

· 临床研究 ·

长链非编码 RNA TPTEP1 在肺腺癌中的表达及作用研究

潘春峰, 刘锦源*

南京医科大学第一附属医院胸外科, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的:探讨长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)TPTEP1 在肺腺癌中的表达及其作用。方法:收集 86 对肺腺癌患者的癌组织及癌旁组织样本、33 例肺腺癌患者术前及术后的血浆样本,采用 qRT-PCR 检测 TPTEP1 在所收集组织、血浆样本及肺腺癌细胞株中的表达量。采用慢病毒过表达 TPTEP1 在肺腺癌细胞株 A549 中的表达后,利用 CCK-8、Transwell 实验评估肺腺癌细胞的增殖和侵袭迁移能力。结果:肺腺癌组织的 TPTEP1 表达量与对照组相比明显降低,并且其表达量与肺腺癌的肿瘤大小、分化程度、淋巴结转移和 TNM 分期明显相关。肺腺癌患者术后血浆中的 TPTEP1 表达量较术前出现了明显上升。过表达 TPTEP1 明显抑制了肺腺癌细胞株的增殖、侵袭和迁移能力。结论:TPTEP1 在肺腺癌患者癌组织及术前血浆中的表达量明显降低,并且可以抑制肺腺癌细胞的增殖和转移能力,可能成为肺腺癌诊断治疗可行的潜在靶标。

[关键词] 肺腺癌;lncRNA;TPTEP1;诊断

[中图分类号] R734.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2022)05-673-06

doi:10.7655/NYDXBNS20220511

The expression of long non-coding RNA TPTEP1 and its tumor-suppressor function in lung adenocarcinoma

PAN Chunfeng, LIU Jinyuan*

Department of Thoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to investigate the expression and function of long non-coding RNA (lncRNA) TPTEP1 in lung adenocarcinoma. **Methods:** Eighty-six pairs of lung adenocarcinoma patients' tumor and adjacent-tumor tissue samples, 33 pairs of preoperative and postoperative plasma samples from lung adenocarcinoma patients were collected, and qRT-PCR was used to detect the expression of TPTEP1. The correlation between TPTEP1 levels and clinical features were analyzed. After using lentivirus to overexpress the expression of TPTEP1 in lung adenocarcinoma cell lines A549, CCK-8 and tranwell experiments were used to evaluate the proliferation, invasion and migration ability of lung adenocarcinoma cells. **Results:** The expression of TPTEP1 in lung adenocarcinoma tissues and cell lines was significantly lower than that in the control group, and its expression was significantly related to the tumor size, tumor differentiation, lymph metastasis and TNM stage of lung adenocarcinoma. Overexpression of TPTEP1 significantly inhibited the proliferation, invasion and migration of lung adenocarcinoma cells. **Conclusion:** The expression of TPTEP1 in lung adenocarcinoma tissue and preoperative plasma is significantly reduced, and it could inhibit the proliferation and metastasis of lung adenocarcinoma cells, which might provide a feasible potential target for the diagnosis and therapy of lung adenocarcinoma.

[Key words] lung adenocarcinoma; lncRNA; TPTEP1; diagnosis

[J Nanjing Med Univ, 2022, 42(05): 673-678]

肺癌作为世界上发病率及病死率最高的肿瘤之一,其分型中肺腺癌的发病率持续性升高,已经成为占比最高的肺癌病理亚型^[1]。尽管目前手术、

放疗、化疗及靶向治疗等各项疗法取得了长足发展,其预后仍不够理想^[2]。因此,寻找新的生物标志物及治疗靶点具有重要意义。

长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA) 作为一类不具有编码功能的 RNA,近年来被证实参与转录前、转录后等多种途径参与了多种肿瘤的发生

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目(81902328)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: 14118762@qq.com

及发展过程^[3-5]。lncRNA TPTEP1 作为抑癌基因被证实实在肝癌组织中明显低表达,并且通过微小RNA (miRNA)-454-3p 调控 DLG5 表达来抑制肝癌细胞的生长和转移^[6]。在 StarBase 数据库中,TPTEP1 在肺腺癌组织中呈现了明显的低表达,但其在肺腺癌中的具体作用缺乏研究,因此本研究旨在探索 TPTEP1 在肺腺癌中的表达,尤其是在肺腺癌术前及术后血浆中的表达,探讨其与肺腺癌患者临床特征的关系,研究其对肺腺癌细胞生长及转移的作用,以期对肺腺癌的病情评价及靶向治疗提供可行的生物靶点。

1 材料和方法

1.1 材料

收集 2017 年 6 月—2020 年 12 月 86 例在南京医科大学第一附属医院接受手术治疗的肺腺癌患者癌组织、癌旁组织;同时收集 33 例肺腺癌手术患者的术前血浆及术后血浆(术后 1 个月)样本。所有样本取材后立即保存液氮中。术后病理均证实为肺腺癌并剔除临床资料(符合第 8 版 AJCC 病理分类)不完整病例。每例患者都签署了知情同意书。本研究得到了医院伦理委员会的批准(2019-SRFA-261)。此外,本研究还检索了 TCGA 数据库中 TPTEP1 与肺腺癌预后的相关数据^[7]。

肺腺癌细胞系 A549、SPCA1、H1299、H358、PC-9 和正常支气管上皮细胞系 BEAS-2B 来自于本实验室冻存,原始细胞株购自于中国科学院典藏生物细胞资源中心。细胞培养于含有 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中,放置于 37℃ 含有 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。

RNA 提取试剂 TRIzol (Invitrogen 公司,美国),逆转录试剂盒 PrimeScript™ RT Master Mix、PCR 试剂盒 SYBR Green PCR Kit (南京碧云天科技有限公司),CCK-8 试剂盒(同仁公司,日本)。Transwell 小室(Corning 公司,美国),Matrigel 基质胶(BD 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取和实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)

肺癌及癌旁组织、术前及术后血浆采用 TRIzol 法提取总 RNA 后反转录为 cDNA,利用美国 Applied Biosystems 公司的 ABI7900 快速实时 PCR 系统进行基因扩增。条件为 95℃ 5 min,然后 94℃ 15 s,55℃ 30 s,进行 40 个循环扩增。GAPDH 作为 TPTEP1 的内参基因。采用 2^{-ΔΔCT} 定量法(C_T 表示循

环阈值,ΔC_T=C_{TTPTEP1}-C_{TGAPDH}),计算 TPTEP1 的相对表达量。TPTEP1 引物序列:正向 5'-GCTTCCCCTTTC-CAGAGAGC-3',反向 5'-CGGGCGACTGTAGTGTT-GTT-3';GAPDH 引物序列:正向 5'-CTCACCGGATG-CACCAATGTT-3';反向 5'-CGCGTTGCTCACAAT-GTTCAT-3'。

1.2.2 细胞转染和分组

过表达 TPTEP1 慢病毒载体(LV-TPTEP1)及其对照组(LV-Control)由上海吉凯生物技术公司合成。A549 细胞培养至适合密度后分两组利用 polybrene 试剂分别转染 LV-TPTEP1 或 LV-Control(称为 TPTEP1 组和 Control 组)。培养 24 h 后,收集细胞提取 RNA,利用 qRT-PCR 验证转染效率。

1.2.3 CCK-8 实验

A549 细胞株实验组和对照组分别培养后接种到 96 孔板,每孔约 3 000 个细胞,正常培养 24、48、72、96 h,在不同时间点选择不同复孔(n>4)分别加入 CCK-8 试剂,避光培养 2 h 后测量各孔在 450 nm 处的吸光度。

1.2.4 Transwell 侵袭和迁移实验

采用 8 μm 孔径的 Transwell 小室进行实验。实验组和对照组 A549 细胞培养消化后用无血清 RPMI1640 培养液重悬。侵袭实验时,将小室上层均匀涂覆 Matrigel 基质胶;迁移实验时不做涂覆。然后在小室上层加入 200 μL 无血清细胞悬液,小室下层中加 500 μL 含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液,培养箱中恒温培养 36 h。取出 Transwell 小室,甲醇固定后用 0.1% 结晶紫染色 20 min,棉签擦去小室上层余留细胞,显微镜下进行随机视野拍照后计数。

1.3 统计学方法

应用 SPSS19.0 和 Graphpad Prism 7.0 进行数据统计学分析,计数资料采用卡方检验;符合正态分布的计量资料,两组比较采用 t 检验;多组比较采用单因素方差分析。采用卡方检验对 TPTEP1 表达水平与患者临床特征的关系进行分析,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

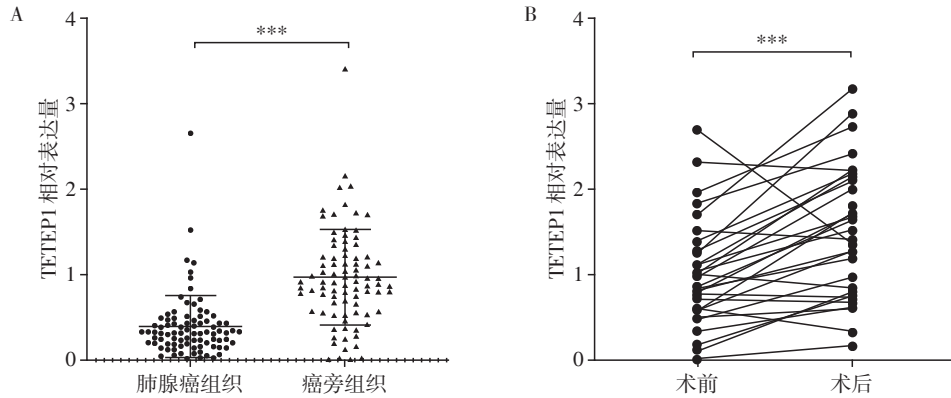
2.1 TPTEP1 在肺腺癌患者组织及血浆中的表达水平比较

选取了 86 例接受肺腺癌手术患者的肿瘤组织及癌旁组织样本,采用 qRT-PCR 检测了组织中 TPTEP1 的相对表达水平。实验结果如图 1A 所示,

TPTEP1在肺腺癌组织中的表达水平明显低于癌旁组织($P < 0.001$)。同时,还收集了33例肺腺癌患者手术前及手术后(>1个月)的血浆样本,检测了其相对的TPTEP1表达量,肺腺癌患者术后血浆中的TPTEP1水平较术前明显升高($P < 0.01$,图1B)。

2.2 肺腺癌中TPTEP1表达量与肺腺癌患者临床特征的相关性

根据肺腺癌患者组织中TPTEP1的表达中位数,将肺腺癌病例分为TPTEP1高表达和低表达组(图2)。结合临床资料分析,发现TPTEP1的异常表



A:与癌旁组织相比,TPTEP1在肺腺癌组织中表达降低;B:术后患者血浆中TPTEP1水平较术前明显升高。两组比较,*** $P < 0.001$ 。

图1 TPTEP1在肺腺癌组织及血浆中的表达

Figure 1 Relative expression of TPTEP1 in tumor tissues and plasma of lung adenocarcinoma patients

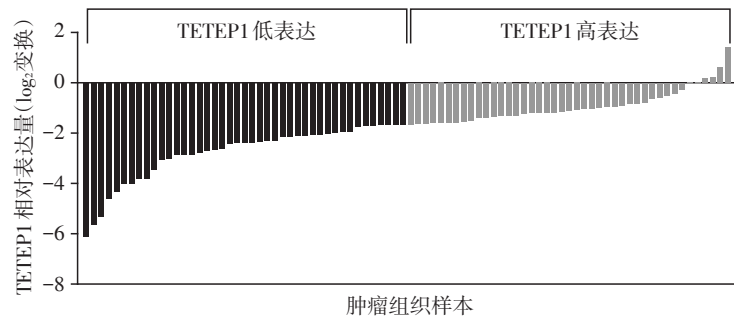


图2 TPTEP1在肺腺癌组织中的高低表达分组(log₂变换)

Figure 2 TPTEP1 High and low expression group in lung adenocarcinoma tissue (log₂ change)

达与肺腺癌患者的年龄、性别、吸烟史、患肺侧别等均没有明显相关性,而与肿瘤的大小、分化程度、淋巴结转移、TNM分期等相关($P < 0.05$,表1)。分析了TCGA数据库中TPTEP1与肺腺癌预后的相关性,发现,TPTEP1的表达量高低与肺腺癌患者的总生存期和无病生存期没有明显相关性(图3, $P > 0.05$)。

2.3 肺腺癌细胞中TPTEP1的表达量及转染效率

检测5个肺腺癌细胞系中TPTEP1相对正常肺上皮细胞系BEAS-2B的表达量后发现,TPTEP1在5个肺腺癌细胞系中均低表达($P < 0.05$,图4A)。选取表达量适中的A549细胞系,利用慢病毒载体过表达TPTEP1后,检测发现TPTEP1组TPTEP1表达相较于对照组明显升高($P < 0.001$,图4B)。

2.4 TPTEP1抑制肺腺癌细胞的增殖、侵袭和迁移能力

对过表达后的A549细胞进行CCK-8实验,以研

究TPTEP1对肺腺癌细胞增殖的影响。如图5A所示,过表达TPTEP1后A549细胞的增殖能力较对照组明显降低($P < 0.01$)。Transwell侵袭和迁移实验说明上调TPTEP1表达后,A549细胞的侵袭和迁移能力被极大地抑制了($P < 0.01$ 和 $P < 0.001$,图5B-E)。这些实验说明TPTEP1可以抑制肺腺癌细胞的增殖和转移能力。

3 讨论

肺腺癌的发病率与日俱增,由于其具有容易发生早期转移的特点,因此其预后表现不佳^[8-9]。随着基因组学的研究发展,包括miRNA、lncRNA在内的越来越多的分子被发现,它们可以成为提示肿瘤进展以及预后的潜在靶标,并且可以成为潜在的生物靶向治疗的靶点^[10-11]。在肺腺癌中,很多lncRNA被证实扮演着“癌基因”或者“抑癌基因”的作用,例如

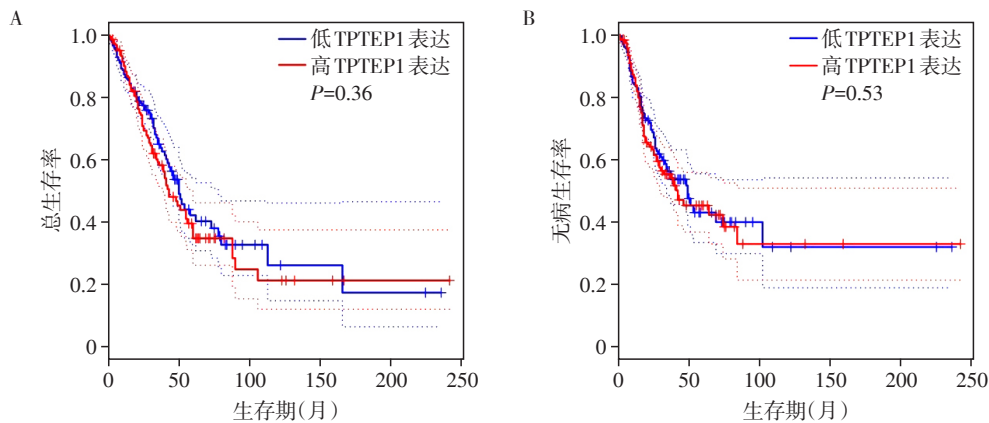
表 1 TPTEP1与肺腺癌患者的临床病理特征的关系
Table 1 Correlation between TPTEP1 expression and clinical characteristics of lung adenocarcinoma
[n(%)]

临床特征	总数	TPTEP1 表达		χ^2 值	P值
		低表达	高表达		
年龄				1.70	0.193
<60岁	48	27(56.3)	21(43.7)		
>60岁	38	16(42.1)	22(57.9)		
性别				0.74	0.388
男	42	19(45.2)	23(54.8)		
女	44	24(54.5)	20(45.5)		
吸烟史				2.30	0.130
有	39	23(59.0)	16(41.0)		
无	47	20(42.6)	27(57.4)		
侧别				0.75	0.387
左侧	46	25(54.3)	21(45.7)		
右侧	40	18(45.0)	22(55.0)		
肿瘤大小				16.13	<0.001
<3 cm	54	18(33.3)	36(66.7)		
>3 cm	32	25(78.1)	7(21.9)		
肿瘤分化				6.53	0.011
中低分化	27	19(70.4)	8(29.6)		
高分化	59	24(40.7)	35(59.3)		
淋巴结转移				9.53	0.002
无	61	24(39.3)	37(60.7)		
有	25	19(76.0)	6(24.0)		
TNM分期				8.51	0.014
I	49	18(36.7)	31(63.2)		
II	28	18(64.3)	10(35.7)		
III+IV	9	7(77.8)	2(22.2)		

腺癌的增殖转移,并且与肺癌组织中 Bcl-2 的表达相关。相反, lncRNA MEG3 可以抑制肺腺癌细胞的增殖,并且促进其凋亡,这种作用可能是通过影响 p53 的蛋白表达来实现。另外, LINC01234、LINC00312、LINC00152、LINC00426 和 lncRNA CAR10 等长链非编码 RNA 在肺腺癌中都表现出了或促进或抑制肿瘤发生发展及转移等作用^[12-18]。

TPTEP1 位于人类染色体 22q11.1,在急性髓系白血病中可以和 miR-1303 相互作用,抑制急性髓系白血病细胞的增殖;在肝癌中,TPTEP1 可以逆转由于 miR-454-3p 引起的 DLG5 表达下降,进而表现出抑制肝癌生长及肺转移的作用;另外,TPTEP1 通过 miR-106a-5p 介导的 p38 MAPK 信号来抑制胶质瘤的肿瘤干性和放疗抗性^[19-21]。这些研究都证实了 TPTEP1 可以作为抑癌基因参与肿瘤的生物过程。本研究发现 TPTEP1 在肺腺癌组织中的表达量要明显低于正常组织,其表达量与肺腺癌患者的肿瘤大小、分化程度、淋巴结转移及 TNM 分期存在着明显负相关性。本研究还检测了 TPTEP1 在肺腺癌患者术前与术后血浆中的表达量,发现经过手术治疗的肺腺癌患者术后血浆中 TPTEP1 表达量比术前显著升高。这些都说明 TPTEP1 可能作为一个抑癌因子在肺腺癌中发挥作用。此外,利用肺腺癌细胞系过表达 TPTEP1,发现 TPTEP1 水平增高可以明显抑制肺腺癌细胞的增殖和侵袭转移能力。这些研究与之之前 TPTEP1 在其他肿瘤中起抑制肿瘤发展的作用的结论相一致。现行的肿瘤诊断方式主要依赖于影像学和中晚期出现的症状,而现行的肺腺癌根治方式主要还是依靠手术,而手术属于从局部的角度去对肿瘤进行机械性的切除^[22]。结合本研究

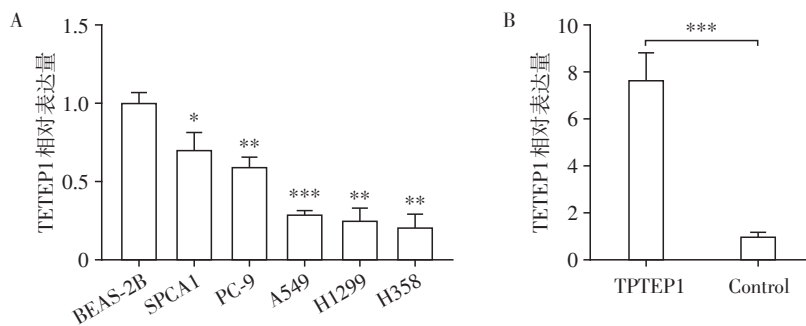
肺腺癌转移相关转录因子 1(MALAT 1)明显促进肺



A: TPTEP1 表达水平与肺腺癌患者总生存率的关系; B: TPTEP1 表达水平与肺腺癌患者无病生存率的关系。

图 3 TPTEP1 表达水平与肺腺癌患者预后的关系 (TCGA 数据库)

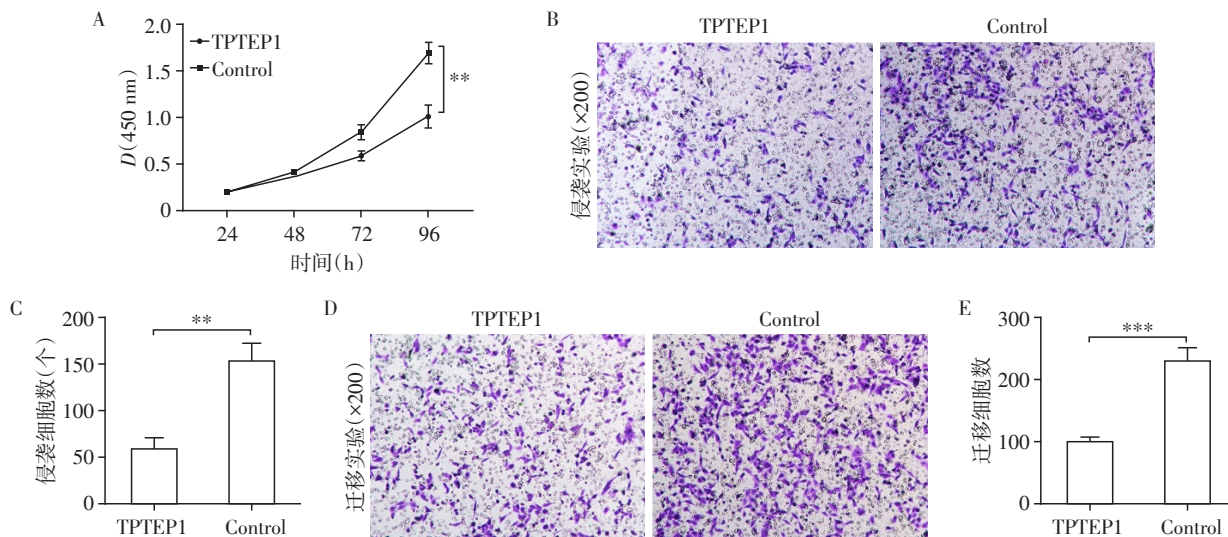
Figure 3 The relationship between the expression level of TPTEP1 and the prognosis of patients with lung adenocarcinoma (TCGA Database)



A:与正常肺上皮细胞(BEAS-2B)相比,TPTEP1在肺腺癌细胞(SPCA1、PC-9、A549、H1299、H358)中表达降低;B:慢病毒明显上调肺腺癌细胞A549中的TPTEP1的表达量。与对照组(BEAS-2B/Control)比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

图4 TPTEP1在肺腺癌细胞中的表达

Figure 4 Relative expression of TPTEP1 in lung adenocarcinoma cells



A:TPTEP1的过表达明显抑制了肺腺癌细胞A549的生长;B-E:TPTEP1的过表达明显抑制了肺腺癌细胞A549的侵袭(B、C)和迁移(D、E)能力。两组比较,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

图5 过表达TPTEP1抑制肺腺癌细胞的增殖和转移

Figure 5 Overexpression of TPTEP1 inhibited cell proliferation, invasion and migration of lung adenocarcinoma cells

结果,检测组织及血液中TPTEP1表达,再结合临床资料及影像等方法综合分析,可能对肺腺癌的发生发展作出预测。然而,分析了相关数据库,发现TPTEP1表达量的高低与肺腺癌患者的预后没有明显相关性,这可能是由于肿瘤的调控涉及复杂网络状调控系统,目前的随访数据仍有一定局限性,后续也会针对相关临床病例的预后进行预后分析,继续探讨TPTEP1与肺腺癌预后的相关性。

当然,本研究依然存在着许多不完善之处:①样本量不足;②研究涉及的肺腺癌患者的预后数据仍然在进一步的随访和统计之中;③针对TPTEP1在肺腺癌中作用机制研究仍需要进一步深入研究。

总而言之,本研究初步阐述了lncRNA TPTEP1在肺腺癌中低表达,且与肿瘤的大小、分化程度、淋巴

结转移相关。更加全面深入地研究TPTEP1在肺腺癌中的作用机制将有助于显现TPTEP1作为潜在肺腺癌诊断治疗靶标的临床意义。

[参考文献]

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer Statistics, 2021[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(1): 7-33
- [2] RAMI-PORTA R, ASAMURA H, TRAVIS W D, et al. Lung cancer - major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual [J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(2): 138-155
- [3] HU Q, YE Y, CHAN L C, et al. Oncogenic lncRNA down-regulates cancer cell antigen presentation and intrinsic tumor suppression[J]. Nat Immunol, 2019, 20(7): 835-851
- [4] LU Y, ZHAO X, LIU Q, et al. lncRNA MIR100HG-de-

- rived miR-100 and miR-125b mediate cetuximab resistance via Wnt/beta-catenin signaling[J]. *Nat Med*, 2017, 23(11):1331-1341
- [5] WU W, ZHAO Y, GAO E, et al. LncRNA DLEU2 accelerates the tumorigenesis and invasion of non-small cell lung cancer by sponging miR-30a-5p[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(1):441-450
- [6] DONG Y, WANG Q, SUN J, et al. Long non-coding RNA TPTEP1 exerts inhibitory effects on hepatocellular carcinoma by impairing microRNA-454-3p-mediated DLG5 downregulation[J]. *Dig Liver Dis*, 2022, 54(2):268-279
- [7] TANG Z, LI C, KANG B, et al. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(1):98-102
- [8] CHEN J, YANG H, TEO A S M, et al. Genomic landscape of lung adenocarcinoma in East Asians[J]. *Nat Genet*, 2020, 52(2):177-186
- [9] CASO R, SANCHEZ-VEGA F, TAN K S, et al. The underlying tumor genomics of predominant histologic subtypes in lung adenocarcinoma[J]. *J Thorac Oncol*, 2020, 15(12):1844-1856
- [10] BEERMANN J, PICCOLI M T, VIERECK J, et al. Non-coding RNAs in development and disease: background, mechanisms, and therapeutic approaches[J]. *Physiol Rev*, 2016, 96(4):1297-1325
- [11] ADAMS B D, PARSONS C, WALKER L, et al. Targeting noncoding RNAs in disease[J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(3):761-771
- [12] SCHMIDT L H, GORLICH D, SPIEKER T, et al. Prognostic impact of Bcl-2 depends on tumor histology and expression of MALAT-1 lncRNA in non-small-cell lung cancer[J]. *J Thorac Oncol*, 2014, 9(9):1294-1304
- [13] CHEN Z, CHEN X, LEI T, et al. Integrative analysis of NSCLC identifies LINC01234 as an oncogenic lncRNA that interacts with HNRNPA2B1 and regulates miR-106b biogenesis[J]. *Mol Ther*, 2020, 28(6):1479-1493
- [14] PENG Z, WANG J, SHAN B, et al. The long noncoding RNA LINC00312 induces lung adenocarcinoma migration and vasculogenic mimicry through directly binding YBX1[J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1):167
- [15] CHEN Q N, CHEN X, CHEN Z Y, et al. Long intergenic non-coding RNA 00152 promotes lung adenocarcinoma proliferation via interacting with EZH2 and repressing IL24 expression[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1):17
- [16] GE X, LI G Y, JIANG L, et al. Long noncoding RNA CAR10 promotes lung adenocarcinoma metastasis via miR-203/30/SNAI axis[J]. *Oncogene*, 2019, 38(16):3061-3076
- [17] LI H, MU Q, ZHANG G, et al. Linc00426 accelerates lung adenocarcinoma progression by regulating miR-455-5p as a molecular sponge[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(12):1051
- [18] LU K H, LI W, LIU X H, et al. Long non-coding RNA MEG3 inhibits NSCLC cells proliferation and induces apoptosis by affecting p53 expression[J]. *BMC Cancer*, 2013, 13:461
- [19] DING H, LIU J, ZOU R, et al. Long non-coding RNA TPTEP1 inhibits hepatocellular carcinoma progression by suppressing STAT3 phosphorylation[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1):189
- [20] TANG T, WANG L X, YANG M L, et al. LncRNA TPTEP1 inhibits stemness and radioresistance of glioma through miR106a-5p mediated P38 MAPK signaling[J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(6):4857-4867
- [21] LI L, ZHAO W. The mutual regulatory loop between TPTEP1 and miR-1303 in leukemogenesis of acute myeloid leukemia[J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1):260
- [22] 朱焱宁,李志华,何志成,等. 胸腔镜下肺亚段切除术的临床对比研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2020, 40(6):870-874

[收稿日期] 2021-12-13

(本文编辑:唐震)