doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2026.03.001

❖基础医学研究❖

TTYH3 基因在结直肠癌发生发展中的作用及与预后的关系

徐翔宇[1],徐志华[2],刘宏[1]
(1.苏州市相城人民医院胃肠外科,江苏 苏州 215131;2.苏州大学附属第一医院普外科,江苏 苏州 215006)

【摘要】目的:探讨 TTYH3 基因在结直肠癌(CRC)发生发展中的作用及与预后的关系。**方法**:从 TCGA 数据库获取 CRC 患者 RNA 测序表达谱和临床病理信息;R 语言筛选差异表达的基因;KM 生存分析 TTYH3 在 CRC 预后中的作用;GO 和 KEGG 富集分析 TTYH3 在 CRC 中可能的作用;MTT 和克隆形成实验分析 TTYH3 对 CRC 细胞增殖能力的影响;Cox 单因素及多因素分析影响 CRC 生存相关的独立预后因素;构建列线图预测 CRC 1、3、5 年的生存率。**结果**:TTYH3 在 CRC 组织和细胞中高表达($P<0.05$);高表达 TTYH3 的 CRC 患者总体生存率更低($P<0.05$);过表达 TTYH3 能提高 CRC 细胞的增殖能力,而敲低 TTYH3 表达能抑制 CRC 细胞的增殖能力。高表达 TTYH3 与低表达 TTYH3 CRC 患者 TNM 分期、肿瘤大小及淋巴结转移情况比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。单因素 Cox 回归分析显示,年龄($P=0.000$)、T 分期($P<0.001$)、N 分期($P<0.001$)、M 分期($P<0.001$)和 TTYH3 表达($P<0.001$)与 CRC 预后相关;多因素 Cox 分析结果显示,T 分期($P=0.001$)、N 分期($P=0.001$)和 TTYH3 表达($P<0.001$)是影响 CRC 生存相关的独立预后因素。根据预后临床因素(T 分期和 N 分期)和 TTYH3 表达构建列线图,生存校准曲线表明,列线图预测 CRC 患者 1 年、3 年和 5 年的总体生存率与实际观测结果吻合良好。**结论**:TTYH3 在 CRC 的发生和进展中挥着重要作用,且与预后相关,有可能成为 CRC 新的预后生物标志物和治疗靶点。

【关键词】TTYH3;结直肠癌;预后;生物标志物;治疗靶点;生物信息学分析
【中图分类号】R735.34 **【文献标志码】**A

The role of TTYH3 gene in the occurrence and development of colorectal cancer and its relationship with prognosis

XU Xiang-yu[1], XU Zhi-hua[2], LIU Hong[1]
(1. *Department of Gastrointestinal Surgery, Suzhou Xiangcheng People's Hospital, Suzhou* 215131; 2. *Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou* 215006, *Jiangsu, China*)

【Abstract】Objective: To explore the role of TTYH3 gene in the occurrence and development of colorectal cancer (CRC) and its relationship with prognosis. **Methods**: Obtain RNA sequencing expression profiles and clinical pathological information of CRC patients from the TCGA database, R language screening for differentially expressed genes, exploring the prognostic role of TTYH3 in CRC through KM survival analysis. GO and KEGG enrichment analysis to explore the potential role of TTYH3 in CRC, MTT and colony formation experiments were conducted to investigate the effect of TTYH3 on the proliferation ability of CRC cells. Cox univariate and multivariate analysis to identify independent prognostic factors related to CRC survival, construct a nomogram to predict the survival rate of CRC 1, 3, 5 years. **Results**: TTYH3 was overexpressed in CRC tissues and cells ($P<0.05$), the overall survival rate of CRC patients with high expression of TTYH3 was lower ($P<0.05$), overexpression of TTYH3 could improve the proliferation ability of CRC cells, while knocking down TTYH3 expression could inhibit the proliferation ability of CRC cells. There was a statistically significant difference in TNM staging, tumor size, and lymph node metastasis between CRC patients with high and low expression of TTYH3 ($P<0.05$). Univariate Cox regression analysis determined that age ($P=0.000$), T stage ($P<0.001$), N stage ($P<0.001$), M stage ($P<0.001$), and TTYH3 expression ($P<0.001$) were correlated with prognosis. Multivariate Cox analysis showed that T stage ($P=0.001$), N stage ($P=0.001$), and TTYH3 expression ($P<0.001$) were independent prognostic factors related to prognosis. Construct a nomogram based on prognostic clinical factors (T and N stages), the survival calibration curve showed that the predicted overall survival rate of

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(82573771)
作者简介:徐翔宇(1979—),男,副主任医师。E-mail:drjianguozs@126.com
通讯作者:刘宏。E-mail:drranzhao@sina.com

CRC patients at 1, 3, and 5 years by the column chart was in good agreement with the actual observation results. **Conclusion**: TTYH3 was associated with prognosis and played an important role in the occurrence and progression of human CRC. TTYH3 may become a new prognostic biomarker and therapeutic target for CRC.

【Key words】 TTYH3; Colorectal cancer; Prognosis; Biomarkers; Therapeutic targets; Bioinformatics analysis

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是最常见的胃肠道恶性肿瘤之一[1],是中国第五大癌症相关死亡原因[2]。CRC已被公认为一种异质性疾病,在临床特征、分子遗传改变和预后方面存在各种差异[3]。有研究报道[4-7]指出,年龄、饮食、环境、不健康的生活方式、肥胖、炎症性肠病(IBD)、基因突变、肠道微生物群和结肠癌家族史等是肿瘤发生发展的高风险因素。在这些影响因素中,分子遗传变化被认为是导致结直肠癌进展的重要关键特征之一[8]。TTYH(tweety homolog)家族(TTYH1-3)包括果蝇的同源物,编码电导氯化物通道[9]。TTYH家族成员参与胚胎发育、脑病理和肿瘤进展[10-12]。其中,TTYH1主要在大脑中表达,并编码一种不依赖Ca^{2+}激活的Cl^-通道。TTYH1调节神经干细胞功能、胚胎发育并促进脑肿瘤形成[13-15],而TTYH2和TTYH3编码Ca^{2+}激活的Cl^-通道。TTYH3是一种大的电导Ca^{2+}激活的Cl^-通道,该通道具有复杂的门控动力学和电压依赖性失活,其激活依赖于细胞内Ca^{2+}浓度[16]。TTYH3在胃癌组织中的表达高于正常组织,且TTYH3的高表达导致胃癌患者预后不良[17]。Xue等[18]研究发现,上调TTYH3可通过Wnt/β-catenin信号通路促进胆管癌细胞上皮向间充质转化,抑制胆管癌细胞凋亡。此外,过表达TTYH3可以促进肝细胞癌的细胞增殖、迁移和侵袭,并抑制细胞凋亡[19]。TTYH3在某些癌症中过度表达,并与癌症的不良预后有关,但在CRC中的生物学功能和临床意义尚未被研究。本研究旨在探讨TTYH3基因在CRC发生发展中的作用及与预后的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

从TCGA(The Cancer Genome Atlas program, https://portal.gdc.cancer.gov/)检索并下载10例正常成人的RNA测序数据和620例CRC患者的RNA测序数据(RNA-seq)及临床病理信息。从2022年10月至2024年10月在苏州大学附属第一医院接受外科手术切除的60例患者中获取原发CRC组织和配对的正常邻近组织。根据组织病理学评估,所有患者均被诊断为CRC。肿瘤切除后立即将包括CRC样本和邻近正常组织在内的组织片段冷冻在液氮中,直至提取RNA。所有患者在手术前均未接受化疗、放疗或任何其他抗癌治疗。本研究经医院伦理委员会审批,患者及其家属知情同意。

1.2 方法

1.2.1 差异表达基因筛选 应用R语言软件的"limma"包对整个数据集进行归一化,获得CRC与正常组织之间的差异表达基因。随后,筛选出具有统计学意义的差异表达基因,将符合标准的差异表达基因以热图和火山图的形式展示。

1.2.2 功能富集分析 采用clusterProfiler R包进行GO(gene ontology)和KEGG(kyoto encyclopedia of genes and genomes)通路富集分析差异表达mRNA的功能。

1.2.3 列线图构建 为向临床医生提供预测患者OS概率的定量方法,通过1 000次的bootstrapping,在预后列线图中对每个协变量的贡献进行量化和可视化,并进行内部验证。通过校准分析评估所得模型的一致性情况,并通过散点图展示。

1.2.4 细胞系和细胞培养 人CRC细胞系(HT29, SW480, Lovo和HCT116)和人正常结肠上皮细胞(NCM460)购自中国科学院细胞库。将细胞培养在含有10%胎牛血清、100单位/mL青霉素和100 μg/mL链霉素的RPMI-1640培养基中,在37 ℃、5%CO_2的增湿室中培养。

1.2.5 RNA提取和实时定量逆转录聚合酶链式反应(RT-qPCR) TRIzol试剂分离和提取总RNA后,用PrimeScript™ Ⅱ 1st strand cDNA合成试剂盒将其逆转录为cDNA。SYBR Premix试剂盒用于荧光定量。反应条件:95 ℃预变性3 min→95 ℃变性15 s→60 ℃变性30 s,共进行40个循环。GAPDH(Glyceraldehyde-3-phosphate)用于标准化数据。用$2^{-\Delta\Delta Cq}$法计算实验组和对照组mRNA的相对表达水平。引物如下:TTYH3 forward, 5′-GACGCCTACGTGACCAAAAT-3′和reverse, 5′-GACGGTCCTCAGAAGCTCAG-3′; GAPDH forward, 5′-AATCCCATCACCATCTTCCAG-3′和reverse, 5′- CACGATACCAAAGTTGTCATG -3′。

1.2.6 稳转细胞系构建 使用TTYH3的敲除质粒和空对照载体(pLenti-CMV-GFP-Puro)及ps-PAX2包装和pCMV-VSVG包膜质粒构建稳转细胞系。构建与靶向TTYH3 mRNA相对应的21个核苷酸序列,sh-TTYH3: 5′-GCATCGCGAGG-GATTCTACG-3′。以5′-GTCTCCGAACGTCAC

GTT-3′为阴性对照。转导过程中，将 3×10^5 CRC 癌细胞与 0.5 mL 含有 polybrene(8 μg/mL)和 1.5 mL RPMI-1640 的慢病毒上清液一起孵育。48 h 后，使用嘌呤霉素的筛选细胞。最后，通过 RT-qPCR 验证敲除的效率。

1.2.7　MTT 实验　采用 MTT(3-(4,5-dymethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)实验检测 CRC 细胞的增殖。将细胞以 3 000 个细胞/孔的浓度接种在 96 孔板中，并在转染后培养 24、48 和 72 h。用每孔 20 μL MTT(5 mg/mL)溶液将细胞再培养 4 h，然后用 100 μL 二甲基亚砜(DMSO)替换培养基并重悬 10 min。Versamax 微孔板读取器上在 490 nm 的波长下读取最佳密度值(OD)。设置没有细胞的空白孔为空白对照组。

1.2.8　克隆形成实验　6 孔板的每个孔中接种 1×10^3 个细胞，在菌落生长过程中，1/次 3 d 更换培养基。10 d 后用结晶紫染色溶液对细胞进行染色，并计数每孔中的菌落数。

1.2.9　体内实验　为了构建异种移植物肿瘤模型，将 6 周龄雄性 BALB/c 裸鼠(体质量 250～350 g)随机分为 TTYH3 敲低组和对照组每组各 5 只。对于 TTYH3 敲低组，将 1×10^7/0.2 mL 稳定低表达 TTYH3 的 SW480 细胞皮下注射到小鼠体内。对照组将转染 si-NC 的 1×10^7/0.2 mL SW480 细胞皮下注射到小鼠体内。在肿瘤形成一周后，使用游标卡尺在接种后第 6、9、12、15、18、21 和 24 天测量每只小鼠的肿瘤体积。所有动物实验均按照苏州大学附属第一医院研究伦理委员会的要求实施。

1.2.10　免疫组化　肿瘤组织切片在 60 ℃的干燥烘箱中孵育 1 h，然后在二甲苯中脱烷基，用分级乙醇复水。然后将载玻片在 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液(pH6.0)中在微波炉中预处理 10 min，并在高功率(1 200 W)下进行抗原修复。随后在室温下使用 3%过氧化氢(H_2O_2)阻断内源性过氧化物酶的活性 30 min。用 5%BSA(牛血清白蛋白)密封后，将切片与稀释的 TTYH3 抗体(1∶1 000)、Ki-67 抗体(1∶400)以及 Cleaved Caspase-3 抗体(1∶250)在室温下孵育 2 h。冲洗后，将切片与次级过氧化物酶偶联抗体在室温下孵育 45 min。最后，使用 3,3-二氨基苯进行可视化，苏木精用于显微镜检查。将切片脱水、清除并置于光学显微镜下。

1.3　统计学分析

采用 SPSS 23.0 软件对数据进行处理与分析。计量资料符合正态分布且方差齐性，以($\bar{x}\pm s$)表示，多组间比较行单因素方差分析；相关性采用单因素和多因素 Cox 回归分析；生存分析采用 Kaplan-Meier 分析；预测准确性采用受试者工作特征(ROC)曲线分析，曲线下面积(*AUC*)越接近 1.0，表示准确性越高。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　差异表达基因筛选结果

通过 TCGA 数据库中 620 例 CRC 组织和 10 例正常结直肠组织的 mRNA 表达谱，共筛选出 2 786 个差异表达的基因。分层聚类分析热图显示，肿瘤和正常组织基因表达比较，差异有统计学意义($P<0.05$)。与正常组织相比，有 1 184 个基因表达上调，1 602 个基因表达下调。其中，与正常组织相比，TTYH3 在 CRC 组织中表达上调($P<0.05$)。见图 1。

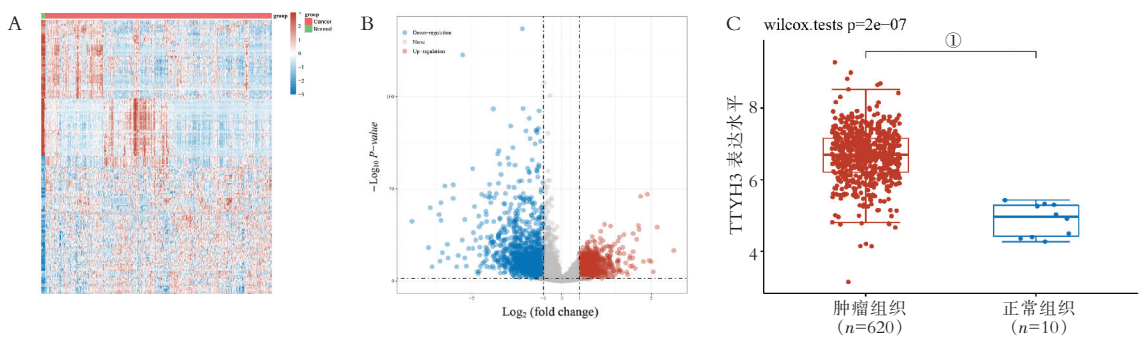


图 1　CRC 中差异表达基因

A. 热图展示差异表达基因；B. 火山图展示差异表达基因；C. TTYH3 在 CRC 中高表达。①$P<0.05$。

2.2　TTYH3 表达与 CRC 患者预后的关系

通过 TTYH3 的中位表达水平，将 CRC 癌患者分为高表达 TTYH3 组($n=309$)和低表达 TTYH3 组($n=310$)。对所有 CRC 患者的 TTYH3 表达水平进行排序，并通过散点图显示表达水平的分布和患者的生存状态。热图展示结果表明，CRC 患者 TTYH3 表达水平越高，其相对死亡率越高。Kaplan－Meier(KM)生存曲线分析显示，低表达 TTYH3 组的 CRC 患者总体生存率(OS)高于高表达 TTYH3 组($P<0.05$)。ROC 曲线分析显示，

TTYH3 表达预测 CRC 患者 1 年、3 年、5 年生存率的 *AUC* 分别为 0.586、0.631、0.585。见图 2。

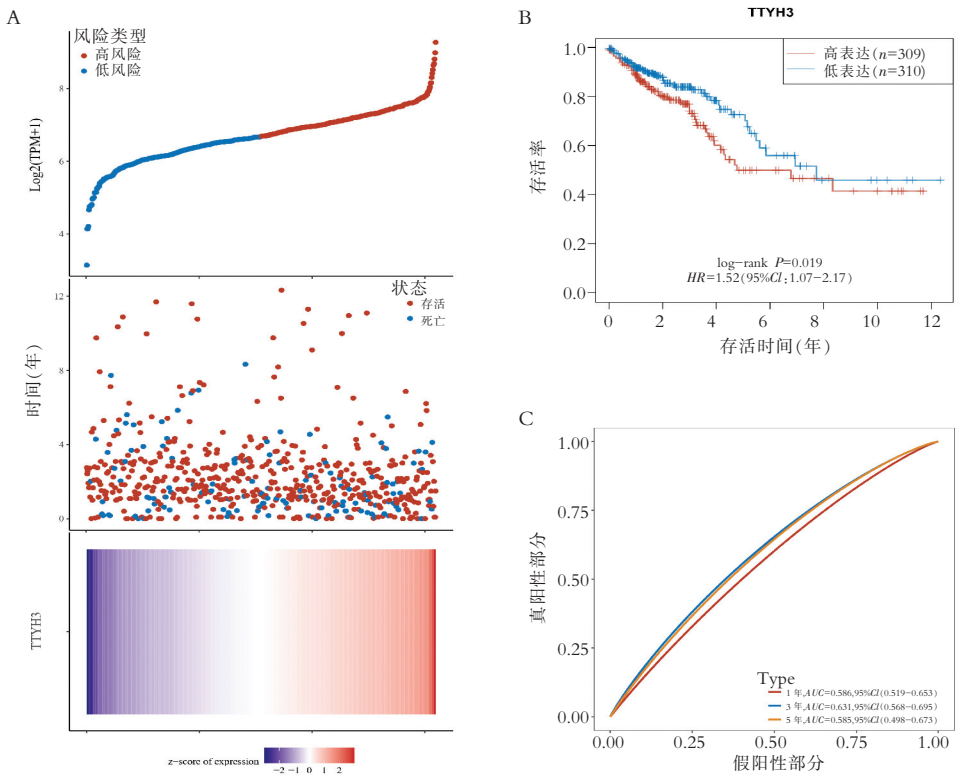


图 2 TTYH3 表达 CRC 患者预后的关系

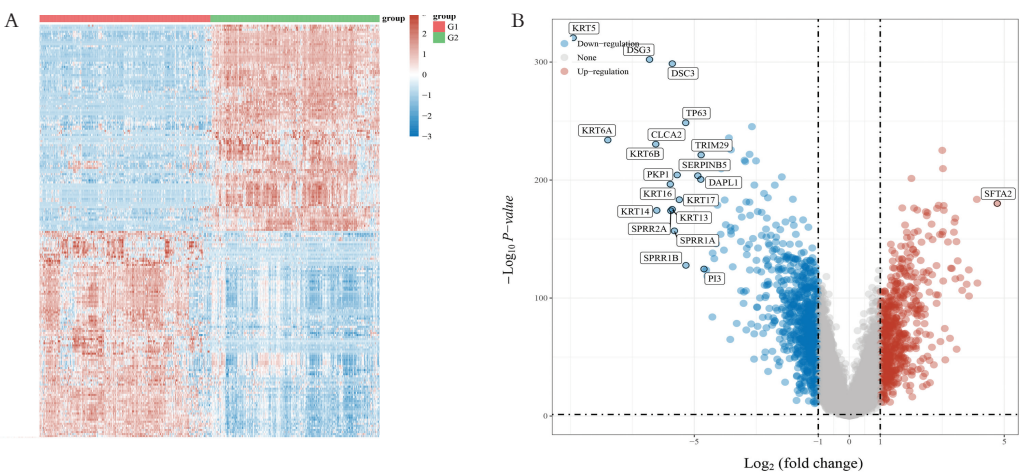
A. 不同 TTYH3 表达 CRC 患者的生存状态;B. 高表达 TTYH3 CRC 患者和低表达 TTYH3 CRC 患者的生存状态;C. 预测总体生存率的 ROC 曲线。

2.3 TTYH3 相关差异表达基因功能富集结果

分层聚类分析热图显示,高表达 TTYH3 组和低表达 TTYH3 组基因表达比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。火山图结果表明,5 658 个基因差异表达,其中 3 003 个基因表达上调,2 655 个基因表达下调。见图 3。

2.4 TTYH3 在 CRC 组织和细胞系中的表达

TTYH3 在 10 对人 CRC 组织和癌旁正常组织中表达水平检测结果显示,TTYH3 在 CRC 组织中表达明显高于配对的癌旁正常组织($P<0.05$)。免疫组化结果显示,TTYH3 在人 CRC 组织中表达升高($P<0.05$)。TTYH3 在人正常结肠上皮细胞(NCM460)和 CRC 细胞系(HT29,SW480,Lovo 和 HCT116)中表达水平的检测结果表明,与正常细胞系相比,TTYH3 在 CRC 细胞系中的表达升高($P<0.05$)。通过慢病毒转导,TTYH3 在 SW480 细胞中下调($P<0.05$);通过转染过表达质粒,TTYH3 在 Lovo 细胞中上调。见图 4。



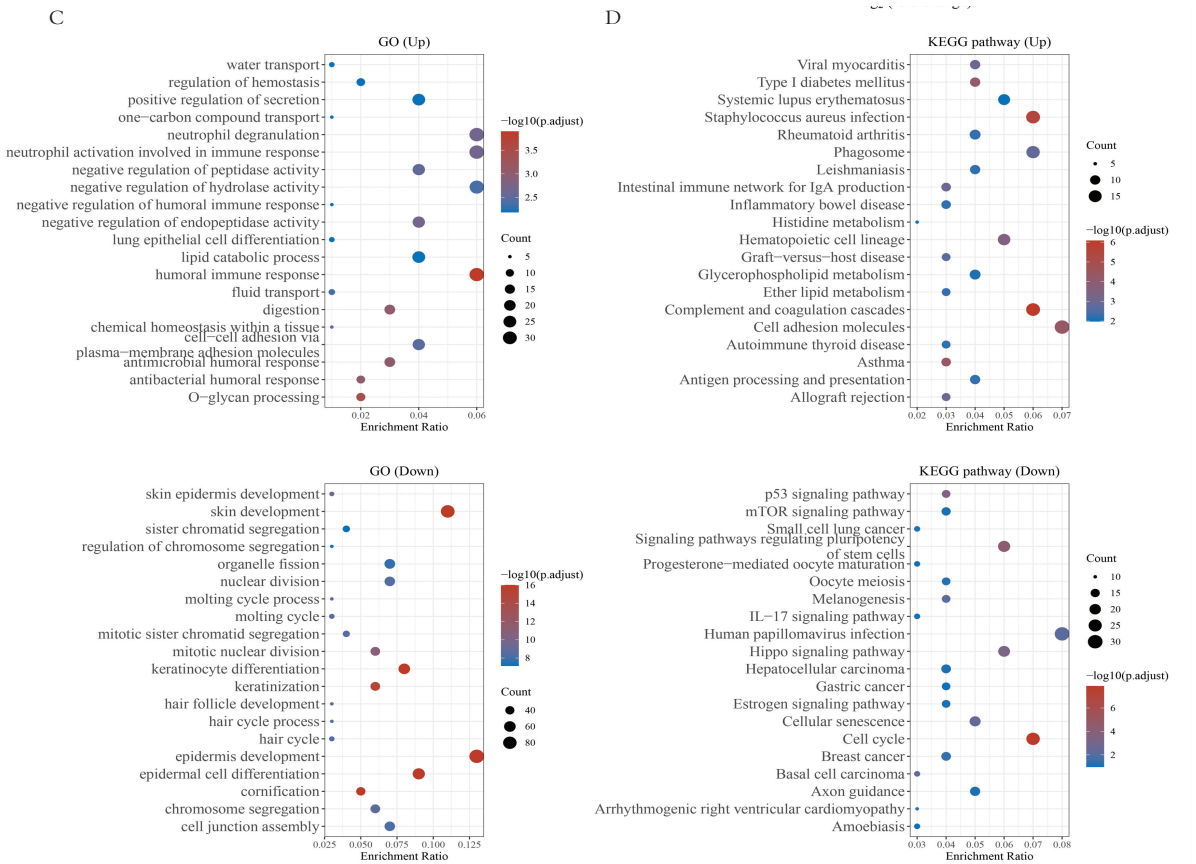


图 3　GO 和 KEGG 功能富集

A. 热图；B. 火山图；C. GO 功能富集；D. KEGG 通路富集。

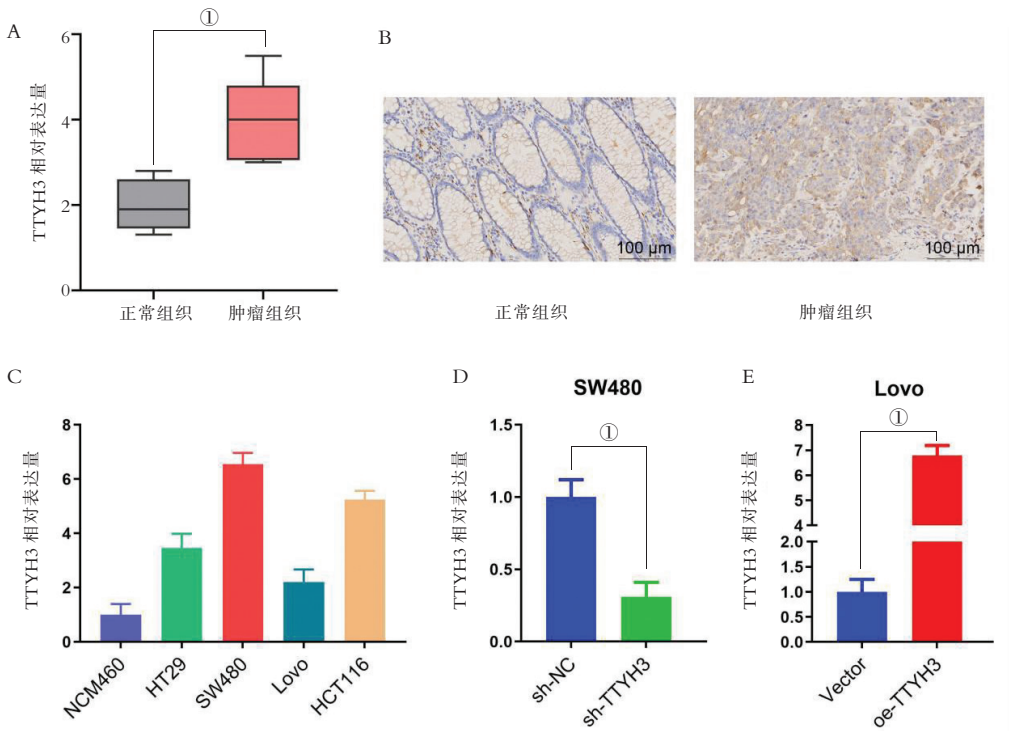


图 4　TTYH3 在 CRC 组织和细胞系中的表达

A. TTYH3 在结 CRC 组织中高表达；B. 免疫组化显示 TTYH3 在 CRC 组织中高表达；C. TTYH3 在 CRC 细胞系中高表达；D. SW480 细胞系中敲低 TTYH3 表达；E. Lovo 细胞系中过表达 TTYH3。①P<0.05。

2.5　高表达及低表达 TTYH3 CRC 患者临床病理特征比较

60 例样本经 RT-qPCR 检测显示，TTYH3 高表达 31 例，TTYH3 低表达 29 例。TTYH3 高表达与 TTYH3 低表达 CRC 患者 TNM 分期、肿瘤大小及淋巴结转移情况比较，差异有统计学意义（$P<0.05$）。见表 1。

2.6　TTYH3 对 CRC 细胞增殖能力的影响

MTT 实验结果显示，低表达水平的 TTYH3 降低 SW480 细胞的增殖能力（$P<0.05$），过表达 TTYH3 促进 Lovo 细胞的增殖（$P<0.05$）。克隆形成实验进一步表明，TTYH3 表达敲低抑制 SW480 细胞的增殖（$P<0.05$），而高表达 TTYH3 增强 Lovo 细胞的增殖能力（$P<0.05$）。见图 5。

表 1　TTYH3 表达与 CRC 患者临床病理特征的相关性

特征	TTYH3 表达(例)		χ^2 值	P 值
	高（$n=31$）	低（$n=29$）		
男/女	19/12	17/12	0.044	0.833
<60/≥60(岁)	13/18	12/17	0.002	0.965
TNM 分期Ⅰ~Ⅱ/Ⅲ~Ⅳ	5/26	16/13	10.040	0.002
<5/≥5 cm 肿瘤	17/14	26/3	8.945	0.003
有/无淋巴结转移	24/7	13/16	6.733	0.009
高/中/低分化	8/14/9	6/8/15	3.359	0.186

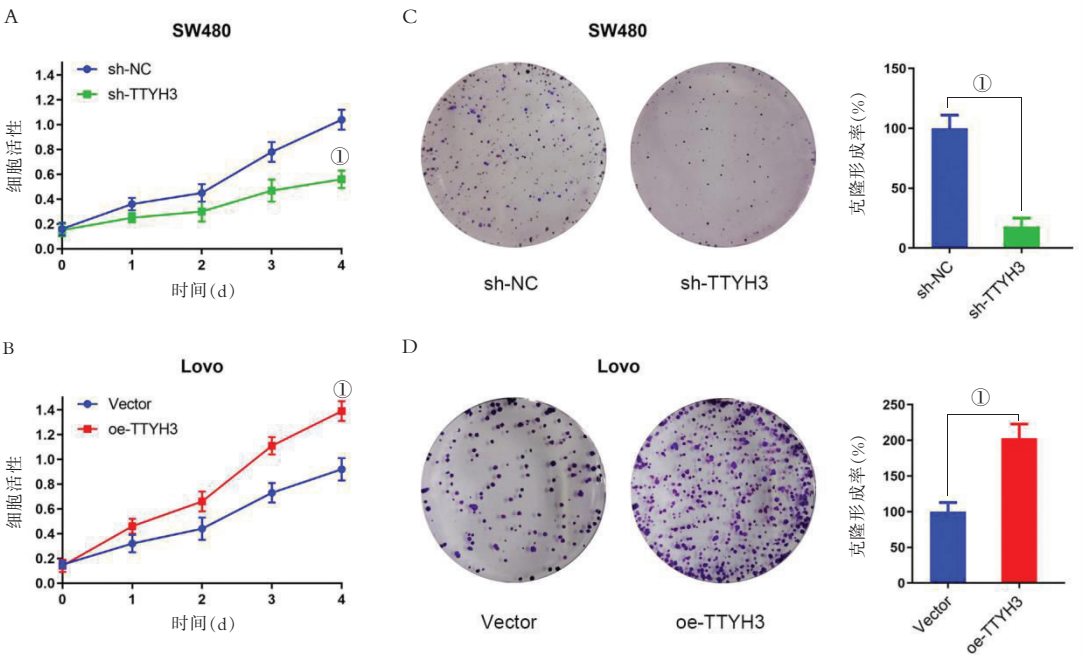


图 5　TTYH3 对 CRC 细胞增殖能力的影响

A. MTT 实验显示敲低 TTYH3 表达能够抑制 SW480 细胞增殖；B. MTT 实验显示高表达 TTYH3 能够促进 Lovo 细胞增殖；C. 克隆形成实验表明敲低 TTYH3 表达能够抑制 SW480 细胞增殖；D. 克隆形成实验表明高表达 TTYH3 能够促进 Lovo 细胞增殖。①$P<0.05$。

2.7　TTYH3 对 CRC 细胞体内致瘤性的影响

体内实验结果显示，与阴性对照组相比，注射 TTYH3 低表达 SW480 细胞的肿瘤体积变小，且肿瘤体积的增长幅度降低（$P<0.05$）。肿瘤的免疫组织化学分析显示，TTYH3 表达降低后，Ki-67 的表达同步降低，而 Cleaved Caspase-3 表达反向升高。见图 6。

2.8　TTYH3 在 CRC 患者中基因突变

TTYH3 在 CRC 患者中体细胞突变率仅为 1.52%，主要集中于 Tweety_N。Oncoplot 显示在 526 例患者中有 525 例发生突变。高表达 TTYH3 组与低表达 TTYH3 组 CRC 患者相比，基因按突变频率排序，主要为 APC(77%)，TP53(59%)，TTN(52%)和 KRAS(41%)。见图 7。

2.9　CRC 患者 1 年、3 年和 5 年预后预测列线图的构建

单因素 Cox 回归分析结果显示，年龄（$P=0.000$）、T 分期（$P<0.001$）、N 分期（$P<0.001$）、M 分期（$P<0.001$）和 TTYH3 表达（$P<0.001$）与预后相关。多 Cox 回归分析结果显示，T 分期（$P=0.001$）、N 分期（$P=0.001$）和 TTYH3 表达（$P<0.001$）是预测总生存率的独立预后因素。根据预后临床因素（T 分期和 N 分期）和 TTYH3 表达构建列线图，生存校准曲线表明，列线图预测 CRC 患者 1 年、3 年和 5 年的总体生存率与实际观测结果吻合良好。见图 8 及图 9。

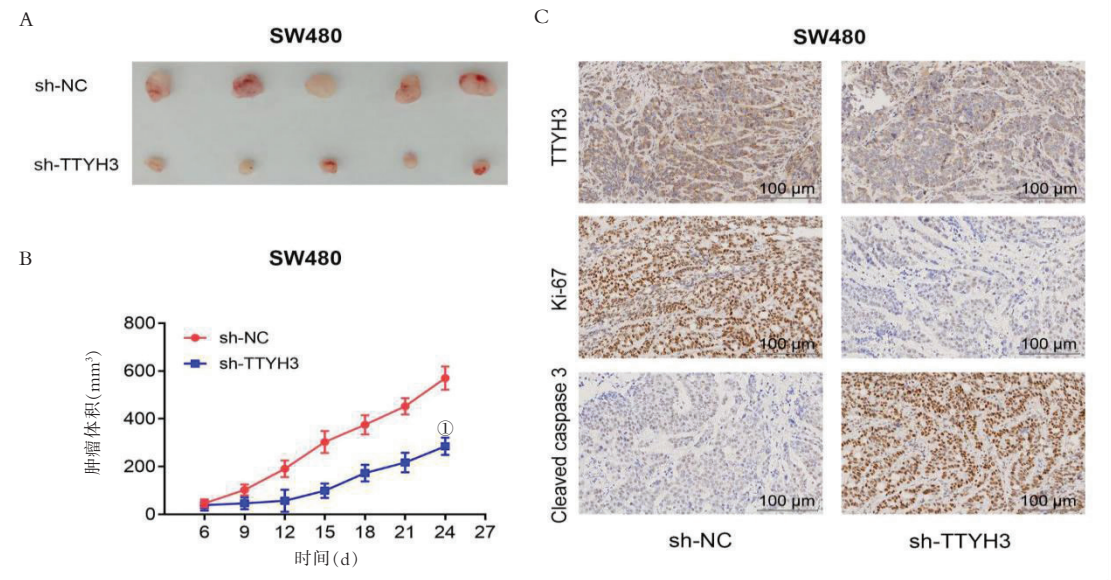


图 6　TTYH3 对 CRC 细胞体内致瘤性的影响

A.分别转染 sh-NC 和 sh-TTYH3 的 2 组裸鼠获得的肿瘤；B. sh-NC 组和 sh-TTYH3 组的肿瘤生长曲线；C. 体内形成肿瘤中 TTYH3、Ki-67 和 Cleaved Caspase 3 的免疫组织化学染色。①P<0.05，与 sh-NC 组相比。



图 7　TTYH3 在 CRC 患者中的基因突变

A. TTYH3 在 CRC 患者中体细胞突变率分布；B. 群组摘要图显示了变体分类(错义突变)，类型(SNP)和 SNV 类别的变体分布；C. Oncoplot 显示 CRC 队列的体细胞景观。

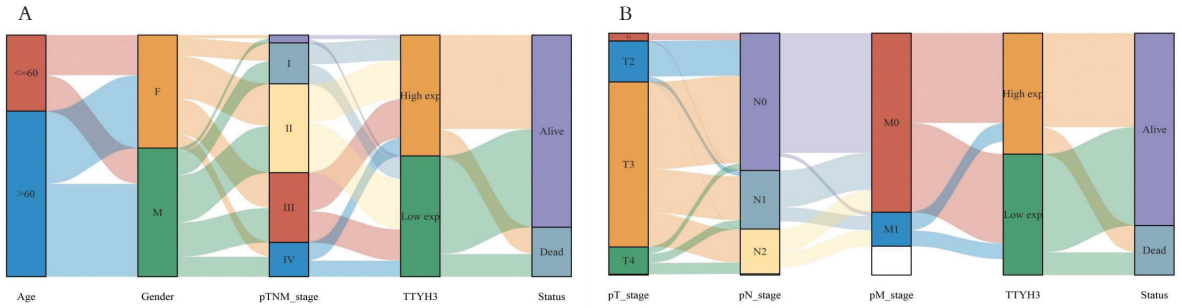


图 8 TTYH3 表达在临床分期中分布的桑基图

A. 桑基图显示 CRC 患者不同年龄组分组、性别、TNM 分期及 TTYH3 表达和 CRC 患者生存状态的关系;B. 不同 T 分期、N 分期、M 分期及 TTYH3 表达和 CRC 癌患者生存状态的关系。

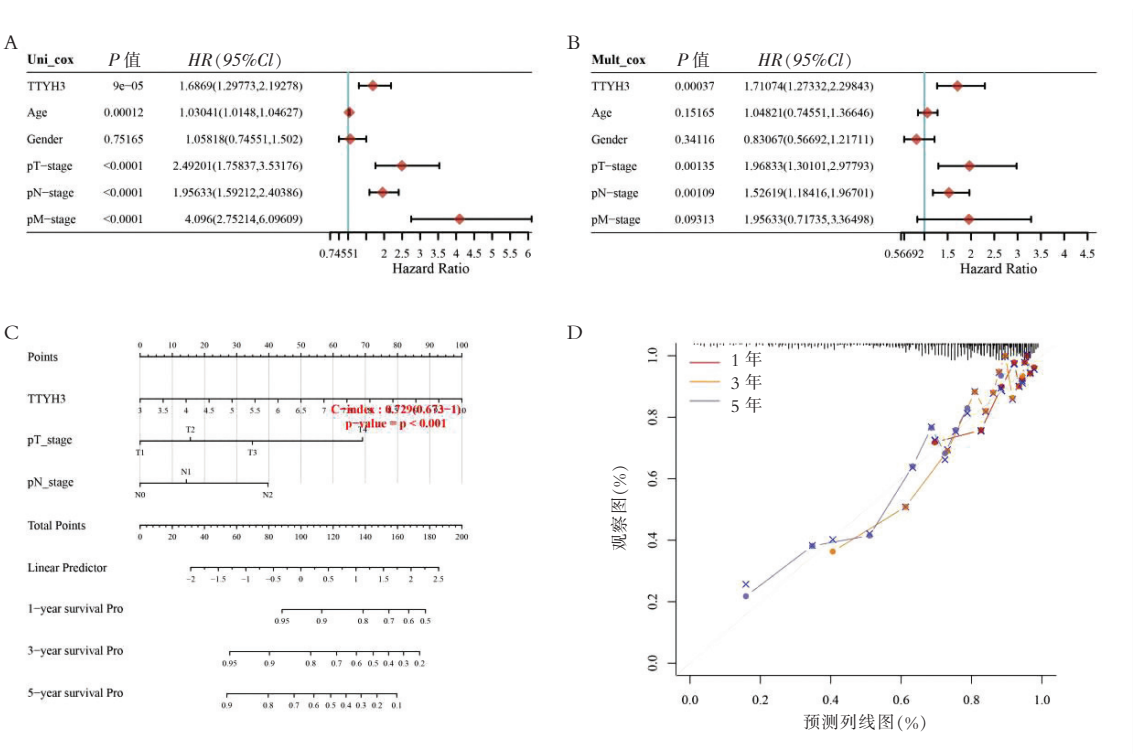


图 9 列线图预测 CRC 患者的总体生存率

A. 影响 CRC 预后的单因素;B. 影响 CRC 预后的多因素;C. T 分期、N 分期和 TTYH3 表达预测 CRC 患者的 1、3 和 5 年的总体生存率;D. 1 年、3 年和 5 年 CRC 患者生存校准曲线。

3 讨论

CRC 发展是一个多步骤的过程,包括由特定基因组变化的顺序累积从而引发的一系列组织学和形态学变化[20]。随着高通量技术的日益普及,通过对各种类型肿瘤的转录组学分析,已经确定了许多新的生物标志物和治疗靶点[21-22]。但关于 CRC 中生物标志物的研究尚未广泛开展。CRC 生物标志物的探索可能有助于预测和延长 CRC 患者的生存期[23]。因此,寻找与 CRC 发生发展相关的基因或生物标志物能有助于诊断、治疗及预后评估[24]。本研究从 TCGA 公共数据库中下载了 610 例 CRC 患者和 10 例正常人的 RNA 测序表达谱及患者的相关临床病理信息。通过差异表达分析,发现有 1 184 个基因表达上调及 1 602 个基因表达下调。

研究[25]报道,TTYH3 在肺癌组织中表达上调,且 TTYH3 的表达在肺癌患者有诊断和治疗价值。Biswas 等[26]研究发现,与正常膀胱组织相比,TTYH3 在膀胱癌组织中表达显著升高。敲低 TTYH3 表达能够抑制膀胱癌细胞的增殖、迁移及侵袭能力。这些研究结果表明 TTYH3 是一种潜在的调节癌症的因子,且能作为肿瘤的治疗靶点。因此,TTYH3 是一个与多种癌症相关的重要基因。但 TTYH3 在 CRC 中的生物学功能和分子机制仍然未知。在本研究中,与正常组织相比,TTYH3 在 CRC 组织中的表达水平升高($P<0.05$);生存分析显示,TTYH3 的表达与 CRC 患者的总体生存率有相关性($P<0.05$),高表达 TTYH3 的 CRC 患者的

OS 低于低表达 TTYH3 的患者（$P<0.05$），表明 TTYH3 可能参与 CRC 的发生发展，且是 CRC 患者的重要预后指标。高表达 TTYH3 组和低表达 TTYH3 组患者的 RNA 表达谱分析结果显示，有 5 658 个基因差异表达，其中 3 003 个基因表达上调及 2 655 个基因表达下调。GO 和 KEGG 富集分析结果表明，TTYH3 可能与 CRC 的增殖相关。此外，通过收集的临床样本结合患者的临床病理特征分析发现，TTYH3 表达升高与 CRC 患者较晚的 TNM 分期，较大的肿瘤及淋巴结转移相关。这些结果初步说明了 TTYH3 与 CRC 的发展可能相关。

本研究通过体外实验验证了 TTYH3 的功能。在人正常结肠上皮细胞（NCM460）和 CRC 细胞系（HT29，SW480，Lovo 和 HCT116）中通过 RT-qPCR 检测 TTYH3 的表达，结果显示，与正常结肠上皮细胞相比，TTYH3 在 CRC 细胞系中表达上调（$P<0.05$），其中在 SW480 细胞系中表达最高，在 Lovo 细胞系中表达偏低。在 SW480 细胞系中，将 TTYH3 表达敲低，MTT 和克隆形成实验结果显示，与对照组相比，敲低 TTYH3 表达后能降低 SW480 细胞的增殖能力（$P<0.05$）；相反，在 Lovo 细胞系中过表达 TTYH3 后，Lovo 细胞的增殖能力增强（$P<0.05$）。体内实验结果显示，敲低 TTYH3 的表达后，裸鼠成瘤的体积变小（$P<0.05$），且和对照组相比，低表达 TTYH3 组的肿瘤生长曲线下调（$P<0.05$），表明敲低 TTYH3 表达能够降低肿瘤的增殖。将切除的肿瘤使用免疫组化检测 TTYH3、Ki-67 及 Cleaved Caspase 3 的表达，结果显示，与对照组相比，敲低 TTYH3 表达后伴随 Ki-67 表达降低而 Cleaved Caspase 3 的表达升高（$P<0.05$）。以上结果表明，TTYH3 可能通过增强 CRC 细胞增殖，从而促进 CRC 的发展。

本研究证实了 TTYH3 在 CRC 中的高表达及其促癌功能，但其作为钙激活 CL^- 通道的具体下游作用机制仍需深入探索。首先 TTYH3 的高表达可激活多条信号通路，比如 GSK3-β/β-catenin 通路和 Wnt/β-catenin 通路，激活以上通路后还可抑制促凋亡蛋白，同时上调抗凋亡蛋白的表达，使癌细胞能够抵抗凋亡信号，增强生存能力。另外，TTYH3 作为一个通路蛋白，可以重塑细胞骨架，通过 CL^- 流影响细胞内的 pH 值和离子环境，进而调控肌动蛋白细胞骨架的重组，为细胞迁移提供动力[27]。TTYH3 还可上调 MMP2，MMP9 等蛋白的表达[28]，这些基质金属蛋白酶能降解细胞外基质，促进癌细胞的侵袭和转移。CL^- 通道能通过调节细胞内 CL^- 浓度和细胞膜电位，从而影响 Ca^{2+} 内流。细胞内钙信号是调控细胞周期、增殖和凋亡的核心信使。本研究观察到影响 TTYH3 表达后细胞增殖受影响。因此推测，TTYH3 可能通过介导 CL^- 外流，使膜电位去极化，促进电压门控钙通道开放或反向钠钙交换体活动，导致 Ca^{2+} 内流，进而激活如钙调蛋白/CaMKII 等下游效应分子，最终驱动 CRC 的恶性进展。明确其具体的下游效应分子及信号通路，将是下一步研究的重点。

列线图通过临床预后变量和生存概率，目前被广泛用作癌症患者的预后工具[29]。因此，为了更好地预测 CRC 患者在术后 1、3 和 5 年的生存率，本研究将 TTYH3 表达和其他相关临床病理特征纳入 Cox 模型，构建了一个简明的列线图。该列线图中，包括了三个独立预后因素，即 TTYH3 表达、T 分期和 N 分期。校准曲线验证了其准确性。在临床工作中，可以检测 CRC 患者的 TTYH3 表达，查明患者的 T 分期及 N 分期，通过这些数据在列线图中获得相应的分数，进而能够估算 CRC 患者 1、3 和 5 年的生存率。该列线图能够为临床医生提供更好的治疗决策帮助。

综上，TTYH3 在 CRC 的发生和进展中发挥着重要作用，且与预后相关，有可能成为 CRC 新的预后生物标志物和治疗靶点。

参考文献

[1] Bahrami A, Hassanian SM, ShahidSales S, *et al*. Targeting RAS signaling pathway as a potential therapeutic target in the treatment of colorectal cancer [J]. Journal of Cellular Physiology, 2018, 233(3): 2058－2066.

[2] Chen W, Zheng R, Baade PD, *et al*. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2016, 66(2): 115－132.

[3] Bahrami A, Shahidsales S, Khazaei M, *et al*. C-Met as a potential target for the treatment of gastrointestinal cancer: Current status and future perspectives [J]. Journal of Cellular Physiology, 2017, 232(10): 2657－2673.

[4] Simon K. Colorectal cancer development and advances in screening [J]. Clinical Interventions in Aging, 2016, 11: 967－976.

[5] Maida M, Macaluso FS, Ianiro G, *et al*. Screening of colorectal cancer: present and future [J]. Expert Review of Anticancer Therapy, 2017, 17(12): 1131－1146.

[6] Bresalier RS. Early detection of and screening for colorectal neoplasia[J]. Gut and Liver, 2009, 3(2): 69－80.

[7] Yue YY, Fan XY, Zhang Q, *et al*. Bibliometric analysis of subject trends and knowledge structures of gut microbiota [J]. World Journal of Clinical Cases, 2020, 8(13): 2817－2832.

[8] Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer[J]. Cell, 1996, 87(2): 159－170.

[9] Suzuki M, Mizuno A. A novel human Cl (-) channel family related to Drosophila flightless locus[J]. The Journal of Bio-

logical Chemistry, 2004, 279(21): 22461－22468.

[10] Halleran AD, Sehdev M, Rabe BA, *et al*. Characterization of tweety gene (ttyh1-3) expression in Xenopus laevis during embryonic development[J]. Gene Expression Patterns, 2015, 17(1): 38－44.

[11] Stefaniuk M, Swiech L, Dzwonek J, *et al*. Expression of Ttyh1, a member of the Tweety family in neurons in vitro and in vivo and its potential role in brain pathology[J]. Journal of Neurochemistry, 2010, 115(5): 1183－1194.

[12] Toiyama Y, Mizoguchi A, Kimura K, *et al*. TTYH2 a human homologue of the Drosophila melanogaster gene tweety, is up-regulated in colon carcinoma and involved in cell proliferation and cell aggregation[J]. World Journal of Gastroenterology, 2007, 13(19): 2717－2721.

[13] Wu HN, Cao XL, Fang Z, *et al*. Deficiency of Ttyh1 downstream to Notch signaling results in precocious differentiation of neural stem cells[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2019, 514(3): 842－847.

[14] Kumada T, Yamanaka Y, Kitano A, *et al*. Ttyh1, a Ca^{2+}-binding protein localized to the endoplasmic reticulum, is required for early embryonic development [J]. Developmental Dynamics, 2010, 239(8): 2233－2245.

[15] Jung E, Osswald M, Blaes J, *et al*. Tweety-homolog 1 drives brain colonization of gliomas[J]. The Journal of Neuroscience, 2017, 37(29): 6837－6850.

[16] Suzuki M. The Drosophilatweety family: molecular candidates for large-conductance Ca^{2+}-activated Cl^- channels[J]. Experimental Physiology, 2006, 91(1): 141－147.

[17] Saha SK, Biswas PK, Gil M, *et al*. High expression of TTYH3 is related to poor clinical outcomes in human gastric cancer[J]. Journal of Clinical Medicine, 2019, 8(11): 1762.

[18] Xue W, Dong B, Zhao Y, *et al*. Upregulation of TTYH3 promotes epithelial-to-mesenchymal transition through Wnt/β-catenin signaling and inhibits apoptosis in cholangiocarcinoma [J]. Cellular Oncology, 2021, 44(6): 1351－1361.

[19] Wang Y, Xie Y, Dong B, *et al*. The TTYH3/MK5 positive feedback loop regulates tumor progression via GSK3-β/β-catenin signaling in HCC[J]. International Journal of Biological Sciences, 2022, 18(10): 4053－4070.

[20] Ciardiello D, Vitiello PP, Cardone C, *et al*. Immunotherapy of colorectal cancer: Challenges for therapeutic efficacy [J]. Cancer Treatment Reviews, 2019, 76: 22－32.

[21] Dai L, Li J, Dong Z, *et al*. Temporal expression and functional analysis of long non-coding RNAs in colorectal cancer initiation [J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2019, 23(6): 4127－4138.

[22] Chen Z, Wu G, Ye F, *et al*. High expression of MMP19 is associated with poor prognosis in patients with colorectal cancer [J]. BMC Cancer, 2019, 19(1): 448.

[23] Koncina E, Haan S, Rauh S, *et al*. Prognostic and predictive molecular biomarkers for colorectal cancer: updates and challenges[J]. Cancers, 2020, 12(2): 319.

[24] Chen L, Lu D, Sun K, *et al*. Identification of biomarkers associated with diagnosis and prognosis of colorectal cancer patients based on integrated bioinformatics analysis[J]. Gene, 2019, 692: 119－125.

[25] Wei Z, Zeng X, Lei Y, *et al*. TTYH3, a potential prognosis biomarker associated with immune infiltration and immunotherapy response in lung cancer[J]. International Immunopharmacology, 2022, 110: 108999.

[26] Biswas PK, Kwak Y, Kim A, *et al*. TTYH3 modulates bladder cancer proliferation and metastasis via FGFR1/H-ras/A-raf/MEK/ERK pathway[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(18): 10496.

[27] Li B, Hoel CM, Brohawn SG. Structures of tweety homolog proteins TTYH2 and TTYH3 reveal a Ca^{2+} － dependent switch from intra- to intermembrane dimerization[J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 6913.

[28] Cao Y, Zhou Z, He S, *et al*. TTYH3 promotes the malignant progression of oral squamous cell carcinoma SCC-9 cells by regulating tumor-associated macrophage polarization [J]. Archives of Oral Biology, 2024, 165: 106028.

[29] Balachandran VP, Gonen M, Smith JJ, *et al*. Nomograms in oncology: more than meets the eye[J]. The Lancet Oncology, 2015, 16(4): e173－e180.

(**收稿日期**: 2025－09－05 **修回日期**: 2025－10－30)