

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.13.015

APRO 家族基因在胃癌中的表达及预后意义*

白玉茹¹ 乔璐¹ 谢宁¹ 刘娜^{1,2Δ} 王进海^{1Δ}

(1 西安交通大学第二附属医院消化内科 陕西省临床重点实验室 陕西 西安 710004;

2 肿瘤生物学国家重点实验室第四军医大学 陕西 西安 710032)

摘要 目的:基于大数据挖掘分析 BTG/Tob 抗增殖蛋白家族(anti-proliferative protein family, APRO)基因在胃癌组织的表达及其对胃癌患者预后的影响。**方法:**采用 Oncomine 数据库分析 APRO 家族 6 个成员在胃癌组织中的 mRNA 表达情况,通过 Kaplan-Meier Plotter 数据库进行胃癌患者总生存期的分析。**结果:**相比正常胃组织,BTG2 在胃癌组织中呈低表达;BTG3 在肠型胃癌组织中呈高表达,而在总体胃癌组织中呈低表达。BTG3 低表达的患者总生存期较短;对 5-氟尿嘧啶辅助化疗的胃癌患者,低表达 BTG2 的预后较差。**结论:**BTG2、BTG3 的 mRNA 表达在胃癌和正常胃组织中有明显差异。BTG3 低表达的胃癌患者预后较差;BTG2 可能参与调节胃癌患者 5-氟尿嘧啶治疗的敏感性。

关键词:胃癌;APRO 家族;表达;预后

中图分类号:R-058;R735.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)13-2473-05

Expression and Prognostic Value of APRO Family in Gastric Cancer*

BAI Yu-ru¹ QIAO Lu¹, XIE Ning¹, LIU Na^{1,2Δ}, WANG Jin-hai^{1Δ}

(1 Department of Gastroenterology, The Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University,

Key Clinical Laboratory of Shaanxi, Xi'an, Shaanxi, 710004, China;

2 State Key Laboratory of Tumor Biology, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To analyze the expression and prognostic value of BTG/Tob anti-proliferative (APRO) protein family in gastric cancer based on big data mining. **Methods:** The mRNA expression levels of six members of this family in gastric cancer tissues were analyzed via the Oncomine database. Moreover, the Kaplan-Meier database was used to evaluate the effect on overall survival (OS) of patients with gastric cancer. **Results:** Compared with the normal gastric tissue, BTG2 expression was lower in gastric cancer tissue, BTG3 expression was upregulated in intestinal gastric cancer tissue, but downregulated in total gastric cancer tissue. Patients with lower BTG3 expression had a shorter overall survival; gastric cancer patients with 5-fluorouracil based adjuvant chemotherapy had a worse prognosis in low BTG2 expression group. **Conclusions:** mRNA expression of BTG2 and BTG3 in gastric cancer and normal gastric tissues were significantly different. Patients with lower BTG3 expression had a poor prognosis. In addition, BTG2 may be involved in the sensitivity of 5-fluorouracil based adjuvant chemotherapy in gastric cancer patients.

Key words: Gastric cancer; APRO family; Expression; Prognosis

Chinese Library Classification(CLC): R-058; R735.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)13-2473-05

前言

胃癌(gastric carcinoma)是起源于胃黏膜上皮的恶性肿瘤,是全球癌症相关死亡率的第三大原因^[1],是我国癌症相关死亡率的第二大原因^[2]。胃癌的治疗方案主要包括手术、放化疗。但很多患者在确诊时已经是中晚期,即使进行了胃癌根治术,术后仍有较高的复发率,为社会带来了巨大的经济负担^[3]。随着“精准医学”概念的提出和推广,从分子水平研究疾病的发生、发展及预后,有利于发现新的分子靶点,提供更精确的治

疗方案。

20 世纪 90 年代初期,研究者发现一些在调节细胞增殖中起重要作用的基因群,称为 BTG/Tob 抗增殖蛋白家族(anti-proliferative protein family, APRO)。目前,该家族已有超过 20 个家族成员,在人类中包括 6 个成员,即 TOB1/TOB、TOB2、BTG1、BTG2/PC3/TIS21、BTG3/ANA 和 BTG4/PC3B^[4]。研究证明该家族的蛋白不仅参与调控细胞的生长发育^[5],还在各种肿瘤的增殖、凋亡、侵袭和转移中发挥着重要的作用^[6-8],并且一些成员对于肿瘤的预后具有重要意义^[9,10]。目前,尚无 APRO 家族在胃癌

* 基金项目:肿瘤生物学国家重点实验室开放基金项目(CBSKL201731)

作者简介:白玉茹(1989-),博士研究生,主要研究方向:消化系统肿瘤机制研究,E-mail: xff071819@163.com

Δ 通讯作者:刘娜(1977-),博士,副主任医师,主要研究方向:消化系统肿瘤分子机制研究,E-mail: liunafmmu@163.com,电话:18629082319

王进海(1963-),博士,博士生导师,教授,主要研究方向:胃肠道动力性疾病机制及治疗研究,

E-mail: jinhaiwang@hotmail.com,电话:13609281113

(收稿日期:2018-01-21 接受日期:2018-02-28)

中的表达和预后的系统研究,本研究采用 Oncomine 数据库和 Kaplan-Meier Plotter 数据库,系统性分析了 APRO 家族 6 个成员在胃癌中的表达和预后,以期胃癌患者个体化的治疗方案的选择提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 采用 Oncomine 数据库分析 APRO 家族在胃癌组织中的表达情况

采用 Oncomine 数据库(<http://www.oncomine.org>)在线分析 APRO 家族在胃癌组织中的表达。设置筛选条件如下:① Cancer Type:Gastric Cancer; ② Gene:TOB1、TOB2、BTG1、BTG2、BTG3、BTG4; ③ Data Type:mRNA; ④ Sample Type:Clinical Specimen; ⑤ Analysis Type:Cancervs.Normal Analysis; ⑥ 临界值设定:P value <0.01, fold change>2, gene rank=top 10%。

1.2 采用 Kaplan-Meier Plotter 数据库分析 APRO 家族对胃癌

患者预后的影响

采用 Kaplan-MeierPlotter 数据库(<http://kmplot.com/analysis/>)的胃癌数据集^[11]进行在线生存分析。筛选条件如下:① Cancer:Gastric Cancer; ② Gene:BTG2、BTG3; ③ Survival:Overall Survival (OS); ④ Treatment:surgery alone/5-FU based adjuvant/other adjuvant。P<0.01 认为差异有意义。

2 结果

2.1 APRO 家族在胃癌组织中的表达

Oncomine 数据库显示:胃癌与正常组织中 TOB1、TOB2、BTG1 和 BTG4 的 mRNA 表达无明显差异(P>0.05)。相比正常胃组织,弥漫型胃癌组织中 BTG2 呈低表达,而在其他类型胃癌组织中无明显差异(图 1A);BTG3 在肠型胃癌组织中呈高表达(图 1B),而在总体胃癌组织中呈低表达(图 1C)。详见表 1。

表 1 APRO 家族在胃癌组织中的表达
Table 1 Expression of APRO family in gastric cancer tissues

Gene	Dataset	Normal (Cases)	Tumor (Cases)	Fold change	t-Test	P-value
BTG2	Cho Gastric	Gastric Tissue (19)	Diffuse Gastric Adenocarcinoma (31)	-2.02	-4.401	6.43E-05
BTG3	Wang Gastric	Gastric Mucosa (12) Gastric Tissue (3)	Gastric Cancer (12)	-2.036	-3.375	0.002
	DErrico Gastric	Gastric Mucosa (31)	Gastric Intestinal Type Adenocarcinoma (26)	2.316	7.522	1.05E-09

Note: All data were obtained from the Oncomine database.

2.2 BTG2 和 BTG3 基因表达对胃癌患者预后的影响

进一步分析在胃癌组织中 APRO 家族表达有差异的基因,即 BTG2 和 BTG3 对胃癌患者预后的影响,结果详见表 2。Kaplan-Meier Plotter 数据库显示对胃癌患者而言,BTG3 低表达总生存期较短(图 2A),与既往研究相一致。

然而,BTG2 的表达对总体胃癌患者的预后无明显影响,因此我们进一步进行了胃癌患者不同治疗方式的分层分析。结果显示:BTG2 表达水平对接受 5-氟尿嘧啶辅助化疗的胃癌患者总生存时间有显著的影响,即低表达 BTG2 的患者预后较差(图 2B)。

3 讨论

本研究首先采用 Oncomine 数据库分析 APRO 家族基因在胃癌组织中的 mRNA 表达,结果显示:胃癌与正常胃组织中 TOB1、TOB2、BTG1 和 BTG4 的 mRNA 表达无明显差异。但 Zhang^[12]通过免疫组化和 western blot 的方法检测胃癌组织中 TOB1 的蛋白表达情况,发现 TOB1 在胃癌组织中的表达水平显著低于癌旁正常组织,且与浸润深度、分化分级和淋巴结转移有显著的相关性;Guan^[13]也有相同的发现。BTG1 也被证实是在胃癌组织中的表达低于正常组织,弥漫型胃癌的 BTG1 表达低于肠型和混合型,且与肿瘤浸润深度、淋巴管和静脉浸润、淋巴结转移、TNM 分期和预后均相关。体外实验表明过表达 BTG1 可以抑制胃癌细胞系的增殖、迁移和侵袭,诱导细胞周

期阻滞和凋亡,增加化疗敏感性,有可能作为胃癌基因治疗的潜在靶标^[10]。BTG4 因启动子区 CpG 岛发生甲基化失活,在原发性胃癌组织中的表达水平也显著降低^[14]。目前,尚未见关于 TOB2 在胃癌中表达的相关研究。这些结论与我们的研究结果稍有不符,我们分析有以下两方面的原因:一是研究病例的纳入标准不同,我们在收集数据时排除了基因差异倍数较小的,及基因差异排序较后的病例,使得差异病例有所减少,最终导致差异无统计学意义;二是我们的研究是 mRNA 水平的表达研究,而既往研究大多是蛋白水平。因此,仍需扩大样本量,进一步进行组织和细胞蛋白水平的表达验证以明确其表达情况。

此外,我们发现 BTG2 在胃癌组织中呈低表达。Zhang 等^[15]在胃癌细胞系中过表达 BTG2 后,抑制了胃癌细胞的生长和增殖,但对胃癌细胞的侵袭转移能力无明显影响。此外既往研究表明 BTG2 在多种肿瘤组织中低表达。Huang 等^[16]研究发现 BTG2 在肝癌组织中呈低表达,与 TNM 分期、肿瘤大小及血管侵犯情况相关;并且与 BTG2 高表达的肝癌患者相比,BTG2 低表达的肝癌患者总体生存期和无病生存期更短,即 BTG2 低表达的肝癌患者预后更差。还有研究者通过 qRT-PCR 和免疫印迹方法测定人膀胱组织中的 BTG2 表达,发现与癌旁组织相比,BTG2 在膀胱癌组织中表达较低^[17]。这些研究结果与我们的结论都是一致的。

本研究还发现 BTG3 在肠型胃癌组织中呈高表达,而在总体胃癌组织中呈低表达。目前尚未见 BTG3 在不同分型的胃癌

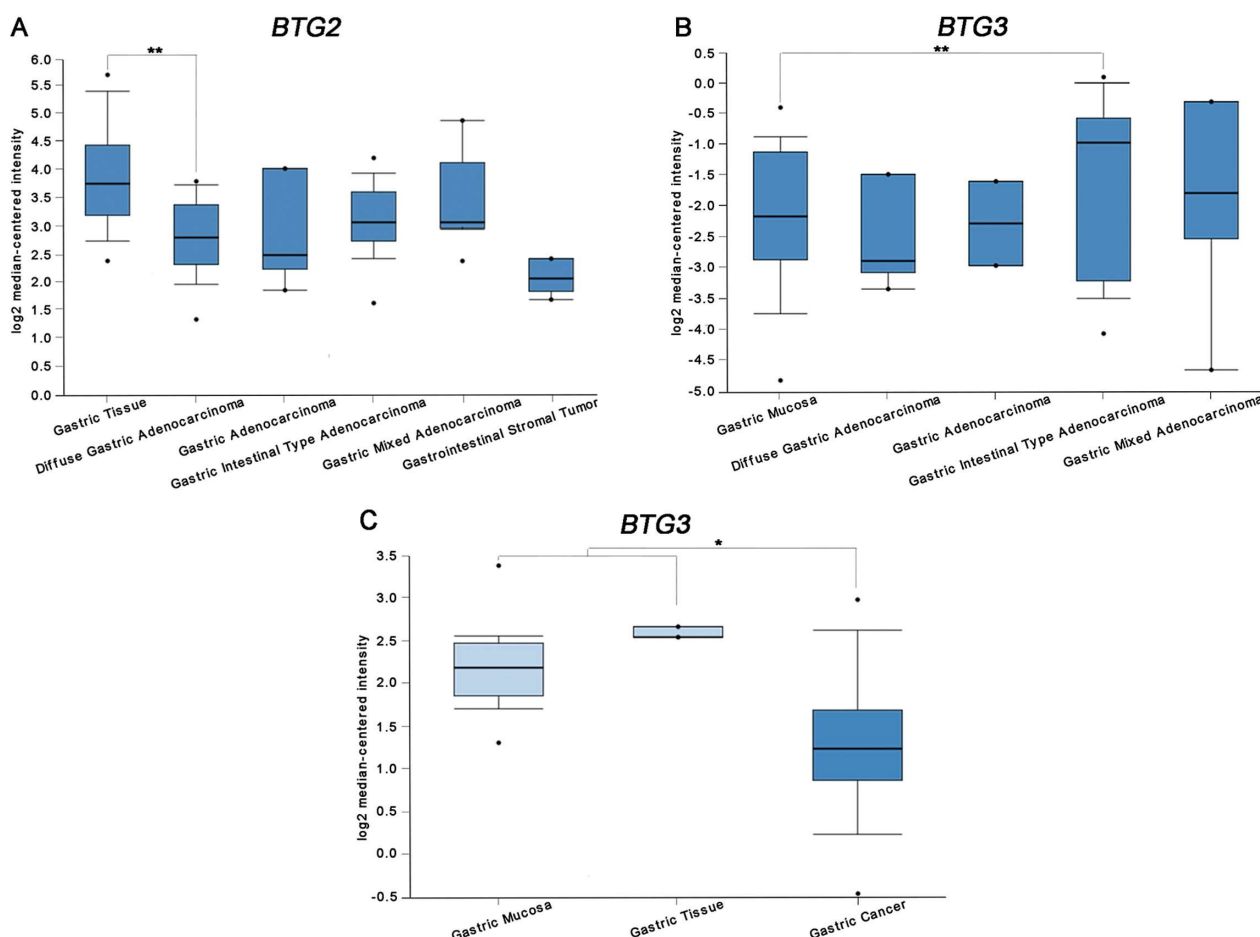


图1 APRO 家族在胃癌组织中的表达

Fig.1 Expression of APRO family in gastric cancer tissues

Note: * $P<0.01$, ** $P<0.001$.

组织中表达情况的研究,但 Ren 等^[18]也发现在胃癌组织中 BTG3 表达明显降低,且与远处转移相关;过表达 BTG3 可以抑制胃癌的增殖、迁移和侵袭能力。此外,BTG3 在结肠癌组织中表达下降,且与病理分型、侵袭深度、远处转移、TNM 分期相关;体外实验进一步证实降低结肠癌细胞系中 BTG3 的表达,能够促进细胞增殖、迁移、侵袭,抑制细胞的凋亡^[19]。Chen 等^[20]在胰腺癌中也有类似的发现,他们利用 qRT-PCR 及免疫组化的方法检测 BTG3 在胰腺导管腺癌组织中的表达情况,结果显示 BTG3 主要表达于细胞质中,且在胰腺导管腺癌组织中的表达水平明显低于正常胰腺组织,且与 TNM 分期相关。由此可见,BTG3 在多种肿瘤组织中呈低表达。

我们进一步通过 Kaplan-Meier Plotter 数据库分析 BTG2 及 BTG3 在胃癌患者预后中的意义,结果表明 BTG3 低表达的胃癌患者总生存期较短,Ren 等^[18]也发现 BTG3 低表达的胃癌患者拥有更短的总生存期。此外,Lv 等^[19]发现 BTG3 低表达的结肠癌患者拥有更短的总生存期和无病生存期。Kawakubo 等^[21]发现雌激素受体阳性(ER+)的乳腺癌患者,BTG3 的核表达明显减少,且与病理分级和肿瘤大小明显相关。在胰腺导管腺癌患者中,Kaplan-Meier 生存分析显示 BTG3 低表达的患者无病生存率明显低于高表达者;Cox 多因素分析显示对于进行手术治疗的胰腺癌患者,BTG3 的表达水平是影响其术后生存的

独立预后因素^[20]。

很遗憾,我们并未发现 BTG2 的表达对总体胃癌患者具有显著的影响。但根据胃癌患者的治疗方式分层后进一步分析,结果显示在 5-氟尿嘧啶辅助化疗的胃癌患者中,BTG2 表达较低的患者预后较差,提示我们对于 BTG2 低表达的胃癌患者,5-氟尿嘧啶辅助化疗的方案并不能延长患者的生存期,甚至具有消极作用。这提示 BTG2 表达较低的胃癌患者可能存在对 5-氟尿嘧啶的耐药性,Takahashi 等^[22]在乳腺癌患者耐药研究中有类似的发现。他们分析了 60 名单一他莫昔芬辅助治疗的乳腺癌患者,发现 BTG2 表达较高的患者表现出更好的临床存活率,并且是无病生存期的唯一独立预后因素。体外细胞实验与体内实验均证实增加 BTG2 的表达能够提高乳腺癌细胞对他莫昔芬治疗的敏感性^[23]。Wang^[24]研究发现 γ 射线照射能够抑制人肺癌细胞系 A549 的活力,促进细胞凋亡和细胞周期阻滞,而敲低 BTG2 可以减轻 γ 射线对 A549 细胞的影响,提高 BTG2 的表达可以提高肺癌细胞对 γ 射线治疗的敏感性。这些都提供我们一个新的思路,BTG2 也有可能参与调节胃癌患者 5-氟尿嘧啶治疗的敏感性,但需要进一步的体内外实验验证并深入研究其分子机制。

综上所述,本研究系统性分析了 APRO 家族基因在胃癌组织中的 mRNA 表达和治疗相关的预后意义,为胃癌患者精准

表 2 BTG2 和 BTG3 的表达对胃癌患者预后的影响

Table 2 Correlation of BTG2 and BTG3 expression with the survival outcome of gastric cancer patients

Gene	Affymetrix ID	Survival outcome	No. of cases	Cut-off value	HR	95% CI	P-value
all patients							
BTG2	201235_s_at	OS	876	604.5	1.17	0.97-1.42	0.0933
	201236_s_at						
BTG3	205548_s_at	OS	876	937.67	0.7	0.59-0.84	0.00011
	213134_x_at						
	215425_at						
surgery alone							
BTG2	201235_s_at	OS	380	691	1.19	0.89-1.58	0.2434
	201236_s_at						
5-FU based adjuvant							
BTG2	201235_s_at	OS	153	775	0.4	0.27-0.59	0.000018
	201236_s_at						
other adjuvant							
BTG2	201235_s_at	OS	76	745	1.58	0.66-3.8	0.3045
	201236_s_at						

Note: All data were obtained from the Kaplan-Meier Plotter database.

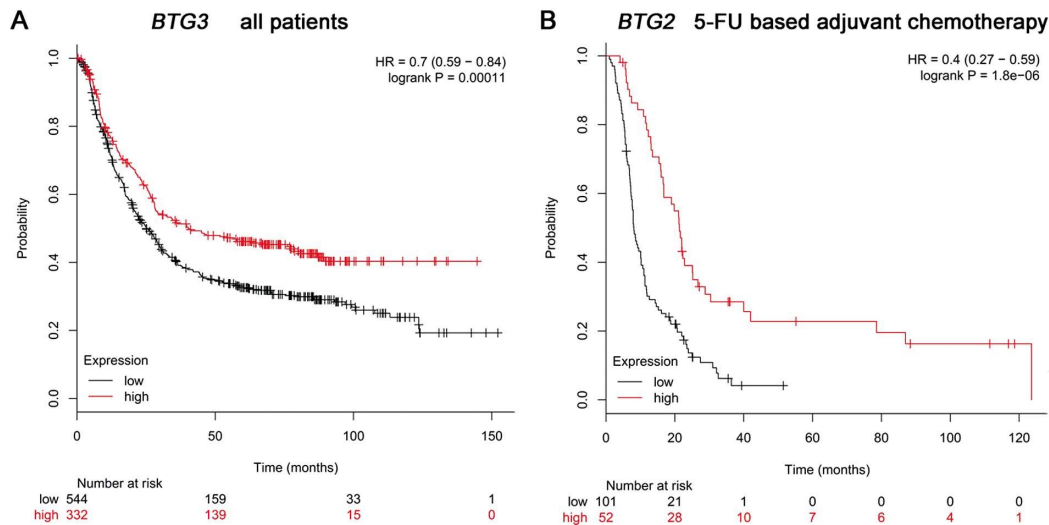


图 2BTG2 和 BTG3 对胃癌患者预后的影响

Fig.2 Prognostic significance of BTG2 and BTG3 in patients with gastric cancer

治疗方案的选择提供了新的思路。本研究的不足之处在于仅在 mRNA 水平进行分析, 需要进一步进行蛋白水平的验证和体内外实验深入研究 APRO 家族在胃癌中发挥作用的具体分子机制。

参考文献(References)

[1] Collaboration, Fitzmaurice C, Dicker D, et al. The Global Burden of Cancer 2013[J]. JAMA Oncol, 2015, 1(4): 505-527
[2] Chen WQ, Zheng RS, Baade PD, et al. Cancer Statistics in China, 2015[J]. Ca-a Cancer Journal for Clinicians, 2016, 66(2): 115-132
[3] Maconi G, Manes G and Porro GB. Role of symptoms in diagnosis and

outcome of gastric cancer [J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(8): 1149-1155
[4] Winkler GS. The mammalian anti-proliferative BTG/Tob protein family[J]. J Cell Physiol, 2010, 222(1): 66-72
[5] 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
[6] Lee JC, Chung LC, Chen YJ, et al. Upregulation of B-cell translocation gene 2 by epigallocatechin-3-gallate via p38 and ERK signaling blocks cell proliferation in human oral squamous cell carcinoma cells[J]. Cancer Lett, 2015, 360(2): 310-318
[7] Li BS, Zuo QF, Zhao YL, et al. MicroRNA-25 promotes gastric cancer

- migration, invasion and proliferation by directly targeting transducer of ERBB2, 1 and correlates with poor survival[J]. *Oncogene*, 2015, 34 (20): 2556-2565
- [8] Zhao S, Chen SR, Yang XF, et al. BTG1 might be employed as a biomarker for carcinogenesis and a target for gene therapy in colorectal cancers[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(5): 7502-7520
- [9] Helms MW, Kemming D, Contag CH, et al. TOB1 is regulated by EGF-dependent HER2 and EGFR signaling, is highly phosphorylated, and indicates poor prognosis in node-negative breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(12): 5049-5056
- [10] Zheng HC, Li J, Shen DF, et al. BTG1 expression correlates with pathogenesis, aggressive behaviors and prognosis of gastric cancer: a potential target for gene therapy[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(23): 19685-19705
- [11] Szasz AM, Lanczky A, Nagy A, et al. Cross-validation of survival associated biomarkers in gastric cancer using transcriptomic data of 1,065 patients[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(31): 49322-49333
- [12] Zhang SQ, Sun KK, Wu XY, et al. Clinicopathological significance of cytoplasmic transducer of ErbB2. 1 expression in gastric cancer[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(1): 1177-1182
- [13] Guan R, Peng L, Wang D, et al. Decreased TOB1 expression and increased phosphorylation of nuclear TOB1 promotes gastric cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(43): 75243-75253
- [14] Dong W, Tu S, Xie J, et al. Frequent promoter hypermethylation and transcriptional downregulation of BTG4 gene in gastric cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 387(1): 132-138
- [15] Zhang L, Huang H, Wu K, et al. Impact of BTG2 expression on proliferation and invasion of gastric cancer cells in vitro[J]. *Mol Biol Rep*, 2010, 37(6): 2579-2586
- [16] Huang CS, Zhai JM, Zhu XX, et al. BTG2 Is Down-Regulated and Inhibits Cancer Stem Cell-Like Features of Side Population Cells in Hepatocellular Carcinoma[J]. *Digestive Diseases and Sciences*, 2017, 62(12): 3501-3510
- [17] Tsui KH, Chiang KC, Lin YH, et al. BTG2 is a tumor suppressor gene upregulated by p53 and PTEN in human bladder carcinoma cells[J]. *Cancer Med*, 2017[Epub ahead of print]
- [18] 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
- [19] Lv C, Wang H, Tong Y, et al. The function of BTG3 in colorectal cancer cells and its possible signaling pathway [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2017 [Epub ahead of print]
- [20] 陈静, 周中成, 刘文斌, 等. BTG3 在胰腺导管腺癌中的表达及其预后价值[J]. *中华外科杂志*, 2017, 55(11): 863-867
- Chen Jing, Zhou Zhong-cheng, Liu Wen-bin, et al. Expression of B cell transposition gene 3 in pancreatic ductal adenocarcinoma and its prognostic value[J]. *Chinese Journal of Surgery*, 2017, 55(11): 863-867
- [21] Kawakubo H, Brachtel E, Hayashida T, et al. Loss of B-cell translocation gene-2 in estrogen receptor-positive breast carcinoma is associated with tumor grade and overexpression of cyclin D1 protein[J]. *Cancer Research*, 2006, 66(14): 7075-7082
- [22] Takahashi M, Hayashida T, Okazaki H, et al. Loss of B-cell translocation gene 2 expression in estrogen receptor-positive breast cancer predicts tamoxifen resistance [J]. *Cancer Sci*, 2014, 105(6): 675-682
- [23] Hu X, Xing L, Jiao Y, et al. BTG2 overexpression increases the radiosensitivity of breast cancer cells in vitro and in vivo [J]. *Oncol Res*, 2013, 20(10): 457-465
- [24] Wang PH, Cai YY, Ling DJ, et al. Gamma Irradiation Upregulates B-cell Translocation Gene 2 to Attenuate Cell Proliferation of Lung Cancer Cells Through the JNK and NF-kappa B Pathways [J]. *Oncology Research*, 2017, 25(7): 1199-1205

(上接第 2460 页)

- [14] Sponton CH, Kajimura S. Burning Fat and Building Bone by FSH Blockade[J]. *Cell Metab*, 2017, 26(2): 285-287
- [15] 潘丰慧, 杨海燕, 王惠, 等. 女性年龄相关的性激素水平与骨代谢指标的关系[J]. *现代生物医学进展*, 2017, 17(18): 3579-3582, 3591
- Pan Feng-hui, Yang Hai-yan, Wang Hui, et al. Relationship of Age-related Levels of Serum Sex Hormones with Bone Metabolism Markers in Women [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2017, 17 (18): 3579-3582, 3591
- [16] Oudshoorn SC, van Tilborg TC, Hamdine O, et al. Ovarian response to controlled ovarian hyperstimulation: what does serum FSH say?[J]. *Hum Reprod*, 2017, 32(8): 1701-1709
- [17] Wei S, Gong Z, Guo H, et al. FSH and eCG impact follicles development and expression of ovarian FSHR and caspase-9 in mice [J]. *Iran J Vet Res*, 2017, 18(2): 79-85
- [18] Klisic A, Kavaric N, Jovanovic M, et al. Bioavailable testosterone is independently associated with Fatty Liver Index in postmenopausal women[J]. *Arch Med Sci*, 2017, 13(5): 1188-1196
- [19] 刘宣民. 胰岛素样因子、睾酮及骨代谢指标预测老年男性骨质疏松性骨折的意义[J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(24): 3778-3782
- Liu Xuan-min. Insulin-like factor, testosterone and bone metabolism indexes in the prediction of osteoporotic fractures in elderly men[J]. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 2015, 19(24): 3778-3782
- [20] 曲志成, 孙其伟, 赵李琳, 等. 降糖化瘀中药组分对糖尿病肾病模型大鼠丙二醛、过氧化物歧化酶、一氧化氮、一氧化氮合成酶的影响[J]. *国际中医中药杂志*, 2014, 36(1): 36-39
- Qu Zhi-cheng, Sun Qi-wei, Zhao Li-lin, et al. Effects of hypoglycemic Chinese medicine composition on diabetic nephropathy rats malondialdehyde superoxide dismutase nitric oxide and nitric oxide synthase [J]. *International Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2014, 36(1): 36-39