

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.06.010

· 临床研究 ·

长链非编码RNA TTN-AS1在肺腺癌中的表达及其临床意义

贾云珑, 刘琰, 王郁, 刘天旭, 王佳丽, 刘丽华(河北医科大学 第四医院 肿瘤免疫治疗科, 河北 石家庄 050035)

[摘要] **目的:** 研究肺腺癌组织中长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)肌联蛋白反义RNA1(titin antisense RNA 1, TTN-AS1)的表达情况, 并分析其与肺腺癌患者临床病理特征和预后的关系。**方法:** 使用TCGA数据库对肺腺癌数据集中TTN-AS1的表达情况进行分析; 收集在2014年1月至2015年1月期间在河北医科大学第四医院胸外科行肿瘤切除并经病理证实的52例肺腺癌患者肿瘤组织及其相应癌旁组织标本, 使用qPCR检测其TTN-AS1的表达水平并分析其与患者临床病理特征的相关性, 生存分析探讨其在患者预后中的临床意义。**结果:** TCGA数据库分析和qPCR检测结果均显示, TTN-AS1在肺腺癌组织中的表达水平显著高于癌旁组织(均 $P<0.01$)。TTN-AS1的表达与肺腺癌患者的TNM分期和淋巴结转移相关联(均 $P<0.05$), 而与患者性别、年龄、肿瘤侵犯范围无关联($P>0.05$)。Kaplan-Meier单因素分析结果显示, 高表达TTN-AS1较低表达TTN-AS1的肺腺癌患者术后DFS和OS显著缩短(均 $P<0.01$)。Cox比例风险回归模型分析结果显示, 肿瘤高侵犯范围、阳性淋巴结转移和TTN-AS1高表达是影响患者术后PFS和OS的独立危险因素($P<0.01$)。**结论:** TTN-AS1在肺腺癌组织中高表达, 与患者TNM分期、淋巴结转移以及与患者较差的DFS和OS密切相关(均 $P<0.05$), 高表达TTN-AS1可能是提示肺腺癌患者预后不良的生物标志物。

[关键词] 肺腺癌; 长链非编码RNA(lncRNA); 肌联蛋白反义RNA1(TTN-AS1); 预后; 生物标志物

[中图分类号] R730.54; R734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)06-0653-05

Expression and clinical significance of lncRNA TTN-AS1 in lung adenocarcinoma

JIA Yunlong, LIU Yan, WANG Yu, LIU Tianxu, WANG Jiali, LIU Lihua (Department of Tumor Immunotherapy, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050035, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To study the expression of long non-coding RNA (lncRNA) titin antisense RNA 1 (TTN-AS1) in lung adenocarcinoma (LUAD) tissues, and explore its relationship with clinicopathologic characteristics and prognosis of LUAD patients. **Methods:** The TTN-AS1 expression in LUAD data set was analyzed using TCGA database. 52 pairs of tumor tissues and matched para-carcinoma tissues from LUAD patients, who underwent surgical resection and were later pathologically conformed in Fourth Hospital of Hebei Medical University between Jan. 2014 and Jan. 2015, were used in this study. qPCR was performed to detect TTN-AS1 expression in the specimens. Then, the correlations between TTN-AS1 expression and clinicopathologic characteristics were analyzed. Survival analysis was used to determine the significance of TTN-AS1 expression for predicting the prognosis of LUAD patients. **Results:** TCGA database analysis and qPCR results showed that TTN-AS1 expression in LUAD tissues was significantly higher than that in normal lung and para-carcinoma tissues (both $P<0.01$). TTN-AS1 expression in LUAD tissues was significantly correlated with the TNM stage and lymph node metastasis ($P<0.05$), but not correlated with gender, age, tumor invasion range ($P>0.05$). Kaplan-Meier univariate analysis result demonstrated that the patients with high TTN-AS1 expression had shorter post-operative disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) than those patients with low TTN-AS1 expression (all $P<0.01$). Cox proportional hazard regression model result demonstrated that wider tumor invasion range, positive lymph node metastasis and high TTN-AS1 expression were significantly correlated with shorter postoperative DFS and OS ($P<0.05$). **Conclusion:** TTN-AS1 was highly expressed in LUAD tissues, and closely correlated with TNM stage and lymph node metastasis of LUAD patients (all $P<0.05$). High expression of TTN-AS1 is significantly correlated with shorter DFS and OS, indicating that TTN-AS1 may be a biomarker for predicting poor prognosis of LUAD patients.

[Key words] lung adenocarcinoma; long non-coding RNA (lncRNA); titin antisense RNA 1 (TTN-AS1); prognosis; biomarker

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(6): 653-657. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.06.010]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81871894); 河北省自然科学基金资助项目(No. H2018206318)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81871894), and the Natural Science Foundation of Hebei Province(No. H2018206318)

[作者简介] 贾云珑(1989-), 男, 硕士, 主治医师, 主要从事恶性肿瘤的临床治疗和肿瘤分子生物学研究, E-mail: drunkclaw@163.com

[通信作者] 刘丽华(LIU Lihua, corresponding author), 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事肿瘤免疫学、肿瘤分子生物学、肿瘤表观遗传学和肿瘤综合治疗研究, E-mail: lihualiu567@hotmail.com

肺癌是全球最常见的恶性肿瘤之一,发病率和病死率高居恶性肿瘤之首^[1]。超过85%的病理类型为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC),其中55%~65%为腺癌^[2]。尽管包含手术、化疗、放疗、靶向治疗等多种治疗方法在内的肿瘤综合治疗已取得巨大进步,但整体治疗效果仍无法令人满意。深入探究参与调控肺腺癌恶性生物学行为的相关因素有利于进一步了解其发展机制并协助研制新型药物^[2]。长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是一类长度大于200个核苷酸且不包含开放阅读框架的转录本,能够通过吸附miRNA、脚手架区域(CSD)作用和染色质调控等机制影响多种肿瘤细胞的恶性生物学行为^[3]。肌联蛋白反义RNA1(titin antisense RNA 1, TTN-AS1)是一条发挥促癌功能的lncRNA,在食管鳞癌、肝细胞癌、宫颈癌等多种恶性肿瘤中呈高表达^[4-6]。目前TTN-AS1在肺腺癌中的表达及临床意义尚不完全清楚。本研究检测TTN-AS1在肺腺癌组织中的表达并分析其与患者临床特征和预后的关系,旨在为进一步研究其在肺腺癌中的功能及机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集2014年1月至2015年1月于河北医科大学第四医院胸外科收治的52例肺腺癌患者手术切除的癌组织及其相应的距离癌灶边缘5 cm以上癌旁组织,其中男性19例、女性33例;年龄29~73岁,中位年龄50岁,平均年龄(50.63±13.13)岁。所有患者术前均未行任何抗肿瘤治疗,并于术后经病理学确诊。按照UICC肺癌分期标准第七版对患者进行TNM分期,其中I期6例,II期32例,III期14例。所有标本及临床资料的收集均经河北医科大学第四医院医学伦理委员会批准,征得患者同意并签署了知情同意书。

1.2 qPCR检测肺腺癌及癌旁组织中TTN-AS1的表达水平

按说明书使用TRIzol提取样本的总RNA,参照反转录试剂盒说明书将RNA逆转录为cDNA,所得cDNA保存于-20℃冰箱备用。以此cDNA为模板进行qPCR扩增,反应条件:95℃预变性5 min,95℃变性15 s,60℃退火30 s,72℃延伸30 s,共40个循环,72℃延伸7 min。以GAPDH作为内参照,其上游引物为5'-GTCACCTTCACCGTTCCAGTTTT-3',下游引物为5'-CTTAGTTGCGTTACACCCTTTCTT-3'; TTN-AS1上游引物为5'-GCCAGGTAGAGTTGCAGGTT-3',下游引物为5'-GAAGCTGCTGCGGATGAATG-3'。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的值表示TTN-AS1的相对表达水平^[7]。

1.3 后续治疗及随访

术后根据CSCO指南进行规范化治疗,期间每3个月对患者进行复查,根据RECIST 1.1标准进行疗效评估。当患者出现局部复发或远处转移时,活检进行病理学确诊。随访起始时间为手术时间,截止时间为2019年9月30日。从手术当天至第一次复发或转移的时间为无疾病生存期(disease-free survival, DFS),至因肿瘤而死亡的时间为总生存期(overall survival, OS)。

1.4 统计学处理

应用SPSS 25.0统计学软件进行数据分析,用Graphpad Prism 8软件绘制统计图。正态分布的计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,计数数据以百分率表示。比较肺腺癌及相应癌旁组织中TTN-AS1的相对表达水平采用配对秩和检验,TTN-AS1表达与肺腺癌患者临床病理特征的分析采用 χ^2 检验,TTN-AS1表达与肺腺癌患者预后的关系采用Kaplan-Meier检验和Cox比例风险回归模型进行分析。以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 数据库数据集分析和临床样本验证TTN-AS1在肺腺癌组织中显著高表达

对TCGA数据库中的肺腺癌数据集进行分析,结果(图1)表明,TTN-AS1在肺腺癌组织中表达水平显著高于正常肺组织($P=0.002$)。

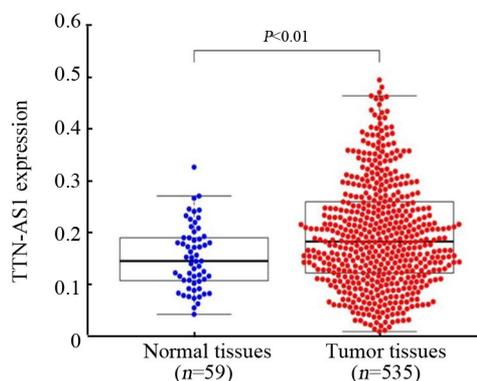


图1 TCGA数据库分析TTN-AS1在肺腺癌以及正常肺组织中的表达

Fig.1 Analysis of TTN-AS1 expression in lung adenocarcinoma and normal lung tissues with TCGA database

为进一步明确TTN-AS1在肺腺癌中的表达情况,qPCR检测结果(图2)显示,肺腺癌中TTN-AS1的表达水平显著高于癌旁组织(0.583 ± 0.333 vs 0.131 ± 0.081 , $Z=-6.186$, $P<0.001$)。由此可见,TTN-AS1在肺腺癌中可能发挥促癌作用。

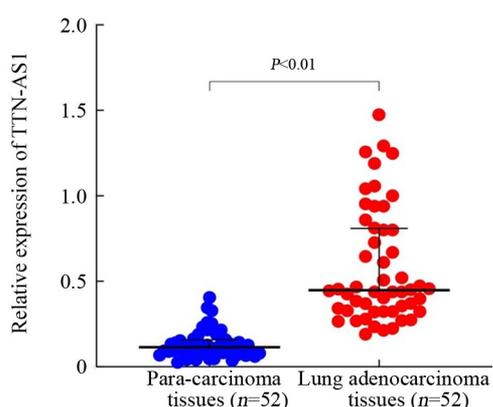


图2 TTN-AS1在肺腺癌及其癌旁组织中的相对表达水平
Fig.2 Relative expression of TTN-AS1 in lung adenocarcinoma and matched para-carcinoma tissues

2.2 TTN-AS1 表达与肺腺癌患者临床病理特征的关系

为探讨 TTN-AS1 与肺腺癌患者的临床病理特征的关系,本研究将 TTN-AS1 的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 临界阈值界定为 2, ≥ 2 为高表达、 < 2 为低表达。qPCR 检测结果显示,肺腺癌患者组织中高表达 TTN-AS1 占 55.77% (29/52)。TTN-AS1 表达与患者 TNM 分期和淋巴结转移密切相关 ($P=0.044, P=0.038$), TNM 分期较晚和淋巴结转移阳性的肺腺癌患者肿瘤组织中 TTN-AS1 的表达水平显著增高 ($P<0.05$), 但 TTN-AS1 与患者性别、年龄、肿瘤侵犯范围无关 ($P=0.730, P=0.611, P=0.696$)。见表 1。

表1 TTN-AS1 表达与肺腺癌患者临床病理特征的关系[n (%)]

Tab.1 Relationship of TTN-AS1 with clinicopathological features of lung adenocarcinoma patients[n (%)]

Feature	N	High expression of TTN-AS1	Low expression of TTN-AS1	χ^2	P
Gender					
Male	19	10 (61.22)	9 (38.78)	0.119	0.730
Female	33	19 (48.28)	14 (51.72)		
Age (t/a)					
≤ 60	38	22 (55.56)	16 (44.44)	0.259	0.611
> 60	14	7 (50.00)	7 (50.00)		
TNM stage					
I+II	38	18 (46.75)	20 (53.25)	4.038	0.044
III	14	11 (73.33)	3 (26.67)		
Invasion range					
T1+T2	37	20 (50.68)	17 (49.32)	0.153	0.696
T3+T4	15	9 (61.76)	6 (38.24)		
Lymph node metastasis					
Negative	15	5 (39.47)	10 (60.53)	4.302	0.038
Positive	37	24 (62.32)	13 (37.68)		

2.3 TTN-AS1 表达与肺腺癌患者预后的关系

根据 TTN-AS1 表达水平将 52 例肺腺癌患者分为 TTN-AS1 高表达组和低表达组,采用 Kaplan-Meier 方法对 TTN-AS1 在肺腺癌中的预后意义进行分析。结果(图 3)显示,与 TTN-AS1 低表达组相比,TTN-AS1 高表达组的 PFS 显著缩短 [(22.586 \pm 1.881) vs (48.348 \pm 2.449) 个月;中位 PFS: 34 vs 19 个月;Log rank test: $P<0.01$;图 3A],同时 OS 亦显著缩短 [(36.517 \pm 2.727) vs (48.348 \pm 2.449) 个月;中位 OS: 33 vs 56 个月;Log-rank test: $P<0.01$,图 3B]。Cox 比例风险回归模型纳入性别、年龄、TNM 分期、肿瘤侵犯范围、淋巴结转移以及 TTN-AS1 的表达水平指标进行分析,结果显示,肿瘤高侵犯范围、阳性淋巴结转移和 TTN-AS1 高表达是影响患者 PFS 的独立因素

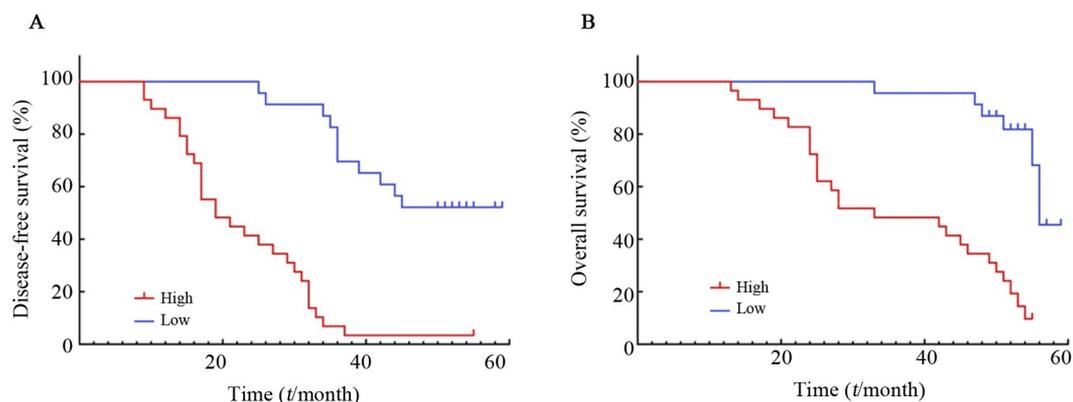
($HR=3.882, P=0.011; HR=3.795, P=0.022; HR=7.613, P<0.001$),同时肿瘤高侵犯范围、阳性淋巴结转移和 TTN-AS1 高表达亦是影响患者 OS 的独立危险因素 ($HR=4.624, P=0.017; HR=9.312, P=0.005; HR=5.075, P=0.001$)。

3 讨论

肺腺癌是一种全球范围内常见的恶性肿瘤^[1]。DNA 元件百科全书(Encyclopedia of DNA Elements, ENCODE)计划结果表明,人类大多数基因被转录为不包含开放阅读框的非编码 RNA, lncRNA 是其中的重要组成部分之一^[8]。近年来有研究^[9-11]证实,异常表达 lncRNA 能够通过促进细胞增殖、增强侵袭转移和诱导耐药等机制促进肺腺癌的进展。然而,目前参

与肺腺癌发生发展的 lncRNA 尚未被完全揭示。因此,探索与肺腺癌进展密切相关的 lncRNA 并阐明其

临床意义有助于建立肺腺癌的 lncRNA 表达及功能网络,为制定相关治疗策略提供依据。



A: Relationship between TTN-AS1 expression and postoperative DFS;

B: Relationship between TTN-AS1 expression and postoperative OS

图3 TTN-AS1 表达与肺腺癌患者术后 DFS 和 OS 的关系

Fig.3 Relationship between TTN-AS1 expression and postoperative DFS and OS in patients with lung adenocarcinoma

TTN-AS1 定位于 2 号染色体 178521183 至 178779963, 转录自肌联蛋白转录本的反义链, 与其不完全互补^[4]。TTN-AS1 已被报道在多种肿瘤中可发挥促癌作用, 例如在胃癌中 TTN-AS1 可通过上调 KLF12 促进细胞增殖、侵袭和转移能力^[12], 在甲状腺乳头状癌中 TTN-AS1 可通过上调 ZNRF2 促进上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 过程进而激活肿瘤细胞侵袭转移^[13], 在骨肉瘤中可通过上调 MBTD1 促进耐药^[14], 在结肠癌中通过激活 PI3K/Akt/mTOR 促进肿瘤细胞增殖和侵袭^[15]。目前, TTN-AS1 在肺腺癌中的表达及其与患者预后的关系尚未见报道。

首先, 为明确 TTN-AS1 在肺腺癌中的表达是否具有差异, 本研究对 TCGA 数据库中的肺腺癌数据集进行分析并发现 TTN-AS1 在肺腺癌组织中的表达水平显著高于正常组织, 这表明 TTN-AS1 是一条可能在肺腺癌的发生发展过程中发挥促癌作用的 lncRNA。为进一步验证 TCGA 数据库的分析结果, 本试验对 52 对临床收集的肺腺癌组织及其相应癌旁组织中 TTN-AS1 的表达水平进行检测, 结果表明, 肺腺癌组织中 TTN-AS1 的表达水平显著高于癌旁组织 ($P < 0.01$), 与本课题组利用 TCGA 数据库分析得到的结果一致, 提示在肺腺癌进展中 TTN-AS1 可能发挥重要作用。同时本课题还分析了 TTN-AS1 表达水平与肺腺癌患者临床病理特征的相关性, 发现 TTN-AS1 表达与肺腺癌患者 TNM 分期和淋巴结转移情况具有显著相关性 ($P = 0.044$, $P = 0.038$), TNM 分期较晚和淋巴结转移阳性的肺腺癌患者肿瘤组织内

TTN-AS1 的表达水平显著上调 ($P < 0.05$); 然而 TTN-AS1 的表达水平与患者性别、年龄和肿瘤侵犯范围之间均无显著相关性 ($P > 0.05$)。结果表明 TTN-AS1 在肺腺癌的进展中可能发挥重要作用, 尤其与淋巴结转移关系密切。本研究通过生存分析探讨 TTN-AS1 表达水平与患者术后预后的关系, Kaplan-Meier 分析结果表明, 高表达 TTN-AS1 的肺腺癌患者的术后 DFS 和 OS 均较低, 表达 TTN-AS1 的患者显著缩短 ($P < 0.01$), 提示 TTN-AS1 高表达与肺腺癌患者不良预后密切相关。多因素的 Cox 风险比例回归模型分析结果表明, 肿瘤高侵犯范围、淋巴结转移阳性以及 TTN-AS1 高表达均与患者的 PFS 和 OS 密切相关。以上研究结果提示, 肿瘤组织中 TTN-AS1 高表达可能作为独立提示肺腺癌患者术后预后差的生物标志物。

综上所述, 本研究通过 TCGA 数据库和临床组织样本证实 TTN-AS1 在肺腺癌组织中呈高表达状态, 其高表达与肺腺癌患者较晚的 TNM 分期、淋巴结转移阳性密切相关; 高表达 TTN-AS1 可能是提示肺腺癌患者预后不良的生物标志物。本研究可为深入研究 TTN-AS1 在肺腺癌中的生物学功能提供实验依据。

[参考文献]

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2019 [J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34. DOI: 10.3322/caac.21551.
- [2] 高强, 钟英英, 丁华杰, 等. 肺腺癌相关基因的生物信息学分析 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2019, 26(2): 190-195. DOI: 10.3872/j.

- issn.1007-385X.2019.02.008.
- [3] BATISTA P J, CHANG H Y. Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease[J/OL]. *Cell*, 2013, 152(6): 1298-1307[2019-12-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3651923/>. DOI:10.1016/j.cell.2013.02.012.
- [4] LIN C, ZHANG S, WANG Y, et al. Functional role of a novel long noncoding rna ttn-as1 in esophageal squamous cell carcinoma progression and metastasis [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(2): 486-498. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-17-1851.
- [5] FALCON T, FREITAS M, MELLO A C, et al. Analysis of the cancer genome atlas data reveals novel putative ncRNAs targets in hepatocellular carcinoma[J/OL]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 2864120 [2019-12-26]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6038674/>. DOI: 10.1155/2018/2864120.
- [6] CHEN P, WANG R, YUE Q, et al. Long non-coding rna ttn-as1 promotes cell growth and metastasis in cervical cancer via mir-573/e2f3 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(4):2956-2962. DOI:10.1016/j.bbrc.2018.08.077.
- [7] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C} (T) Method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
- [8] 杨柳, 梁佳, 沈素朋, 等. 过表达过表达 lncRNA LINC00886 抑制食管鳞状细胞癌 eca109 细胞的恶性生物学行为[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2019, 26(7): 751-756. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.07.005.
- [9] DING H, LUO Y C, HU K, et al. Linc00467 promotes lung adenocarcinoma proliferation via sponging miR-20b-5p to activate CCND1 expression[J/OL]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 6733-6743 [2019-12-17]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6709798/>. DOI:10.2147/OTT.S207748.
- [10] PENG Z Z, WANG J, SHAN B, et al. The long noncoding RNA LINC00312 induces lung adenocarcinoma migration and vasculogenic mimicry through directly binding YBX1[J/OL]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 167[2019-12-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6260658/>. DOI:10.1186/s12943-018-0920-z.
- [11] TIAN X, GAO S, LIU Y, et al. Long non-coding RNA ENST00000500843 is downregulated and promotes chemoresistance to paclitaxel in lung adenocarcinoma[J/OL]. *Oncol Lett*, 2019, 18(4): 3716-3722[2019-12-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6732953/>. DOI:10.3892/ol.2019.10704.
- [12] DONG M M, PENG S J, YUAN Y N, et al. LncRNA TTN-AS1 contributes to gastric cancer progression by acting as a competing endogenous RNA of miR -376b-3p[J]. *Neoplasma*, 2019, 66(4): 564-575. DOI:10.4149/neo_2018_180927N721.
- [13] CUI Z H, LUO Z Y, LIN Z M, et al. Long non-coding RNA TTN-AS1 facilitates tumorigenesis of papillary thyroid cancer through modulating the miR-153-3p/ZNRF2 Axis[J]. *J Gene Med*, 2019, 21(5): e3083[2019-12-06]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jgm.3083>. DOI:10.1002/jgm.3083.
- [14] FU D, LU C W, QU X Z, et al. LncRNA TTN-AS1 regulates osteosarcoma cell apoptosis and drug resistance via the miR-134-5p/MBTD1 Axis[J/OL]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(19): 8374-8385 [2020-01-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6814585/>. DOI: 10.18632/aging.102325.
- [15] CUI Z H, HAN B B, WANG X R, et al. Long non-coding RNA TTN-AS1 promotes the proliferation and invasion of colorectal cancer cells by activating miR-497-mediated PI3K/ Akt/mTOR signaling[J/OL]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 11531-11539[2020-01-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6939175/>. DOI: 10.2147/OTT.S229104.

[收稿日期] 2020-02-25

[修回日期] 2020-05-20

[本文编辑] 阮芳铭