

网络出版时间:2022-1-25 7:27 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220124.0939.003.html

Bcl-2 结合抗凋亡基因家族在泛癌中的作用

李雅娴,李永翔

摘要 目的 基于 TCGA 数据库探讨 Bcl-2 结合抗凋亡基因 (BAGs) 家族在多种肿瘤中的功能作用。方法 从 TCGA 中下载 11 057 个肿瘤样本,由此对 BAGs 家族 (BAG1~6) 进行多维分析。结果 BAGs 家族在肿瘤和正常组织中的表达存在差异,并且不同 BAG 基因的表达对不同癌症的生存预后的影响差异有统计学意义。结论 Bcl-2 结合抗凋亡基因可能可作为多种癌症的潜在诊断和预后评估标志物,并可能会为患者术后个体化治疗提供理论支持。

关键词 BAGs 基因;泛癌;功能

中图分类号 R 73-31

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)03-0349-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.03.003

Bcl-2 结合抗凋亡基因 (Bcl-2-associated athanogenes, BAGs) 家族编码的蛋白是一个多功能的协同蛋白聚糖组,其编码蛋白与 Bcl-2 家族蛋白无氨基酸同源序列,是一种新的非 Bcl-2 家族的 Bcl-2 结合蛋白,与已知在细胞存活和细胞死亡途径中起作用的不同结合配偶体相互作用^[1]。6 个 BAG 家族成员共享一个进化保守序列——“BAG 结构域”,这些编码蛋白通过该结构域各自与分子伴侣——70 ku 热休克蛋白 (heatshockprotein70, HSP70) 相互作用^[2]。事实上,虽然 BAG 蛋白可以与 Bcl-2 相互作用,增强其抗凋亡作用,但是其主要功能仍然是作为 HSP70 的辅助伴侣控制蛋白质稳态。此外,由于 BAG 蛋白可以与 Bcl-2 相互作用并增加其抗凋亡能力,所以可以进一步推测 BAG 具有致癌作用^[3],因此,BAGs 成为目前癌症研究的焦点,对该家族的研究可能会有助于推进未来癌症的靶向治疗发展。

1 材料与方法

1.1 数据下载与处理

2021 年 4 月 8 日,从 UCSC

Xena 数据库的 GDC TCGA 集中下载了包括 33 种肿瘤类型的 11 057 例样本数据,其中包括该基因家族的表达谱、表型信息以及存活数据^[4]。另外,从数据库中获得了所有患者的人口统计学资料、肿瘤信息和随访数据。在本研究中,TCGA 肿瘤的 33 种类型和缩写采用国际通用说法。

1.2 肿瘤与正常组织中 BAGs 的差异表达分析和共表达分析 对于下载的原始数据,本研究使用“ggpubr”R 包通过 Wilcoxon 检验对肿瘤和正常组织之间的差异表达进行分析,在呈现的热图结果中,6 个 BAG 家族基因在泛癌中的表达差异以 log2 倍变化的形式呈现。另外,本研究利用“corrplot”R 包在转录水平上对 BAG 家族基因之间进行共表达分析^[5],阐明每两个 BAG 基因之间的潜在表达模式。

1.3 临床相关性分析 根据下载的原始数据中的中位表达水平,将患者分为高表达组和低表达组,再利用 R 包分析表达高水平和低水平 BAGs 基因的患者之间的总体生存结果的差异,从而生成了泛癌中 BAGs 基因的生存分析图 (Kaplan-Meier plots)。同时,应用 Cox 比例风险回归来评估每个肿瘤类型中 BAG1、BAG2、BAG3、BAG4、BAG5 和 BAG6 的风险比。

1.4 免疫亚型分析 根据肿瘤的 6 种免疫亚型 (C1~C6): 伤口愈合型 (C1)、IFN- γ 主导型 (C2)、炎症型 (C3)、淋巴细胞殆尽型 (C4)、免疫静默型 (C5) 和 TGF- β 主导型 (C6),评估了 TCGA 肿瘤类型中 6 种不同免疫亚型的 BAG 家族的 mRNA 表达水平,并用 Kruskal 检验进行了差异表达分析。

1.5 干细胞指标与泛癌微环境 使用“estimate”R 包和“limma”R 包在 6 个 BAG 基因的表达水平和基质细胞得分之间进行 Spearman 相关分析^[6],并使用一类逻辑回归 (one-class logistic regression, OCLR) 算法计算了 TCGA 肿瘤样本的干细胞指数,并基于基因表达和干细胞指数进行了 Spearman 相关分析^[7],干细胞指数包括 DNAss 和 RNAss^[8]。具体而言,本研究应用了 RNAss、DNAss、基质细胞得分、免疫细胞得分和综合得分 (基质细胞得分和免疫细胞得分的代数),分析与 PPAR 转录表达的相关性。

2021-09-27 接收

基金项目:国家自然科学基金 (编号:81874063)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院普外科,合肥 230022

作者简介:李雅娴,女,硕士研究生;

李永翔,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail:liyongxiang@ahmu.edu.cn

1.6 统计学处理 利用 R 软件 4.0.3 进行分析, 热图以 logFC 的变化值表示, 生存分析图用 Kaplan-Meier plots 表示, 风险比用 Cox 比例风险回归评估, 差异表达分析用 Kruskal 检验表示, Spearman 相关分析用 OCLR 表示, 在箱式图、生存曲线图和 Cox 风险比例回归图中, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肿瘤与正常组织中 BAGs 家族基因的差异表达分析和共表达分析 图 1 的箱式图显示了 BAGs 家族基因表达, 图 2、3 采用秩和检验对肿瘤和正常组织之间的 6 个 BAG 基因进行差异表达分析, 结果表明, 这 6 个基因在所有类型的肿瘤中表达有高有低, 但是 BAG6 在绝大多数类型肿瘤中高表达。由图 2、3 可知, 与正常组织比较, BAG6 只有在 KICH 中低表达, 在其他肿瘤中均高表达; 同时, 除了 BAG3 在 CHOL 中低表达, 其他 BAG 家族基因在 CHOL 中均呈现高表达。另外, 值得注意的是, 在肿瘤与正常组织表达差异比较分析中发现, 肾部肿瘤 KIRC 和 KIRP 在 BAG1、BAG2、BAG3、BAG4 中均呈现低表达, 但是在 BAG6 中却表现出高表达。而且, 肺部肿瘤 LUAD 和 LUSC 在 BAG2、BAG3、BAG4、BAG6 中均高表达, 但在 BAG1 中却是低表达。

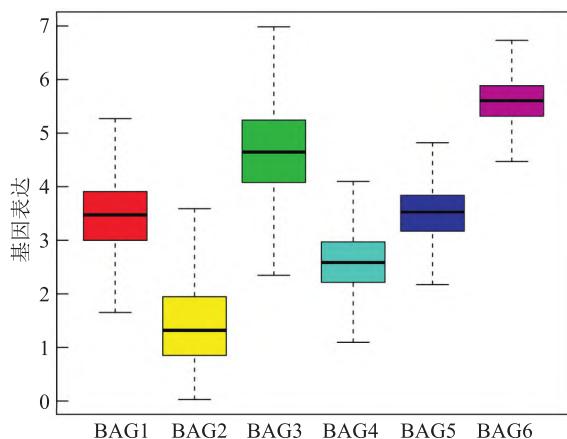


图 1 BAGs 家族基因表达箱式图

图 4 的共表达分析表明, BAG 基因家族两两之间都存在正相关性, BAG5 和 BAG6 之间的相关系数为 0.73, 这说明两者有较强相关性。同时, BAG1 和 BAG6、BAG2 和 BAG5、BAG3 和 BAG6、BAG3 和 BAG5、BAG4 和 BAG5、BAG5 和 BAG6 也都表现出较强的相关性。

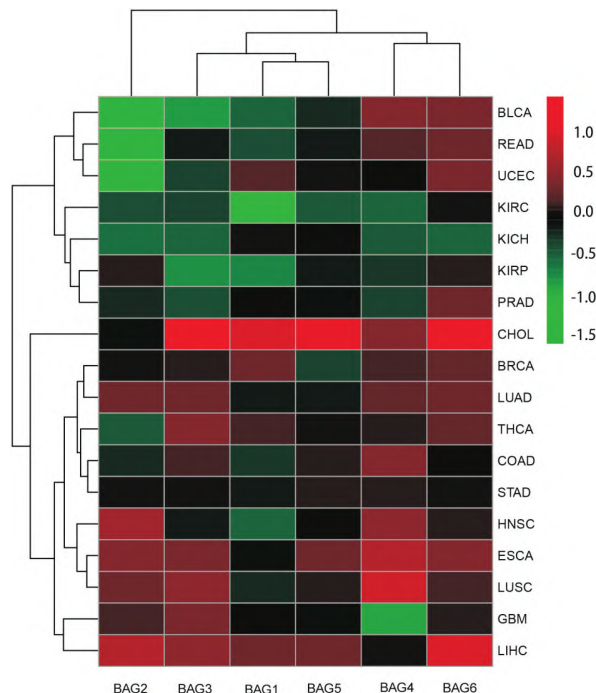


图 2 BAG 基因家族在肿瘤中表达热图
渐变颜色代表 logFC 的变化值

2.2 临床相关性分析 本研究对 TCGA 中的 33 种肿瘤进行了 BAGs 家族基因的生存分析 (Kaplan-Meier analysis), 由图 5 可知, BAG1 的低表达与 KIRC 患者的不良预后显著相关 ($P < 0.001$), 相应地, BAG1 在 KIRC 中肿瘤较正常组织低表达。相反, BAG2 表达升高与 LIHC 患者的较差临床结果相关 ($P < 0.001$), 这也与肿瘤与正常组织差异表达结果相一致。由于通常 Cox 比例风险回归可用于检测基因在肿瘤中的预后作用, 并将危险比 > 1 的基因视为一个危险预后因素, 所以 BAG1 对于 PCPG 是一个危险预后因素, BAG2 对于 KICH、THCA 和 UVM 是危险预后因素。见图 6。

2.3 免疫亚型分析 通过对肿瘤的 6 种免疫亚型中 BAGs 家族基因表达进行差异表达分析可知, BAG1、BAG2、BAG3、BAG4、BAG5 和 BAG6 的表达模式在泛癌中的 6 种免疫亚型中存在差异 (均 $P < 0.001$)。结果显示, BAG6 在 C1 ~ C6 的整体表达水平上排名第一, BAG2 在 C1 ~ C6 的整体表达水平最低。见图 7。

2.4 干细胞指标与肿瘤微环境 对于 DNAss、LGG 和 BAG 家族基因之间普遍存在负相关, 如, BAG1 ($r = -0.246$, $P < 0.001$)、BAG4 ($r = -0.200$, $P < 0.001$)、BAG6 ($r = -0.197$, $P < 0.001$) 均与 LGG 呈

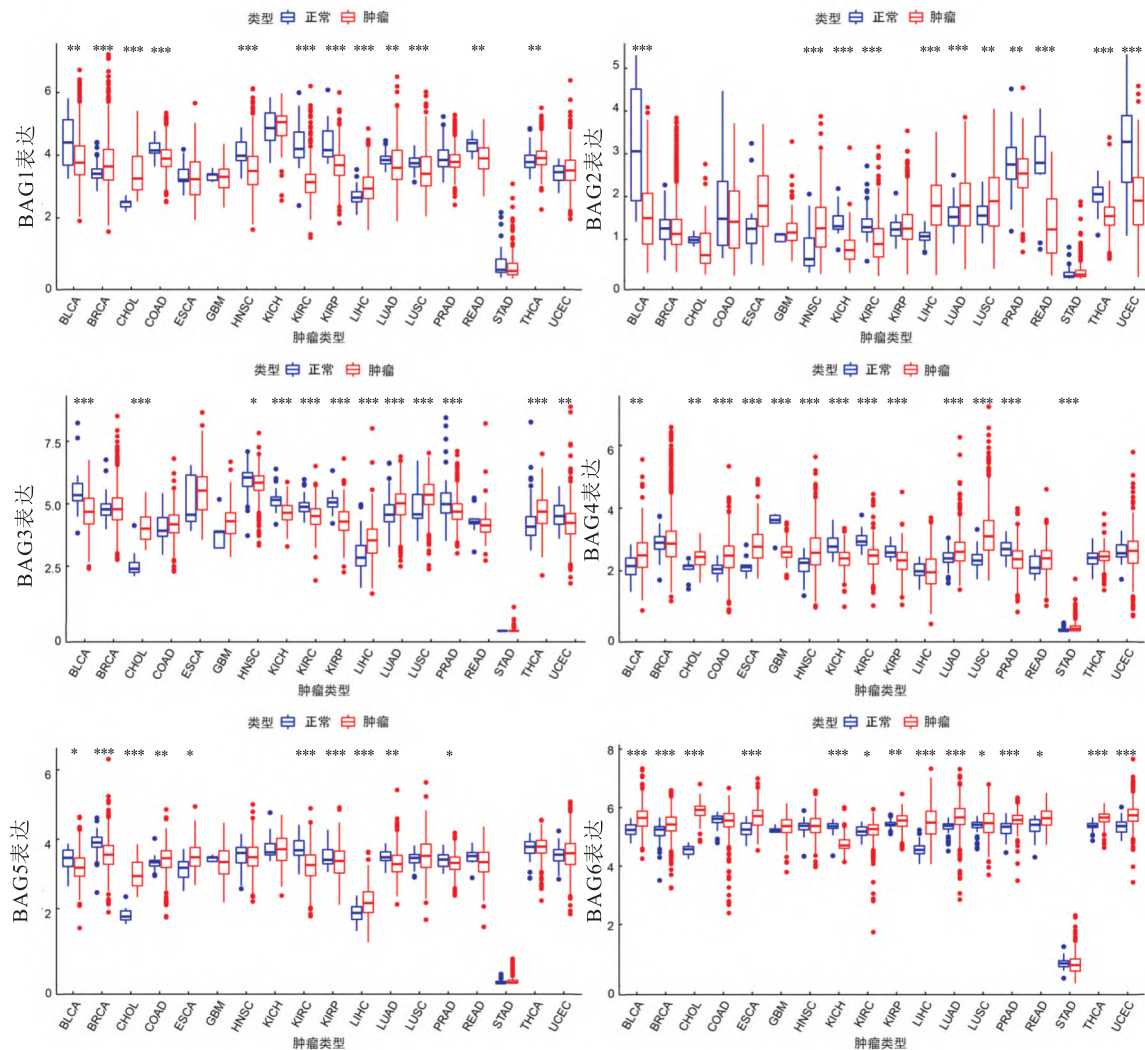


图3 BCL2 家族基因表达箱式图

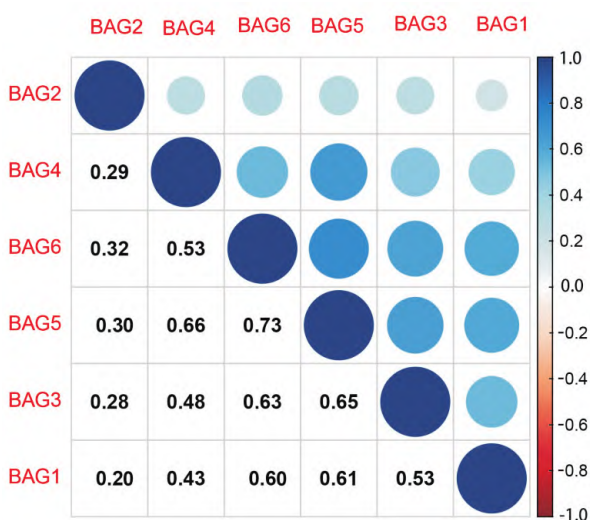
与正常组织比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 

图4 BAG 基因家族共表达相关系数图

负相关。另外, THYM 和不同的基因相关情况有所不同, BAG1 ($r = -0.320, P < 0.001$) 和 BAG6 ($r = -0.529, P < 0.001$) 与 THYM 呈负相关, BAG3 ($r = 0.503, P < 0.001$) 和 BAG4 ($r = 0.347, P < 0.001$) 与 THYM 呈正相关。见图 8A。

对于 RNA_{ss}, TGCT 和 BAGs 之间普遍存在相关性, TGCT RNA_{ss} 和 BAG1 ($r = -0.448, P < 0.001$) 呈负相关, 和 BAG2 ($r = 0.296, P < 0.001$)、BAG4 ($r = 0.464, P < 0.001$)、BAG5 ($r = 0.282, P < 0.001$) 以及 BAG6 ($r = 0.335, P < 0.001$) 均呈正相关。另外, LUSC RNA_{ss} 和 BAG 之间也存在普遍正相关性, LUSC RNA_{ss} 和 BAG1 ($r = 0.154, P < 0.001$)、BAG2 ($r = 0.286, P < 0.001$)、BAG4 ($r = 0.270, P < 0.001$) 和 BAG5 ($r = 0.196, P < 0.001$) 均呈现正相关。见图 8B。

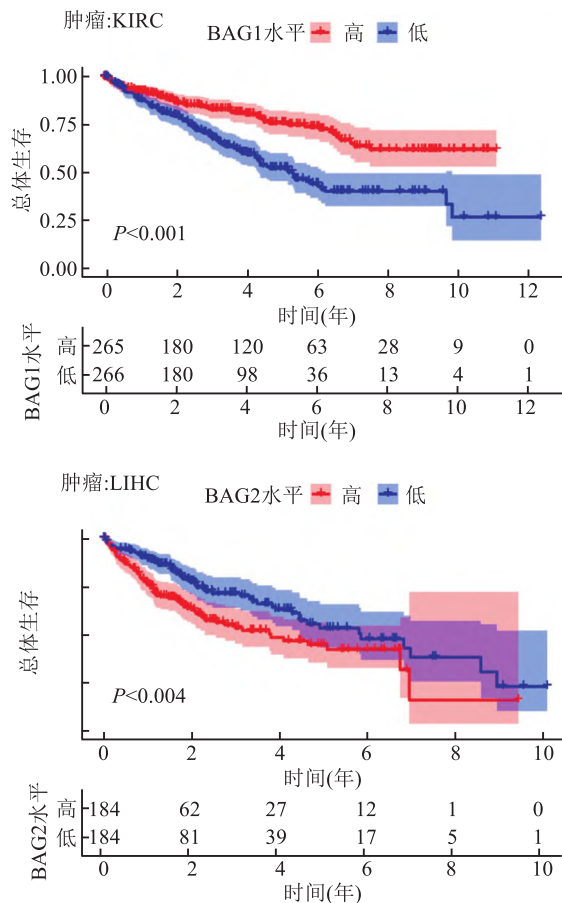


图5 肿瘤中 BAG 高表达和 BAG 低表达的生存曲线图

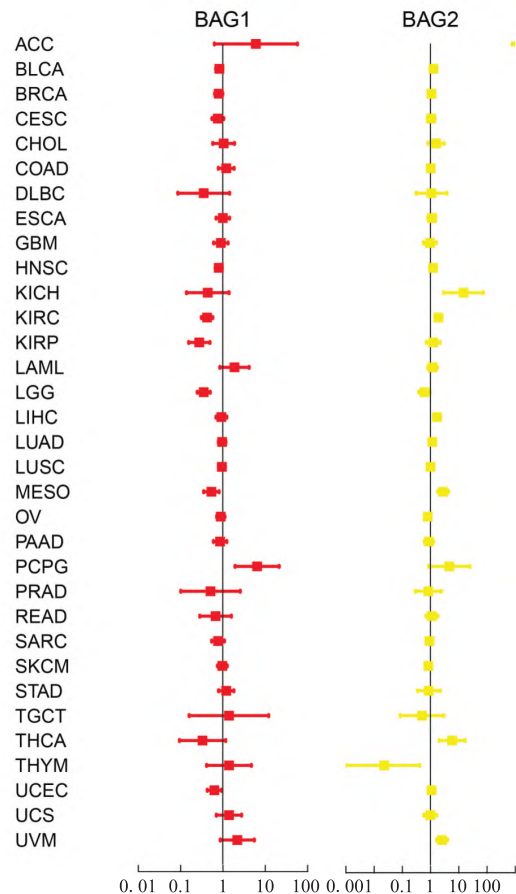


图6 Cox 风险比例回归图

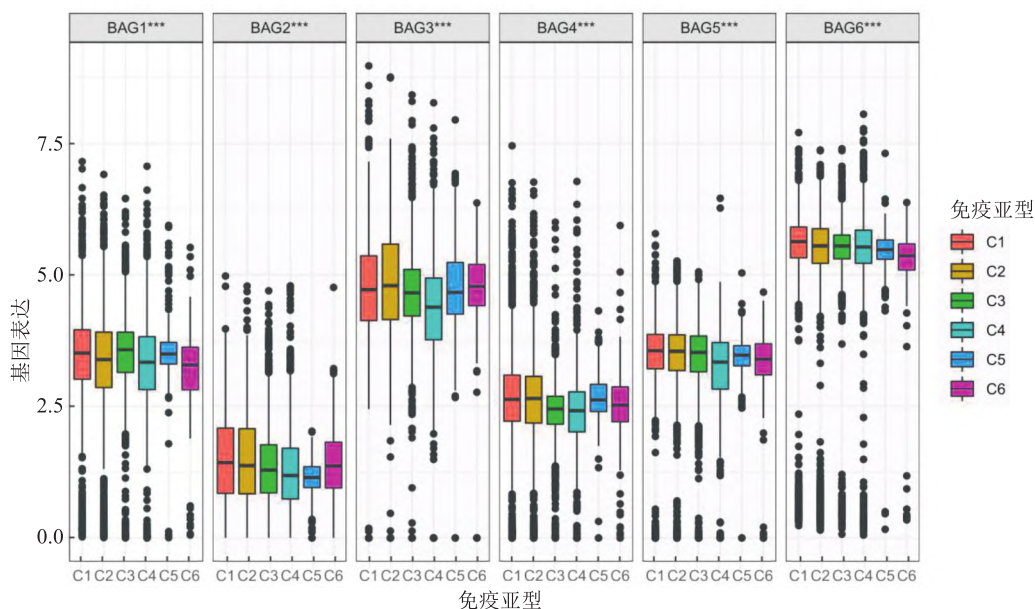


图7 C1 ~ C6 免疫亚型中 BAGs 的转录表达图

本研究发现 BAG2 的表达与多种肿瘤类型呈正相关, 包括 BLCA、BRCA、CHOL、COAD、ESCA、GBM、HNSC、KICH、KIRC 和 PAAD 等, 这表明 BAG2 的高表达与多种肿瘤的低纯度有关。同时, BAG2

和 BAG6 与肿瘤纯度的关系存在显著差异, BAG2 的高表达与绝大多数肿瘤的高肿瘤纯度相关, 而 BAG6 的模式相反。见图 8C。

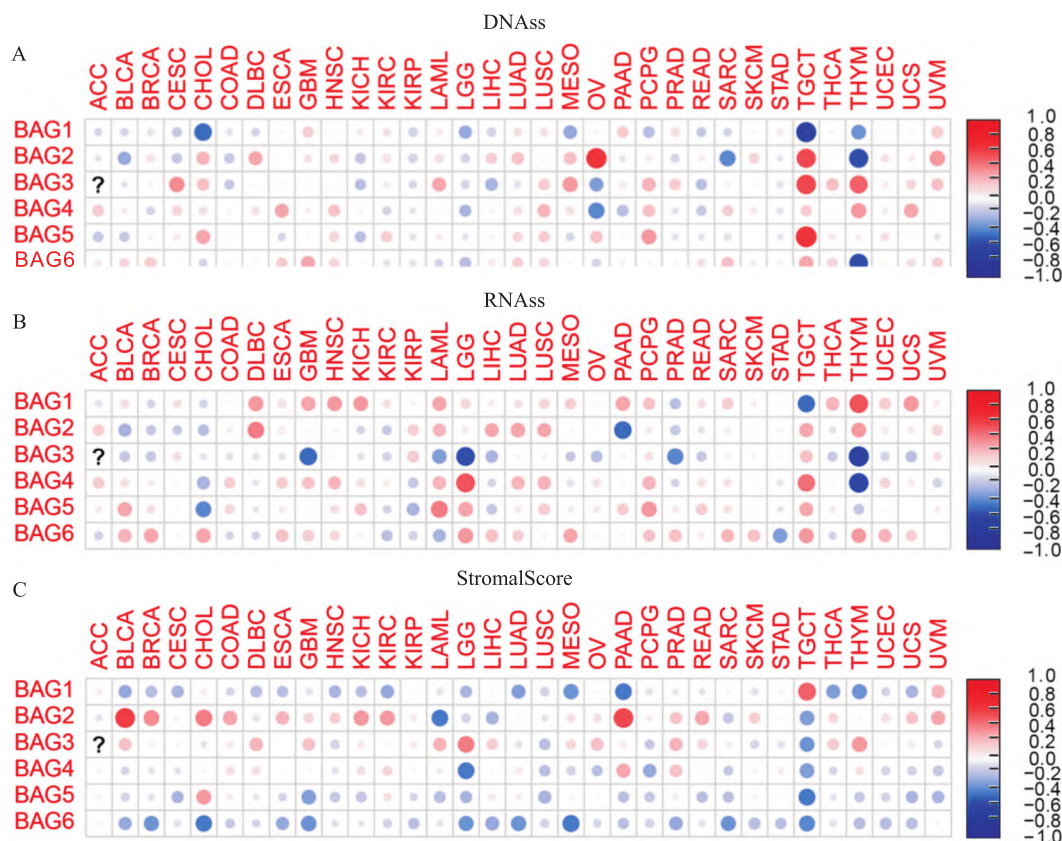


图8 BAG家族与干细胞指数和微环境评分的相关分析结果图

A、B:肿瘤中 BAGs 基因的表达水平与干细胞指数(DNAss 和 RNAss)的相关性;C:基质评分与 BAGs 基因表达之间的相关性;红色代表正相关性,蓝色代表负相关性

3 讨论

本研究探讨了 BAGs 家族的表达转录与泛癌的一系列相关性,包括肿瘤微环境、临床意义、免疫亚型和干细胞微环境。在对包括 TCGA 的 33 个肿瘤的数据进行分析后发现,各个 BAG 基因在不同肿瘤中的表达存在差异,在后续生存分析中显示,在某些肿瘤中,高表达的 BAG 基因和低表达的 BAG 基因患者生存时间存在有统计学意义的差异,这说明了 BAG 基因很有可能可以作为一个肿瘤临床预后指标。此外,根据研究者先前确定的 C1 ~ C6 免疫亚型^[9],本研究通过代表性免疫特征对肿瘤样本进行分类,发现它们都具有差异表达,这些免疫特征与细胞外基质、肿瘤脉管系统和肿瘤细胞一起构成了肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)的概念,其异质性高度影响治疗反应和临床预后^[10]。因此,本研究通过基质细胞得分、免疫细胞得分和综合得分,进一步获得了 33 种 TCGA 肿瘤样本中基质细胞和免疫细胞的分数,结果说明这些 TME 特征与 BAG1

~6 的表达水平相关。据报道^[11],细胞干性可以用来描述肿瘤细胞的干细胞样特征:自我更新和去分化,而且在许多肿瘤进展中发现了干细胞样特性的获得^[12],因此,在本研究中利用了 OCLR 方法计算肿瘤样本的 RNAss 评分和 DNAss 评分,然后将其与 BAGs 的转录特征相关联,表明 BAGs 基因可能在高干细胞维持中起作用。

已有研究^[13]表明,BAGs 家族可以与 Bcl-2 蛋白相互作用并增加其抗凋亡能力,故其在肿瘤生成、发展以及预后过程中均可能发挥作用。由本研究的结果可知,BAG 基因对一些肿瘤的预后和生存有指导意义,说明其可能可以作为这些癌症的临床生物标记物,给癌症的诊断和治疗提供可视化帮助。另外,本研究中 BAGs 家族与肿瘤微环境和基质细胞之间的关系提示后续相关研究可以从体外研究入手,从而将对 BAG 蛋白有效的化疗药物或者放疗方法通过纳米载体等方式直接作用于肿瘤组织,达到事半功倍的治疗效果。此外,研究^[12]表明,BAGs 家族蛋白可调节细胞的增生、转录和迁移,结合本研究中该

家族中不同蛋白在不同免疫亚型中的表达不同这一结果,启发未来相关研究者可以通过检测不同的免疫亚型分子来对该家族基因进行合理检验,从而使肿瘤在早期得以诊断。

综上所述,通过对 BAG1~6 的多维分析揭示了 BAGs 家族在泛癌水平上的各种表达模式,表明了 BAG 基因可能可作为多种癌症的潜在诊断和预后评估标志物,并可能会为患者术后个体化治疗提供理论支持。

参考文献

- [1] Turk M, Tatli O, Alkan H F, et al. Co-chaperone bag-1 plays a role in the autophagy-dependent cell survival through beclin 1 interaction [J]. *Molecules*, 2021, doi: 10.3390/molecules26040854.
- [2] Baeken M W, Behl C. On the origin of BAG(3) and its consequences for an expansion of BAG3's role in protein homeostasis [J]. *J Cell Biochem*, 2021, doi:10.1002/jcb.29925.
- [3] Zhou Y, Yang K, Cheng M, et al. Double-faced role of Bcl-2-associated athanogene 7 in plant-Phytophthora interaction [J]. *J Exp Bot*, 2021, 72(15):5751–65.
- [4] Yehualashet A S, Belachew T F, Kifle Z D, et al. Targeting cardiac metabolic pathways: A role in ischemic management [J]. *Vasc Health Risk Manag*, 2020, 16:353–65.
- [5] Szklarczyk D, Gable A L, Lyon D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(1):D607–13.
- [6] 白晓静,蒋玉梅,张静,等. 干扰长链非编码 RNA CCAT2 对膀胱癌细胞 J82 线粒体功能和肿瘤干细胞样特性的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(2):221–6.
- [7] Malta T M, Sokolov A, Gentles A J, et al. Machine learning identifies stemness features associated with oncogenic dedifferentiation [J]. *Cell*, 2018, 173(2):338–54.
- [8] Huang C, Hu C G, Ning Z K, et al. Identification of key genes controlling cancer stem cell characteristics in gastric cancer [J]. *World J Gastrointest Surg*, 2020, 12(11):442–59.
- [9] Thorsson V, Gibbs D L, Brown S D, et al. The Immune landscape of cancer [J]. *Immunity*, 2018, 48(4):812–30.
- [10] Nepal C, Zhu B, O'Rourke C J, et al. Integrative molecular characterisation of gallbladder cancer reveals micro-environment-associated subtypes [J]. *J Hepatol*, 2021, 74(5):1132–44.
- [11] Nazari N, Jafari F, Ghalamfarsa G, et al. The emerging role of miRNA in regulating the mTOR signaling pathway in immune and inflammatory responses [J]. *Immunol Cell Biol*, 2021, doi:10.1111/imcb.12477.
- [12] Miranda A, Hamilton P T, Zhang A W, et al. Cancer stemness, intratumoral heterogeneity, and immune response across cancers [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(18):9020–9.
- [13] Tang H, Xu X, Chen Y, et al. Cancer immunotherapy: Reprogramming the tumor microenvironment through second-near-infrared-window photothermal genome editing of PD-L1 mediated by supramolecular gold nanorods for enhanced cancer immunotherapy (Adv. Mater. 12/2021) [J]. *Advanced Materials*, 2021, doi:10.1002/adma.202006003.

The role of Bcl-2-associated athanogenes family in pan-cancer

Li Yaxian, Li Yongxiang

(Dept of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the functional role of Bcl-2-associated Athanogenes (BAGs) family in multiple tumors based on TCGA database. **Methods** 11 057 tumor samples were downloaded from TCGA, and multidimensional analysis of BAGs family (BAG1-BAG6) was performed. **Results** There were differences in the expression of Bags family in tumor and paracancerous tissues, and the expression of different BAG genes had a statistically significant effect on the survival prognosis of different cancers. **Conclusion** Bcl-2-associated Athanogenes may be potential diagnostic and prognostic markers for a variety of cancers, and may provide theoretical support for individualized treatment.

Key words BAGs genes; pan-cancer; functions