

TTC9A 在泛癌中的表达水平与多种癌症的预后和免疫微环境相关

姚倚钠¹, 刘佳¹, 周想军¹, 刘泽宇¹, 邱士珍¹, 何颖政¹, 周雪琼^{1,2}

¹南方医科大学公共卫生学院职业卫生学系, ²广东省热带病研究重点实验室, 广东 广州 510515

摘要:目的 确定四肽重复蛋白 9A(TTC9A)在泛癌中的基因表达及其预后价值,明确其与免疫浸润的关系。方法 R语言分析癌症基因组图谱及GTEX网站中TTC9A在不同肿瘤组织与正常组织中的表达及其与各种癌症的预后、DNA甲基化、肿瘤突变负荷、微卫星不稳定性关系;应用TIMER和xCell比较TTC9A表达与免疫浸润的关系;运用免疫印迹法与RT-qPCR检测TTC9A在4种癌症中的表达情况。结果 生信结果显示与正常组织相比,TTC9A在多种肿瘤中mRNA表达水平升高,少数肿瘤中下调($P<0.05$)。实验结果显示在肺癌、结肠癌和肝癌中,TTC9A的蛋白和mRNA水平均较正常细胞高,与泛癌分析结果一致;而在膀胱癌细胞系中的表达下降,与泛癌分析结果相反。在头颈鳞状细胞癌、肾透明细胞癌、肾乳头状细胞癌、低级别胶质瘤、恶性间皮瘤、子宫内膜癌等肿瘤中,TTC9A的高表达与更好的总生存期、疾病特异性生存期、无进展间期密切相关($P<0.05$);而在肺腺癌、胰腺癌、肾上腺癌、直肠腺癌中,高表达TTC9A与更差的总生存期、疾病特异性生存期、无进展间期密切相关($P<0.05$)。在多形性胶质细胞瘤、低级别胶质瘤、葡萄膜黑色素瘤、卵巢浆液性囊腺癌中,TTC9A高甲基化患者预后较好($P<0.05$);但是,在宫颈鳞状细胞癌和宫颈内腺癌、头颈部鳞状细胞癌、肺鳞状细胞癌、肾上腺癌、子宫内膜癌中,TTC9A高甲基化患者预后较差($P<0.05$)。TTC9A基因表达分别与7种和4种癌症类型的TMB和MSI显著相关($P<0.05$)。在大多数癌症类型中,TTC9A与免疫细胞的浸润水平显著相关($P<0.05$),尤其B细胞、CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和树突状细胞。结论 TTC9A可作为多种癌症的预后标志物,且与肿瘤突变负荷、微卫星不稳定性及免疫细胞浸润密切相关。

关键词:TTC9A;泛癌分析;免疫微环境;预后

A pan-cancer analysis of TTC9A expression level and its correlation with prognosis and immune microenvironment

YAO Yina¹, LIU Jia¹, ZHOU Xiangjun¹, LIU Zeyu¹, QIU Shizhen¹, HE Yingzheng¹, ZHOU Xueqiong^{1,2}

¹Department of Occupational Health and Medicine, ²Guangdong Provincial Key Laboratory of Tropical Disease Research, School of Public Health, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To investigate the expression level of tetratricopeptide repeat protein 9A in tumors and its association with the patients' prognosis and immune infiltration. **Methods** TTC9A expression in different tumor tissues and its association with prognosis, DNA methylation, tumor mutation burden (TMB), and microsatellite instability (MSI) were analyzed based on data from TCGA and GTEx. TIMER and xCell were used to analyze the relationship between TTC9A expression and immune infiltration. Western blotting and RT-qPCR were used to detect the expression of TTC9A in 4 types of cancer cell lines. **Results** TTC9A expressions were significantly increased in many tumors and down-regulated in a few cancer types ($P<0.05$). Western blotting and RT-qPCR showed that TTC9A expressions were elevated in lung, colon and liver cancer cells but decreased in bladder cancer cells. In head and neck squamous cell carcinoma, renal clear cell carcinoma, renal papillary cell carcinoma, low-grade glioma, malignant mesothelioma, and endometrial carcinoma tumors, a high expression of TTC9A was strongly correlated with better overall survival (OS), disease-specific survival (DSS), and progression-free interval (PFI) ($P<0.05$), but was correlated with worse OS, DSS, and PFI in lung adenocarcinoma, pancreatic adenocarcinoma, adrenal carcinoma, and rectal adenocarcinoma ($P<0.05$). TTC9A hypermethylation was associated with a more favorable prognosis of glioblastoma multiforme, low-grade glioma, uveal melanoma, and ovarian plasmacytoid cystadenocarcinoma ($P<0.05$) but with poor prognosis of squamous cell carcinoma of the uterine cervix and intracervical adenocarcinoma, squamous cell carcinoma of head and neck, squamous cell carcinoma of the lungs, adrenal carcinoma, and endometrial carcinoma ($P<0.05$). In most of the cancer types, TTC9A was significantly correlated with the level of immune cell infiltration ($P<0.05$). **Conclusion** TTC9A can be used as a prognostic marker for a variety of cancers and is strongly associated with TBM, MSI and immune cell infiltration.

Keywords: TTC9A; pan-cancer analysis; immune microenvironment; prognosis

收稿日期:2023-09-26

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金(81903350);广东省基础与应用基础研究基金(2021A1515010007)

Supported by Natural Science Foundation for the Youth (NSFY) of China (81903350).

作者简介:姚倚钠,在读硕士研究生,E-mail: yaoena2021@163.com

通信作者:周雪琼,博士,副研究员,E-mail: xue4131@163.com

癌症因其高发病率和死亡率对人类健康构成严重威胁^[1]。然而,随着新发病例的不断增加,癌症的负担会持续恶化^[1]。传统治疗方法包括手术、放疗和化疗,然而,这些治疗伴随着严重的并发症,并且对晚期患者无效,患者的预后和生存率仍不理想^[2]。近几年来,泛癌分析的出现为癌症的预防、诊断和治疗提供了新的思路^[3]。

泛癌研究的目的在于发现那些会促进肿瘤发生的基因,从基因的角度出发,找到其与癌症之间的关联^[3]。2012年,癌症基因组图谱启动了泛癌分析项目,项目收集了来自身体不同部位的数千名原发性肿瘤患者的数据,涵盖12种肿瘤类型,包括基因组、表观基因组以及基因和蛋白质表达数据^[4]。2020年,国际癌症基因组联盟进行了全基因组的泛癌分析^[5],以上两个项目为泛癌研究的数据来源奠定了基础。如今,泛癌研究正从基础研究朝向临床发展^[6]。

TTC9家族是一类含有四肽重复(TPR)结构域的蛋白质家族,包括TTC9A、TTC9B和TTC9C。1996年,Nagase等^[7]通过对KG-1细胞和脑组织的cDNA克隆测序,首次报道了四肽重复蛋白9A(TTC9A),当时被称为假设蛋白KIAA0227。TTC9A蛋白质的羧基末端含有3个四肽重复结构域,分别位于氨基酸位置57-90aa、128-161aa和164-197aa^[8]。这些TPR结构域通常形成一个反平行的 α 螺旋发夹,形成一个具有凹槽表面的、灵活的、可变的结构域,用于各种生物过程中蛋白质相互作用,包括细胞周期控制、转录、蛋白质折叠和类固醇受体信号传导^[9]。2006年,Cao等^[8]确定TTC9A基因位于染色体14q24.2,该基因编码222个氨基酸的蛋白质,相对分子质量约为244 000。有研究表明^[8]TTC9A在脑中的表达最高,其次是心脏,在所有检测的组织中诸如结肠、肝脏、肾脏、肺、胰脏等均有广泛表达。

现有研究表明^[10-12],TTC9A在乳腺癌的增殖和凋亡中发挥调节作用,从而促进癌细胞的侵袭和转移。Cao等^[10]通过孕酮受体转染乳腺癌细胞系MDA-MB-231,发现TTC9A的表达受到孕酮的调节。同时,他们还在另一个细胞系中(MCF-7)发现TTC9A的水平受到孕激素、雌激素和生长因子的调节。通过酵母二杂交试验、GST Pull-down试验和免疫共沉淀实验,他们确定了原肌球蛋白Tm5NM-1是TTC9A的伴侣蛋白,二者相互作用能够促进原肌球蛋白微丝的稳定,并且可能促进癌细胞的侵袭和转移。Shrestha等^[11]的研究通过建立TTC9A基因敲除小鼠模型,探讨了TTC9A基因失活的后果。结果显示,TTC9A缺陷的乳腺对雌激素治疗更为敏感,导致乳腺导管延长、导管分支增多以及雌激素靶基因诱导增加,提示TTC9A通过负反馈机制对雌激素功能起到负调节作用。Lim等^[12]在此基础上进一步研究了TTC9A与雌激素的功能性相互作用,利用TTC9A^{-/-}小鼠模型分析了TTC9A在小鼠焦虑行为中的作用。结果表明,相较于野生型TTC9A^{+/+}小鼠,TTC9A^{-/-}小鼠表现出更多的焦虑样行为。尽管已有文献报道了TTC9A与乳腺癌的关系^[10,11],但其在其他肿瘤中的表达、功能以及与预后的关系仍不明确。目前尚未有关于TTC9A与各种癌症之间关联的泛癌研究,并

且尚未有文献报道TTC9A与肿瘤免疫微环境的关系。本研究通过对各种数据库的数据挖掘分析,综合分析了TTC9A表达水平及其与不同类型恶性肿瘤预后的关系,并探讨了TTC9A表达与癌症的微卫星不稳定性(MSI),肿瘤突变负荷(TMB),DNA甲基化和免疫细胞浸润水平之间的潜在关联。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人正常肺上皮细胞(BEAS-2B)、人非小细胞肺癌细胞(A549)、人输尿管上皮永生生化细胞(SV-HUC-1)、人膀胱癌细胞(T24)、人正常肝细胞(LO2)、人肝癌细胞(HepG2)、人正常肠上皮细胞(NCM-460)和人结肠癌细胞(HCT-116)(中国科学院上海细胞库)。

1.1.2 试剂 DMEM培养基(Gibco)、胎牛血清(Gibco)、Bradford蛋白浓度测定试剂盒(去垢剂兼容形,碧云天)、TRIzol(AG)、逆转录试剂盒(AG)、SYBR Green实时荧光定量PCR试剂盒(Yeasen)。兔抗人TTC9A抗体从景杰生物公司定制、鼠抗人 β -actin抗体(Proteintech)。

1.2 方法

1.2.1 数据集下载及数据处理 从UCSC Xena(<https://xena.ucsc.edu/>)数据库下载癌症基因组图谱,该数据库包含共33种不同肿瘤类型的表达谱。从GTEx(<https://commonfund.nih.gov/GTEx>)网站下载31个正常组织的基因表达谱。利用R语言对两个数据库的数据进行联合分析,提取TTC9A的表达谱,并分析上述肿瘤组织及正常组织中TTC9A的表达情况。对TTC9A的表达水平进行log₂转化后进行统计分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。利用R语言包“ggpubr”绘制差异表达的小提琴图。

1.2.2 TTC9A在泛癌中的预后分析 从TCGA下载的样本中获取生存数据。总生存期(OS)、疾病特异性生存期(DSS)、无进展间期(PFI)被认为是探索TTC9A表达与患者预后之间相关性的指标。在生存分析方面,每种癌症类型都使用了Kaplan-Meier方法和对数秩检验。采用R语言survival包和survminer包绘制生存曲线, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

1.2.3 TTC9A DNA甲基化与预后的相关性 使用Kaplan-Meier生存分析进行TTC9A DNA甲基化与预后的相关性,包括OS,DSS,PFI,采用R语言survival包和survminer包绘制生存曲线, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

1.2.4 肿瘤突变负荷与微卫星不稳定分析 使用R语言包“TCGAbiolinks”下载TCGA中突变注释文件。每兆碱基组的体细胞变异数被定义为肿瘤突变负荷。利用R软件包maftools的tmb函数计算肿瘤的肿瘤突变负

荷,然后整合样本的肿瘤突变负荷和基因表达数据,结果以热图的形式呈现, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

1.2.5 TTC9A 表达与免疫细胞浸润的相关性 使用TIMER和xCell两种算法生成了多种癌症中免疫评分与TTC9A基因表达的Spearman相关分析热图。热图中的横轴代表不同类型的癌症,纵轴代表不同的免疫评分,不同的颜色代表相关系数。

1.2.6 免疫印迹检测 采用RIPA裂解液(含有蛋白酶和磷酸化酶抑制剂)提取细胞的总蛋白,使用Bradford蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白质浓度,经SDS-PAGE凝胶电泳后放置于转膜仪进行转膜,再用5%BSA封闭2h,孵育一抗(TTC9A, 1:250或 β -actin, 1:5000),4℃孵育过夜,TBST清洗3次,5min/次。然后孵育荧光标记二抗(抗小鼠/兔,Invitrogen),室温孵育1h,TBST清洗3次,5min/次。采用LICOR Odyssey红外荧光扫描成像系统(BioRad)采集图片,以内参蛋白 β -actin为基准,使用Image J软件计算目的蛋白的相对表达量。

1.2.7 RT-qPCR 检测 使用TRIzol法对细胞总RNA进行提取,利用反转录试剂盒和荧光定量qPCR试剂盒分别进行反转录和定量分析,内参基因为ACTB。本实验所用引物由北京睿博兴科生物技术公司合成(表1)。

1.2.8 统计学分析 采用R语言(v 4.2.2)和SPSS 22.0软件进行统计学分析。计量资料的比较采用独立样本 t 检验和单因素方差分析,计数资料采用Spearman相关分析,采用Kaplan-Meier曲线和Log-rank检验比较生存差异。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

表1 qRT-PCR检测基因表达的引物序列

Tab.1 Primer sequence for qRT-PCR

Gene	Primer sequence 5'-3'
TTC9A	F: CTCGGAGGAGCAGAGCAA
	R: TGTCATAGTCCCAAGGTG
ACTB	F: CACCACACCTTCTACAATGAGCTGC
	R: ACAGCCTGGATAGCAACGTACATGG

F: Forward primer; R: Reverse primer.

2 结果

2.1 泛癌组织中TTC9A mRNA表达水平

与癌旁正常组织相比,在多形成性胶质细胞瘤、头颈鳞状细胞癌、肾透明细胞癌和胸腺瘤等组织中,TTC9A基因表达水平明显降低($P<0.05$)。而在膀胱尿路上皮癌、乳腺浸润癌、宫颈鳞癌和宫颈腺癌、胆管癌、结肠癌、肾乳头状细胞癌、肝细胞癌、肺腺癌、直肠腺癌、甲状腺癌和子宫内膜癌组织中,TTC9A的RNA表达水平存在显著的组织特异性,其表达量最高的组织是食管,其次是扁桃体、阴道、唾液腺、输卵管和大脑皮层等,

表达量最低的则是卵巢(图1B)。

在肺腺癌细胞系A549、结肠癌细胞系HCT-116和肝癌细胞系HepG2中,TTC9A的蛋白水平和mRNA水平均比正常细胞升高($P<0.05$),这与泛癌分析结果一致。而与正常SV-HUC-1细胞相比,TTC9A在膀胱癌细胞系T24中的表达下调($P<0.05$),与泛癌分析结果相反(图1C~F)。

2.2 TTC9A在泛癌中的预后价值

2.2.1 TTC9A与OS的相关性分析 生存分析结果显示,TTC9A与多种癌症的预后价值相关。在头颈鳞状细胞癌、肾透明细胞癌、肾乳头状细胞癌、低级别胶质瘤、恶性间皮瘤、子宫内膜癌等癌症中,TTC9A高表达与较好的OS相关;然而,在肺腺癌、胰腺癌、肾上腺癌、直肠腺癌等癌症中,TTC9A高表达患者与较差的OS相关($P<0.05$,图2)。

2.2.2 TTC9A与DSS的相关性分析 在头颈鳞状细胞癌、肾透明细胞癌、肾乳头状细胞癌、低级别胶质瘤、恶性间皮瘤、子宫内膜癌等癌症中,TTC9A高表达患者的DSS延长;然而,在肺腺癌、胰腺癌、肾上腺癌、直肠腺癌等癌症中,TTC9A高表达患者的DSS缩短($P<0.05$,图3)。

2.2.3 TTC9A与PFI的相关性分析 TTC9A高表达在头颈鳞状细胞癌、肾透明细胞癌、肾乳头状细胞癌、低级别胶质瘤、恶性间皮瘤、子宫内膜癌等癌症中,其PFI延长;然而,在肺腺癌、胰腺癌、肾上腺癌、直肠腺癌等癌症中,TTC9A高表达其PFI缩短($P<0.05$,图4)。

2.3 TTC9A DNA甲基化水平对预后的影响

2.3.1 TTC9A与OS的相关性分析 TTC9A DNA甲基化水平与生存分析结果显示,在胶质母细胞瘤、低级别胶质瘤、葡萄膜黑色素瘤和卵巢癌中,TTC9A高甲基化具有保护作用,其OS延长;但是,在子宫颈癌、头颈鳞状细胞癌、肺鳞状细胞癌、肾上腺癌和子宫内膜癌中,TTC9A高甲基化是有害作用,其OS缩短($P<0.05$,图5)。

2.3.2 TTC9A与DSS的相关性分析 在胶质母细胞瘤、低级别胶质瘤、葡萄膜黑色素瘤和卵巢癌中,TTC9A高甲基化患者的DSS延长;但是,在子宫颈癌、头颈鳞状细胞癌、肺鳞状细胞癌、肾上腺癌和子宫内膜癌中,TTC9A高甲基化的DSS缩短($P<0.05$,图6)。

2.3.3 TTC9A与PFI的相关性分析 TTC9A高甲基化在胶质母细胞瘤、低级别胶质瘤、葡萄膜黑色素瘤和卵巢癌中,其PFI延长;但是,在子宫颈癌、头颈鳞状细胞癌、肺鳞状细胞癌、肾上腺癌和子宫内膜癌中,其PFI缩短($P<0.05$,图7)。

2.4 TTC9A与免疫浸润的相关性分析

TIMER数据库结果表明,TTC9A表达水平与多种肿瘤浸润免疫细胞显著相关,其中,TTC9A的表达与12

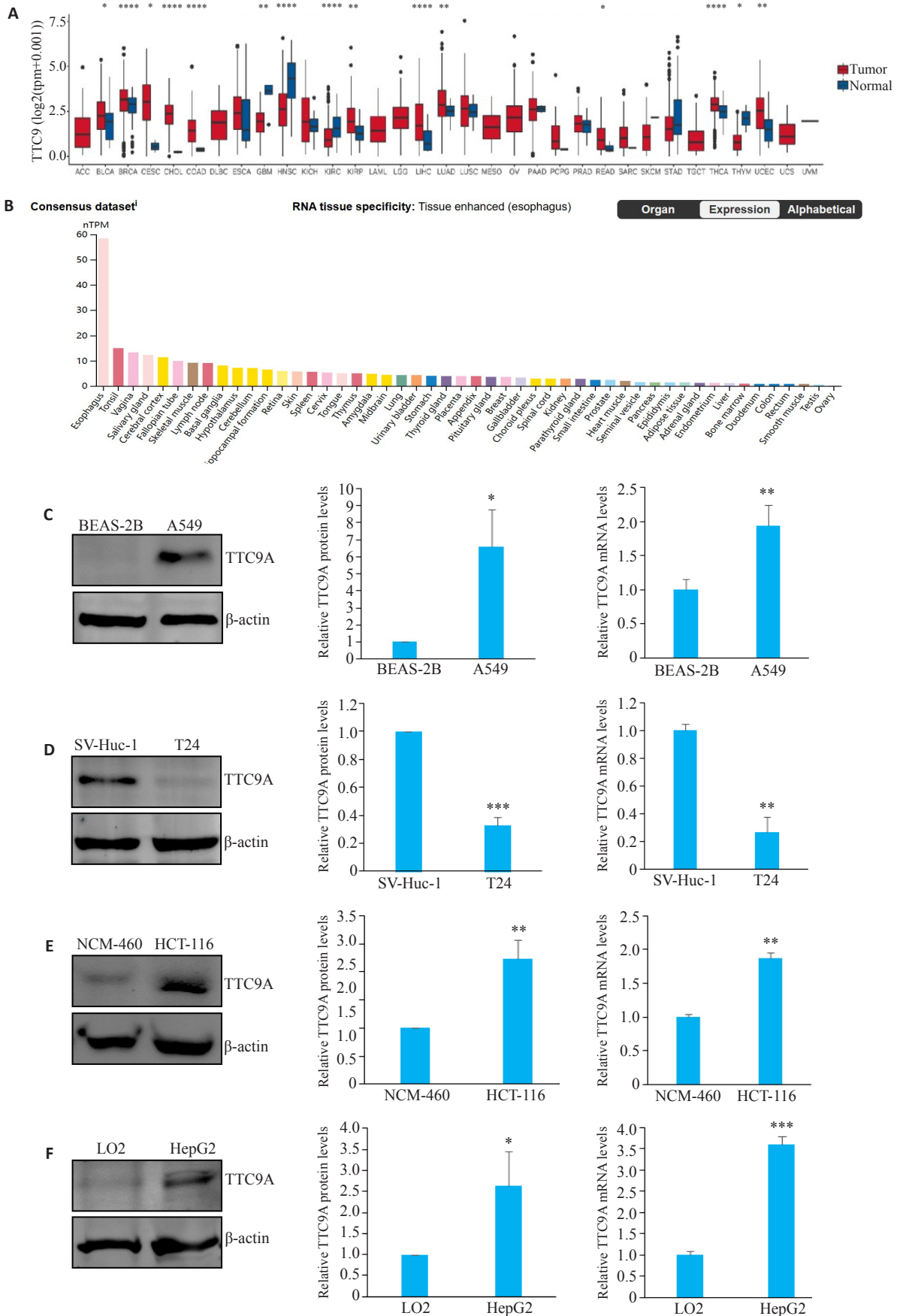


图1 泛癌中TTC9A的表达水平及其在人体各类器官的表达水平

Fig.1 Pan-cancer analysis of TTC9A expression level and its expression in different human organs. **A:** TTC9A mRNA expression in different tumor tissues and normal tissues. **B:** TTC9A mRNA expression levels in different human organs based on data from The Human Protein Atlas (www.proteinatlas.org). **C-F:** Levels of TTC9A in BEAS-2B, A549, SV-Huc-1, T24, NCM-460, HCT-116, LO2 and HepG2 cells detected by Western blotting and RT-qPCR. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs corresponding control group.

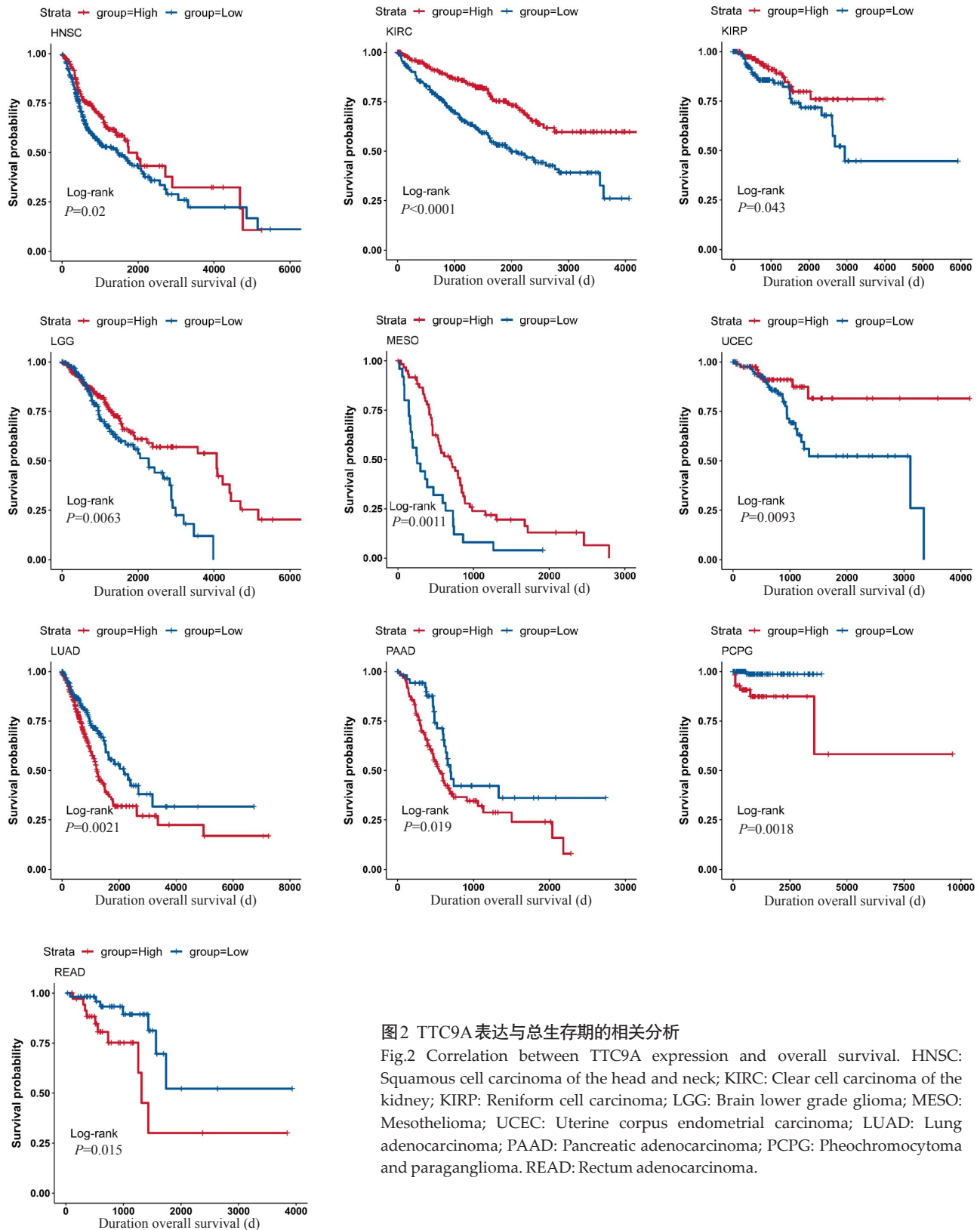


图2 TTC9A 表达与总生存期的相关分析

Fig.2 Correlation between TTC9A expression and overall survival. HNSC: Squamous cell carcinoma of the head and neck; KIRC: Clear cell carcinoma of the kidney; KIRP: Reniform cell carcinoma; LGG: Brain lower grade glioma; MESO: Mesothelioma; UCEC: Uterine corpus endometrial carcinoma; LUAD: Lung adenocarcinoma; PAAD: Pancreatic adenocarcinoma; PCPG: Pheochromocytoma and paraganglioma. READ: Rectum adenocarcinoma.

种癌症的B细胞、11种癌症的CD4⁺T细胞、9种癌症的CD8⁺T细胞、12种癌症的巨噬细胞、6种癌症的中性粒细胞和13种癌症的髓样树突状细胞呈正相关($P < 0.05$, 图8A)。xCell在线工具分析结果显示TTC9A表达在40种肿瘤中与不同类型免疫细胞亚型浸润相关,其中,幼稚B细胞、活化树突状细胞、静息肥大细胞、单核细

胞、静息记忆CD4⁺T细胞与这些肿瘤多数呈正相关($P < 0.05$);记忆B细胞、活化NK细胞、活化记忆CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞与这些肿瘤多数呈负相关($P < 0.05$)。此外,TTC9A的表达与巨噬细胞的不同亚群显示出不同的相关性。在乳腺浸润癌、头颈鳞状细胞癌、肾嫌色细胞癌、肾透明细胞癌、卵巢浆液性囊腺癌、葡萄膜黑色素瘤

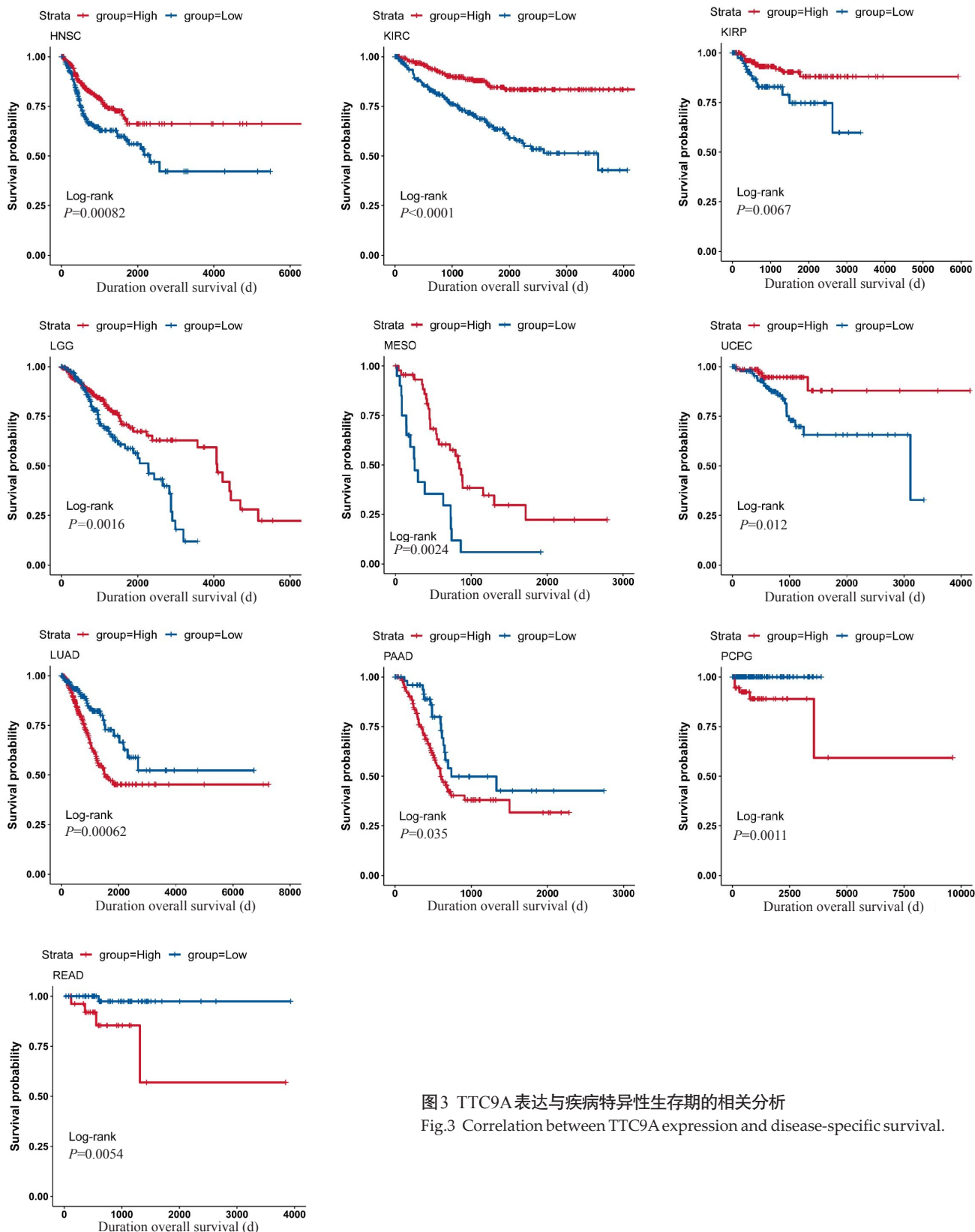


图3 TTC9A 表达与疾病特异性生存期的相关分析
 Fig.3 Correlation between TTC9A expression and disease-specific survival.

中,TTC9A 表达与M0巨噬细胞呈负相关,在肺腺癌、胰腺癌、前列腺癌中呈正相关($P<0.05$);在多形性胶质细胞瘤、肾乳头状细胞癌、肺鳞癌、胃癌、睾丸癌中,TTC9A 的表达与M1巨噬细胞呈负相关,在肾嫌色细胞癌、肝细胞肝癌、葡萄膜黑色素瘤中呈正相关($P<0.05$);而在乳腺浸润

癌、肾透明细胞癌、肺腺癌、卵巢浆液性囊腺癌、睾丸癌中,TTC9A 表达与M2巨噬细胞浸润水平呈正相关,但在头颈鳞状细胞癌、脑低级别胶质瘤、间皮瘤、前列腺癌呈负相关($P<0.05$,图8B)。

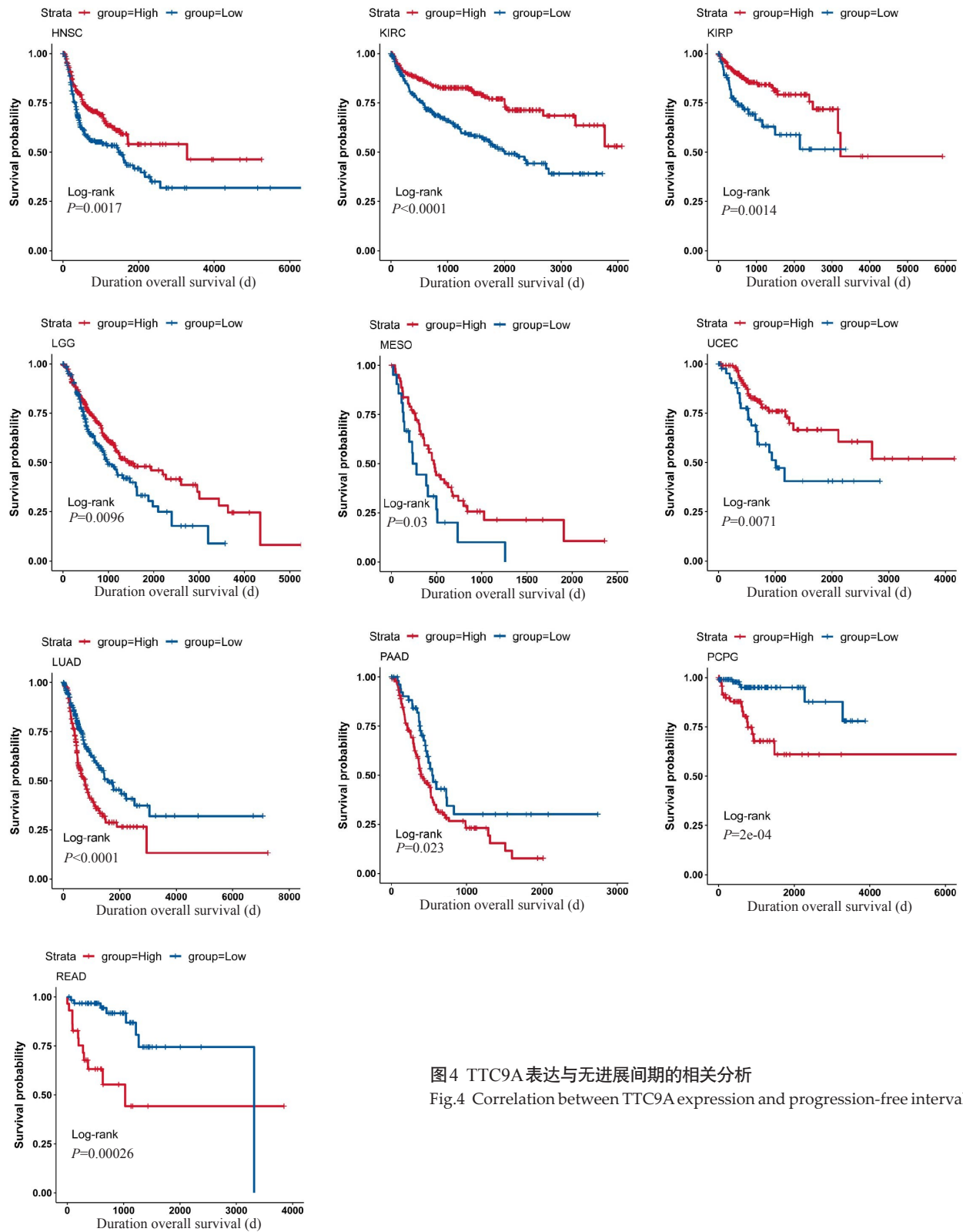


图4 TTC9A 表达与无进展间期的相关分析

Fig.4 Correlation between TTC9A expression and progression-free interval.

2.5 TTC9A 与肿瘤突变负荷、微卫星不稳定性 and 干细胞特性的相关性分析

TTC9A 的表达水平与食管癌、肾透明细胞癌、肺鳞癌、前列腺癌、胃癌和胸腺癌等的肿瘤突变负荷呈负相关,而与嗜铬细胞瘤和副神经节瘤为正相关($P<0.05$);与头颈鳞状细胞癌、皮肤黑色素瘤和胃癌等的微卫星不稳定性呈负相关,脑低级别胶质瘤中呈正相关($P<0.05$);

在其它肿瘤中未发现明显相关性。就干细胞特性而言, TTC9A 在弥漫性大B细胞淋巴瘤、肾嫌色细胞癌、肾透明细胞癌、肾乳头状细胞癌、肝细胞肝癌、肺腺癌、间皮瘤、卵巢浆液性囊腺癌、胰腺癌、皮肤黑色素瘤、睾丸癌、甲状腺癌、子宫肉瘤、葡萄膜黑色素瘤中均呈负相关,而在脑低级别胶质瘤中呈正相关($P<0.05$,图9)。

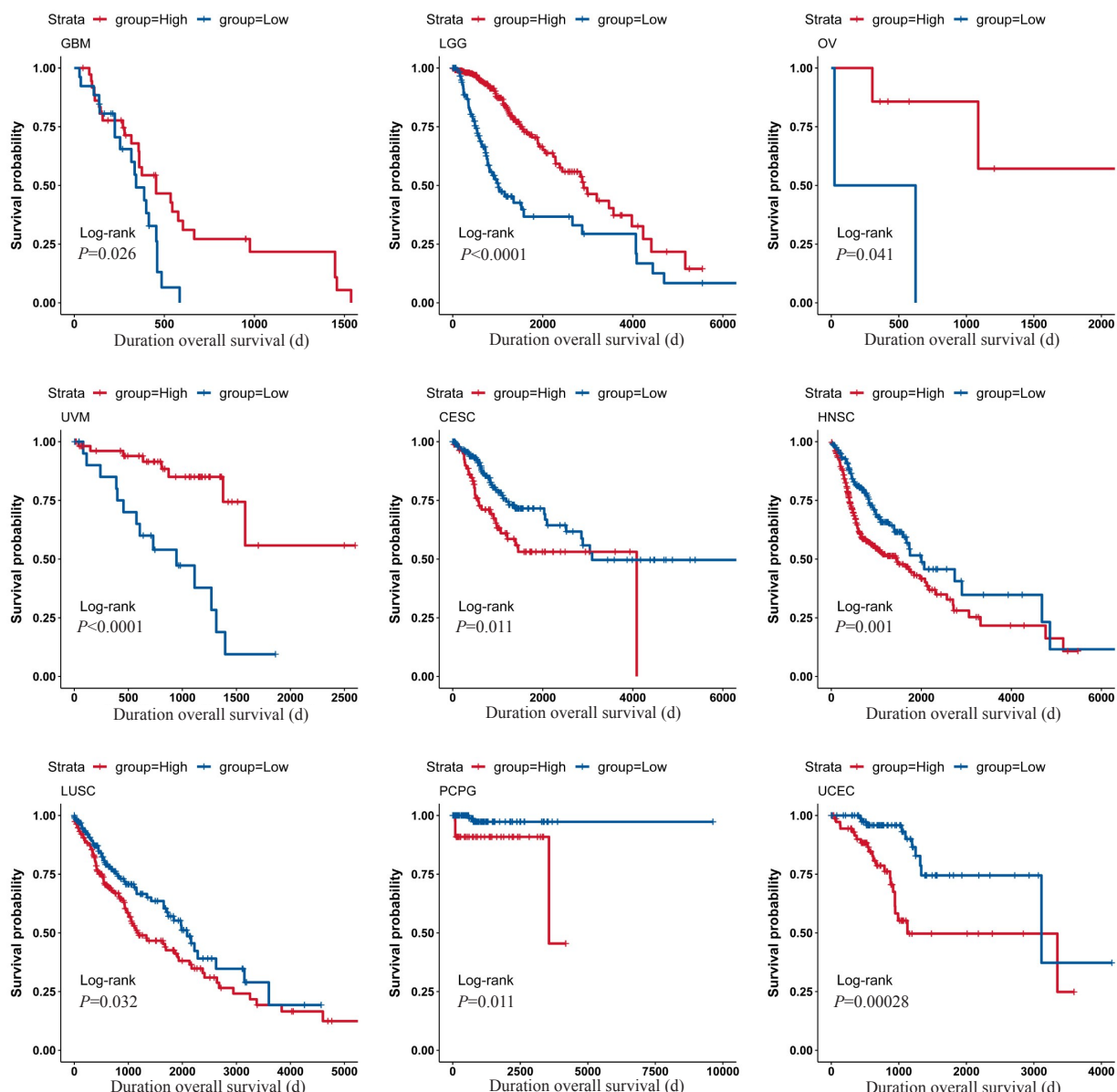


图5 TTC9A DNA 甲基化水平与总生存期的相关分析

Fig.5 Correlation between TTC9A methylation level and overall survival. GBM: Glioblastoma multiforme; OV: Ovarian serous cystadenocarcinoma; UVM: Uveal melanoma; CESC: Cervical squamous cell carcinoma and endocervical adenocarcinoma

3 讨论

泛癌分析是对多种癌症中的基因进行分析,对提取的基因表达的差异和相似性进行比较^[13,14]。从基因的角度出发,找到其与癌症之间的关联。了解多种癌症的基因组变化,从而进一步发现造成癌症的原因^[3]。经过我们对大量基因的综合分析和筛选,TTC9A 因其卓越的检测性能而引起了我们的注意。本结果表明,TTC9A 在 15 种癌症的肿瘤和正常组织之间表达存在显著差异。其中,在膀胱尿路上皮癌、乳腺浸润癌、宫颈鳞癌和腺癌、胆管癌、结肠癌、肾乳头状细胞癌、肝细胞肝癌、肺腺癌、直肠腺癌、甲状腺癌和子宫内膜癌中 TTC9A 的表达水平明显升高,而在多形成性胶质细胞

瘤、头颈鳞状细胞癌、肾透明细胞癌和胸腺癌中 TTC9A 表达水平显著下调。本研究,在肺腺癌、结肠癌、肝癌等细胞系中成功验证 TTC9A 在癌组织中的高表达;而在膀胱癌细胞系中的结果与泛癌分析结果相矛盾。这种矛盾可能源于 RNA-seq 数据的分析误差、样本来源的差异、实验方法的限制等。一是泛癌分析是通过对大量癌症样本的 RNA-seq 基因表达数据进行分析得出的结果,这些结果受样品准备、文库构建、测序深度以及质量控制的影响^[15],而实验是在特定实验条件下对特定样本进行的,这些均可造成实验结果与测序结果的不同。二是可能存在细胞的差异性。为了反映 TTC9A 在膀胱癌中的表达水平,可以通过收集临床组织样本进行验证,

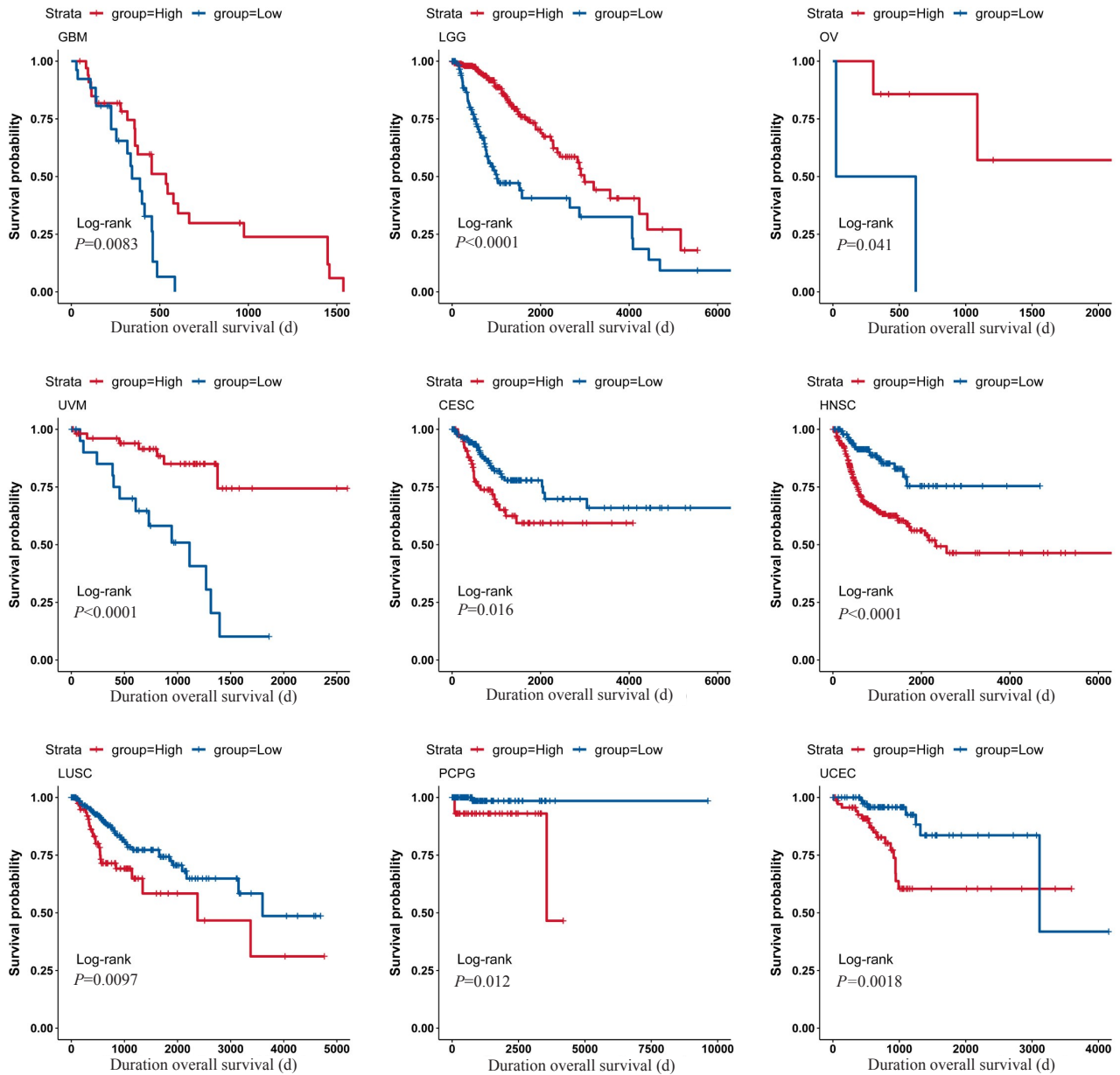


图6 TTC9A DNA 甲基化水平与疾病特异性生存期的相关分析
 Fig.6 Correlation between TTC9A methylation level and disease-specific survival.

这部分有待进一步研究。由于数据库中正常样本的数量不足,在食管癌、肾嫌色细胞癌、肺腺癌、胰腺癌、嗜铬细胞瘤和副神经节瘤、前列腺癌、肉瘤、皮肤黑色素瘤和胃癌的表达差异分析中,TTC9A 的数据没有统计学意义。而在肾上腺皮质癌、弥漫性大B细胞淋巴瘤、急性髓细胞样白血病、脑低级别胶质瘤、间皮瘤、卵巢浆液性囊腺癌、睾丸癌、子宫肉瘤等癌症中,由于缺少正常组样本,分析不成功。随着将来数据的积累,这一部分值得进一步探索。

结合预后分析我们发现,TTC9A 在肺腺癌、肾上腺癌组织中高表达,且高表达的TTC9A在肺腺癌、肾上腺

癌中的预后更差;而在头颈鳞状细胞癌、肾透明细胞癌、多形性胶质母细胞瘤等组织中,TTC9A 的表达量低于正常组织,其低表达与患者预后差有关。这些结果提示TTC9A 可能作为多种肿瘤潜在的预后分子标志物。

DNA 甲基化与癌症之间的联系在近几年来逐渐被发现。与肿瘤中的正常对照组织相比,DNA 低甲基化发生在全局和基因特异性水平,这导致基因组不稳定和沉默癌基因的激活^[16]。相反,DNA 高甲基化发生在肿瘤抑制基因的启动子区域,导致其沉默^[17]。DNA 甲基化异常表现为最早加速肿瘤发生的分子事件之一^[18]。例如,Kanai 等^[19]在伴有异常DNA 甲基化水平的结直肠

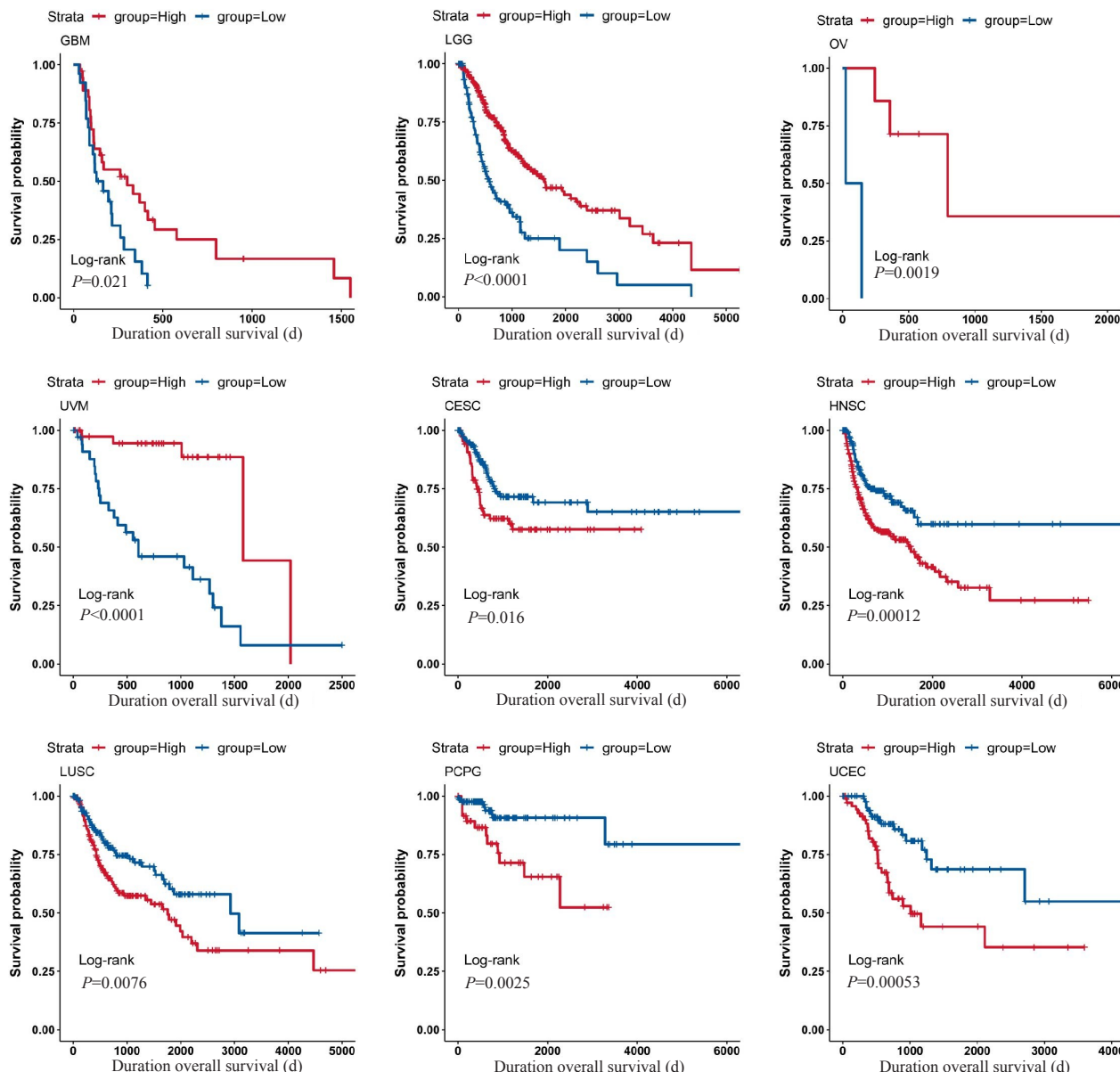


图7 TTC9A DNA 甲基化水平与无进展间期的相关分析
 Fig.7 Correlation between TTC9A methylation level and progression-free interval.

癌中检测到 DNMT1 基因的突变失活。在血液系统恶性肿瘤方面, Figueroa 等^[20]发现 TET2 突变体与急性髓系白血病的高甲基化表型有关。此外, 组蛋白去乙酰化与癌症发展染色质结构调控过程中的 DNA 甲基化和基因沉默有关^[21]。在肿瘤患者中, DNA 甲基化水平以年龄依赖性方式上调^[22]。因此, DNA 甲基化的失调可能导致各种疾病, 包括癌症和其他疾病, 造成不良预后。TTC9A 在大多数癌症中可以发生甲基化, 我们的生存分析结果显示, TTC9A 的甲基化在宫颈鳞癌和腺癌、头颈鳞状细胞癌、肺鳞癌、嗜铬细胞瘤和副神经节瘤、子宫内膜癌等肿瘤中是危害因素, 其可能是这些肿瘤不良预后的原因, 而关于更深入的分子机制, 仍有待进一步挖掘。

癌症进展不仅仅是癌细胞本身的变化, 肿瘤微环境的变化也被证明在肿瘤的发展和进展中起关键作用^[23]。TME 在癌症生物学功能中有不可或缺的作用, 如肿瘤进展、治疗耐药性、血管生成诱导和转移等^[24-26]。从机制上讲, TME 通过复杂和动态的途径影响癌细胞, 以调节癌症相关信号传导^[27], 涉及配体-受体相互作用(例如, 癌细胞的 PD-L1 与 T 细胞的 PD1 结合)、细胞因子/代谢物反应和细胞外基质的沉积^[28-31]。有研究表明^[32], 大量肿瘤浸润免疫细胞进入肿瘤组织与患者的预后密切相关, 细胞毒性 T 细胞, 辅助性 T 细胞, 树突状细胞, 肿瘤相关巨噬细胞, 间充质干细胞以及相关炎症途径和成

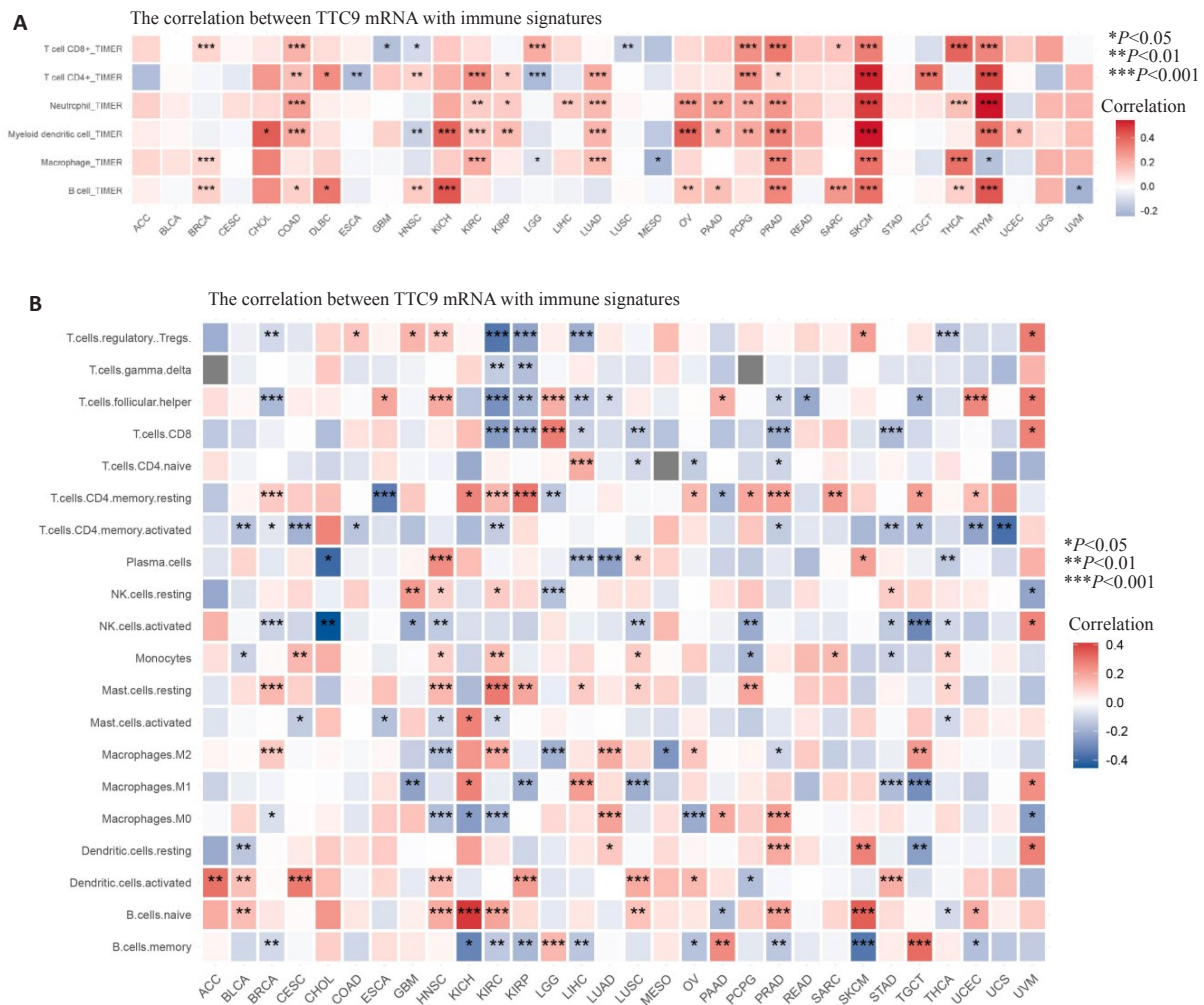


图8 TTC9A 表达与各种免疫细胞浸润水平的相关性分析。

Fig.8 TTC9A expression correlated with immune infiltration. **A:** TTC9A expression is significantly correlated with the infiltration levels of various immune cells in the TIMER database. **B:** TTC9A expression is significantly correlated with the infiltration levels of various immune cells based on xCell.

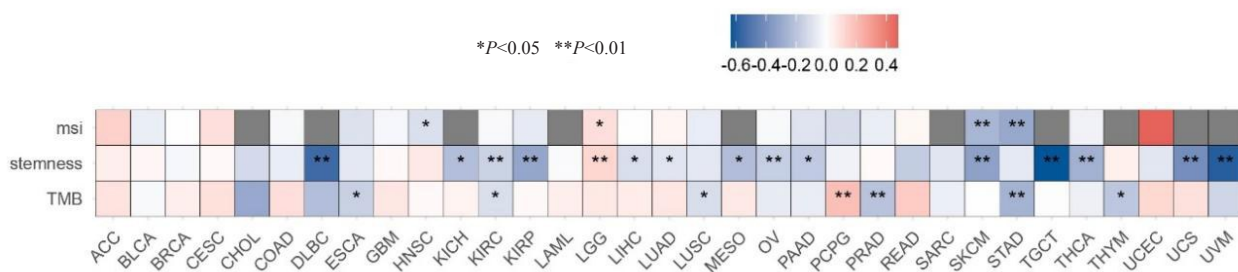


图9 TTC9A 与肿瘤突变负荷、微卫星不稳定性 and 干细胞特性的相关性分析

Fig.9 TTC9A expression correlated with tumor mutational load (TMB), microsatellite instability (msi), and stemness.

纤维细胞的变化会影响多种恶性肿瘤的预后^[32]。尽管我们已经在肿瘤微环境中的作用机制有所突破,但其成功应用仍较为困难。因此,识别新的靶点是进一步提高免疫治疗的关键。目前关于TTC9A与肿瘤微环境的联系尚不清楚。通过分析TTC9A基因表达与肿瘤免疫细

胞浸润水平之间的关系,我们可以发现TTC9A的表达与大多数免疫细胞浸润程度呈显著相关。在大多数肿瘤中,TTC9A的表达与B细胞、CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、髓样树突状细胞呈正相关。而肿瘤中免疫细胞的浸润程度能够影响肿瘤的治疗效

果^[33],提示TTC9A有可能成为免疫治疗的有效靶点。肿瘤突变负荷与跨肿瘤类型免疫治疗的有效性密切相关^[34]。最近的研究表明,TMB可以通过抗CTLA-4或抗PD-1治疗预测不同类型人类癌症的患者生存率^[35]。在肿瘤的研究中,TMB和MSI都是有效的预后标志物和免疫治疗反应指标^[36]。我们的研究分析了TTC9A的表达与TMB、MSI的相关性,发现TTC9A的表达水平与食管癌、肾透明细胞癌、肺鳞癌、前列腺癌、胃癌和胸腺癌等的肿瘤突变负荷呈负相关,而与嗜铬细胞瘤和副神经节瘤为正相关;TTC9A的表达水平与头颈鳞状细胞癌、皮肤黑色素瘤和胃癌等的微卫星不稳定性呈负相关,而在脑低级别胶质瘤中呈正相关。综合以上结果,可以发现TTC9A与免疫系统的关系十分复杂,需要更多的实验研究来探讨其在免疫系统方面的作用机制。

自TTC9A被发现以来,我们对其与肿瘤之间的关系知之甚少,对其功能也鲜有研究。有关于TTC9A在肿瘤中的作用仅限于乳腺癌与肺腺癌。目前还没有关于TTC9A与各种癌症之间关联的泛癌研究,其在大部分肿瘤中的表达、功能及其与预后的关系尚不清楚。在这项研究中,我们首次使用来自各种数据库的患者数据来确定TTC9A在多种癌症中的功能作用。通过泛癌分析发现TTC9A在肿瘤组织和正常组织之间的差异表达,并与多种肿瘤的不良预后相关。进一步我们揭示了TTC9A与DNA甲基化、免疫细胞浸润、肿瘤突变负荷以及微卫星不稳定性的相关性。这将有助于阐明TTC9A在肿瘤发展中的机制。

然而,本研究仍然存在一些局限性。首先,所有分析均基于生物信息学分析,在大部分肿瘤中有待进一步验证。其次,本研究尚未探索TTC9A在癌症中的分子机制,未来需要进一步研究TTC9A在肿瘤中的作用机制。

参考文献:

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA A Cancer J Clinicians, 2021, 71(3): 209-49.
- [2] Zhang LZ, Li BW, Peng Y, et al. The prognostic value of TMB and the relationship between TMB and immune infiltration in head and neck squamous cell carcinoma: a gene expression-based study[J]. Oral Oncol, 2020, 110: 104943.
- [3] Liu T, Yang K, Chen JM, et al. Comprehensive pan-cancer analysis of KIF18A as a marker for prognosis and immunity [J]. Biomolecules, 2023, 13(2): 326.
- [4] Network CGAR, Weinstein JN, Collisson EA, et al. The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project[J]. Nat Genet, 2013, 45(10): 1113-20.
- [5] ICGC/TCGA Pan-Cancer Analysis of Whole Genomes Consortium. Pan-cancer analysis of whole genomes[J]. Nature, 2020, 578(7793): 82-93.
- [6] Chen F, Wendl MC, Wyczalkowski MA, et al. Moving pan-cancer studies from basic research toward the clinic[J]. Nat Cancer, 2021, 2(9): 879-90.
- [7] Ishikawa KI, Nagase T, Nakajima D, et al. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. VIII. 78 new cDNA clones from brain which code for large proteins *in vitro*[J]. DNA Res, 1997, 4(5): 307-13.
- [8] Cao SL, Ho GH, Lin VCL. Tetratricopeptide repeat domain 9A is an interacting protein for tropomyosin Tm5NM-1 [J]. BMC Cancer, 2008, 8: 231.
- [9] Smith DF. Tetratricopeptide repeat cochaperones in steroid receptor complexes[J]. Cell Stress Chaperones, 2004, 9(2): 109-21.
- [10] Cao SL, Iyer JK, Lin V. Identification of tetratricopeptide repeat domain 9, a hormonally regulated protein[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 345(1): 310-7.
- [11] Shrestha S, Sun Y, Lufkin T, et al. Tetratricopeptide repeat domain 9A negatively regulates estrogen receptor alpha activity [J]. Int J Biol Sci, 2015, 11(4): 434-47.
- [12] Lim LW, Shrestha S, Or YZ, et al. Tetratricopeptide repeat domain 9A modulates anxiety-like behavior in female mice [J]. Sci Rep, 2016, 6: 37568.
- [13] Domingues P, González-Tablas M, Otero Á, et al. Tumor infiltrating immune cells in gliomas and meningiomas[J]. Brain, Behavior, and Immunity, 2016, 53: 1-15.
- [14] Srivastava S, Hanash S. Pan-Cancer Early Detection: Hype or Hope? [J]. Cancer Cell, 2020, 38(1): 23-24.
- [15] Schurch NJ, Schofield P, Gierliński M, et al. How many biological replicates are needed in an RNA-seq experiment and which differential expression tool should You use [J]? RNA, 2016, 22(6): 839-51.
- [16] Montgomery SB, Dermitzakis ET. From expression QTLs to personalized transcriptomics [J]. Nat Rev Genet, 2011, 12(4): 277-82.
- [17] Ehrlich M. DNA hypomethylation in cancer cells [J]. Epigenomics, 2009, 1(2): 239-59.
- [18] Greenberg MVC, Bour' his D. The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20(10): 590-607.
- [19] Kanai YE, Ushijima S, Nakanishi Y, et al. Mutation of the DNA methyltransferase (DNMT) 1 gene in human colorectal cancers [J]. Cancer Lett, 2003, 192(1): 75-82.
- [20] Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation [J]. Cancer Cell, 2010, 18(6): 553-67.
- [21] Chistiakov DA, Myasoedova VA, Orekhov AN, et al. Epigenetically active drugs inhibiting DNA methylation and histone deacetylation [J]. Curr Pharm Des, 2017, 23(8): 1167-74.
- [22] Toyota M, Issa JP J. CpG island methylator phenotypes in aging and cancer [J]. Semin Cancer Biol, 1999, 9(5): 349-57.
- [23] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. Cell, 2011, 144(5): 646-74.
- [24] Pitt JM, Marabelle A, Eggermont A, et al. Targeting the tumor microenvironment: removing obstruction to anticancer immune responses and immunotherapy [J]. Ann Oncol, 2016, 27(8): 1482-92.

- [25] Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis[J]. *Nat Med*, 2013, 19(11): 1423-37.
- [26] Meurette O, Mehlen P. Notch signaling in the tumor microenvironment[J]. *Cancer Cell*, 2018, 34(4): 536-48.
- [27] Kaymak I, Williams KS, Cantor JR, et al. Immunometabolic interplay in the tumor microenvironment[J]. *Cancer Cell*, 2021, 39(1): 28-37.
- [28] Sahai E, Astsaturon I, Cukierman E, et al. A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts [J]. *Nat Rev Cancer*, 2020, 20(3): 174-86.
- [29] Chen LP, Han XE. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future[J]. *J Clin Investig*, 2015, 125(9): 3384-91.
- [30] Sordo-Bahamonde C, Lorenzo-Herrero S, Granda-Díaz R, et al. Beyond the anti-PD-1/PD-L1 era: promising role of the BTLA/HVEM axis as a future target for cancer immunotherapy [J]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 142.
- [31] Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(5): 392-401.
- [32] Bissell MJ, Radisky DC, Rizki A, et al. The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast [J]. *Differentiation*, 2002, 70(9/10): 537-46.
- [33] Hainaut P, Plymoth A. Targeting the hallmarks of cancer [J]. *Curr Opin Oncol*, 2013, 25(1): 50-1.
- [34] Chalmers ZR, Connelly CF, Fabrizio D, et al. Analysis of 100, 000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden[J]. *Genome Med*, 2017, 9(1): 1-14.
- [35] Samstein RM, Lee CH, Shoushtari AN, et al. Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types [J]. *Nat Genet*, 2019, 51(2): 202-6.
- [36] Allan RE, Luis RP, Juan P. Microsatellite instability in Costa Rican patients with colorectal adenocarcinoma and its association with overall survival and response to fluoropyrimidine-based chemotherapy[J]. *Cancer Epidemiol*, 2020, 65: 101680.

(编辑:经 媛)