treg 细胞呈负相关 (图 1F, $P < 0.05$)。

3.2 BTG3 在结直肠癌中的相关基因及信号通路

根据仙桃数据库 BTG3 相关差异基因生成火山图, 显示结直肠癌中的 BTG3 低表达组和高表达组之间的表达的差异基因分布 (图 2A)。根据 GO KEGG 分析差异基因之间可能存在的共同作用通路是: 蛋白质消化吸收、味觉转导、有机羟基化合物运输、丝氨酸型内肽酶活性、核小体、味觉感受器活性、肠道脂质吸收、苦味感受器活性 (图 2B, $P < 0.05$)。根据仙桃数据库, 构建 BTG3 相关基因结直肠癌中的热图, 其中正相关基因如图 2 (图 2C, $P < 0.05$) 所示, 这些基因涉及蛋白质折叠、蛋白质稳定化、伴侣介导的蛋白质折叠、核糖体、内质网蛋白复合物、蛋白质折叠伴侣、未折叠蛋白结合、参与异型细胞间粘附的蛋白质结合、糖基磷脂酰肌醇 (GPI) - 锚定生物合成。其中负相关基因如图 2 (图 2D, $P < 0.05$) 所示这些基因涉及网格蛋白囊泡包被、Wnt 信号体、核糖皮质激素受体结合、磷脂酰磷脂酶 B 活性、泛素介导的蛋白水解、核类视黄醇 X 受体、Wnt 激活受体活性。

3.3 BTG3 蛋白表达在结直肠癌中的临床病理意义

免疫组化结果显示, BTG3 蛋白在正常结直肠细胞和结直肠癌细胞中呈阳性表达 (图 3)。如表 1 所示, 结直肠正常组织和结直肠癌中 BTG3 表达的阳性率分别为 41.9% (157/375) 和 80.2% (308/384), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

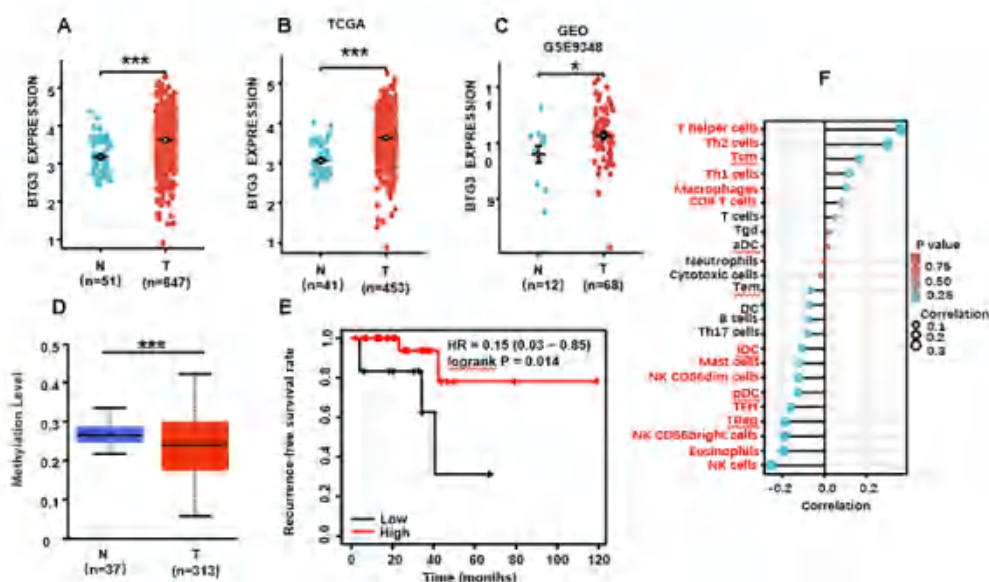


图 1 (A、B、C) 分析并汇总 BTG3 在正常和结直肠癌人群中表达差异；(D) 正常和结直肠癌病人 BTG3 启动子甲基化水平差异；(E) BTG3 差异表达的生存分析；(F) 结直肠癌中 BTG3 表达与浸润免疫细胞的关系

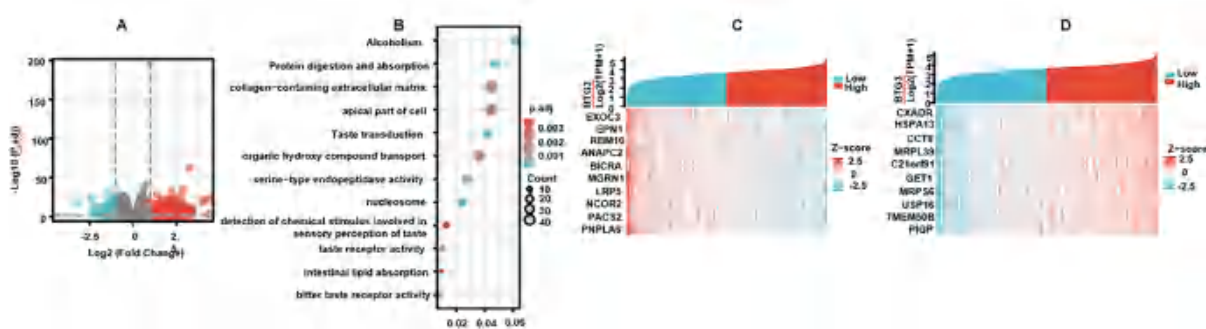


图 2 (A) 分析汇总 BTG3 相关差异基因生成火山图；(B) GO KEGG 分析基因之间可能存在的共同作用通路；(C) 分析汇总 BTG3 正相关基因构建热图 (D) 分析汇总 BTG3 负相关基因构建热图

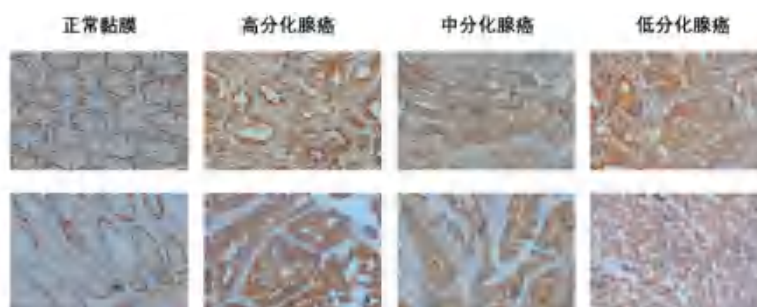


图 3 免疫组化染色

表 1 BTG3 在结直肠腺瘤 - 腺癌序列中的表达

Groups	BTG3expression			
	n	-	+	PR (%)
Non-neoplastic mucosa	375	218	157	41.9
Adenoma	17	5	12	70.6*
Adenocarcinomas	384	76	308	80.2**

PR: positive rate; *: compared with non-neoplastic mucosa, $P < 0.001$; **: compared with non-neoplastic mucosa or adenoma, $P < 0.001$.

4 讨论

结直肠癌是中国最常见的消化道肿瘤之一，严重威胁国人健康。虽然化疗、放疗、靶向治疗、基因治疗和生物治疗中广泛应用于结直肠癌综合治疗，但结直肠癌耐药导致晚期侵袭和转移仍是其生存率无法大幅提升的主要原因。近年来分子遗传学研究证明，结直肠癌是异型性极强的恶性肿瘤，结直肠癌发生和发展是多阶段、多基因和多因素参与的复杂过程，因此寻找结直肠癌发生相关分子标志物及分子靶标可极大推动结直肠癌病因学和治疗学发展。

BTG3 属于 B 细胞迁移基因/ErbB2 转录因子家族(BTG/Tob)，其 N 端通过结合 E2F1 蛋白，阻碍 DP1 和 E2F1 转录因子结合 DNA，进而使 DNA 合成受阻^[10]。研究发现肾癌中 BTG3 的表达会因 DNA 甲基化导致启动子失活而降低^[11]。在口腔鳞状细胞癌中，BTG3 的下调经常伴随着肿瘤的发展，并且这种抑制可通过去甲基化剂(5Aza-C)治疗逆转，表明 BTG3 基因的启动子被高甲基化。在这里，我们发现 BTG3 表达在结直肠癌中上调，并且与其启动子甲基化呈负相关。这些结果表明，BTG3 的表达与结直肠癌的发生密切相关，同时因其甲基化影响，蛋白表达减少，从而抑制肿瘤的进展。

研究发现 BTG3 被确定为急性淋巴细胞白血病(ALL)的新型预后标志物，其表达在 T 细胞 ALL 患者中升高 1.6 倍。AKT 是一种在癌症中经常失调的激酶。BTG3 消融导致 AKT 活性增加，从而磷酸化和抑制糖原合酶激酶 3 β 。同时引起 β -连环蛋白/T 细胞因子活性升高。论文分析了在结直肠癌与 BTG3 的表达相关的免疫浸润细胞，结果表明，BTG3 的表达直接或间接地影响免疫细胞与肿瘤细胞之间的相互作用。通过免疫浸润图，可以直观地了解不同类型的免疫细胞在肿瘤组织中的分布情况，对于预测肿瘤免疫治疗效果具有重要意义。

研究发现 BTG3 过表达通过调节 AKT/GSK3 β / β -Catenin 信号通路，抑制卵巢上皮性癌细胞的增殖和侵袭，促进细胞凋亡。BTG3 是 miR-106b-5p 的直接靶标，其表达水平与 miR-106b-5p 表达呈负相关，miR-106b-5p 通过 BTG3/Bcl-xL/p27 信号通路促进细胞增殖和细胞周期并增加肝癌细胞对索拉非尼的耐药性。根据生信分析，我们构建 BTG3 相关及差异基因的火山图及热图，并通过 GO KEGG 与 GESE 分析基因之间可能存在的共同作用通路。通过研究这些通路，发现 BTG3 相关基因在功能上可能存在协同作用及这些基因可能共同参与肿瘤抑制或免疫调节等过程，从而为癌症的发生、发展和转移机制提供线索。

免疫组化结果清晰显示，BTG3 蛋白在结直肠癌组织中的表达水平显著高于正常组织，说明其可能在结直肠癌的发生、发展中发挥重要作用，有望成为结直肠癌诊断和治疗的新靶点。BTG3 在正常结直肠组织、高分化、中分化、低分化癌中均阳性表达。表明其可能参与了结直肠肿瘤发生的早

期过程。也许是促进了细胞的异常增殖、分化或癌变的诱因。

综上所述，BTG3 在结直肠癌中的高表达具有重要的生物学意义。其高表达可能与结直肠癌的发生发展密切相关，通过多种途径参与肿瘤细胞的增殖、存活和转移过程。与临床病理特征的关联进一步提示了其作为潜在生物标志物的价值。然而，对于其具体的作用机制和调控网络仍需深入研究。

参考文献

- [1] Koi M, Carethers JM. The colorectal cancer immune microenvironment and approach to immunotherapies[J]. *Future Oncol*, 2017,13(18):1633-1647.
- [2] 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.
- [3] Matsuda S, Rouault J, Magaud J, et al. In search of a function for the TIS21/PC3/BTG1/TOB family[J]. *FEBS Lett*, 2001,497(2-3):67-72.
- [4] Deng B, Zhao Y, Gou W, et al. Decreased expression of BTG3 was linked to carcinogenesis, aggressiveness, and prognosis of ovarian carcinoma[J]. *Tumour Biol*, 2013,34(5):2617-2624.
- [5] Ren XL, Zhu XH, Li XM, et al. Down-regulation of BTG3 promotes cell proliferation, migration and invasion and predicts survival in gastric cancer[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2015,141(3):397-405.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] Zheng HC, He HY, Wu JC, et al. The suppressing effects of BTG3 expression on aggressive behaviors and phenotypes of colorectal cancer: An in vitro and vivo study[J]. *Oncotarget*, 2017,8(11):18322-18336.
- [11] 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.