

YKT6在非小细胞肺癌中的表达及临床意义

李文慧¹, 王丽娜¹, 张黎明², 宁鲁¹, 王少强^{1*}

¹济宁医学院附属医院, 山东 济宁

²济宁医学院临床医学院, 山东 济宁

收稿日期: 2022年10月16日; 录用日期: 2022年11月10日; 发布日期: 2022年11月21日

摘要

目的: 探究YKT6在非小细胞肺癌中的表达情况, 阐明YKT6表达与临床分期的关系以及对于非小细胞肺癌患者的诊断和预后价值。方法: 通过TCGA、Ualcan、HPA等公共数据库, 使用R语言(3.6.3版本) ggplot2包、pROC包、survival包等分析YKT6在非小细胞肺癌中的表达及其与预后的关系。结果: 通过分析TCGA数据显示, YKT6在膀胱尿路上皮癌、乳腺癌等多种肿瘤中高表达。Ualcan数据库分析发现YKT6在肺腺癌和肺鳞癌组织中的表达水平高于癌旁组织, 其表达与肺癌的病理分期呈显著相关。YKT6蛋白在肺腺癌和肺鳞癌组织中均呈中等水平以上的表达, 而正常肺组织几乎不表达。K-M分析表明, YKT6的表达水平与肺腺癌患者的总生存呈显著负相关, 而其表达上调对肺腺癌和肺鳞癌均具有诊断价值。结论: YKT6在非小细胞肺癌中表达上调, 其表达与肺腺癌患者总生存显著相关, 有望成为非小细胞肺癌诊断和治疗的潜在靶点。

关键词

YKT6, 非小细胞肺癌, 表达, 预后

Expression and Clinical Significance of YKT6 in Non-Small Cell Lung Cancer

Wenhui Li¹, Lina Wang¹, Liming Zhang², Lu Ning¹, Shaoqiang Wang^{1*}

¹Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining Shandong

²Clinical Medicine Department, Jining Medical University, Jining Shandong

Received: Oct. 16th, 2022; accepted: Nov. 10th, 2022; published: Nov. 21st, 2022

Abstract

Objective: We aim to investigate YKT6 expression in non-small cell lung cancer (NSCLC), to define the connection between YKT6 expression and clinical stage, and to assess the significance of YKT6

*通讯作者。

in the diagnosis and prognosis of NSCLC patients. **Methods:** By utilizing TCGA, Ualcan, HPA and ggplot2 package, pROC package, and survival package in the R language (version 3.6.3), we were able to examine the expression of YKT6 in NSCLC and its relation to prognosis. **Results:** TCGA data analysis revealed that YKT6 was highly expressed in a variety of cancers, including bladder urothelial carcinoma and breast invasive carcinoma. Ualcan showed that YKT6 expression was substantially higher in lung adenocarcinoma (LUAD) and lung squamous cell carcinoma (LUSC) than in neighboring tissues, and connected with the pathological stage. The expression of YKT6 protein was higher than moderate in LUAD and LUSC, but essentially nonexistent in normal lung tissue. In patients with LUAD, K-M analysis revealed a strong inverse relationship between YKT6 expression and overall survival (OS), and its up-regulation has diagnostic significance for both LUAD and LUSC. **Conclusion:** The expression of YKT6 is up-regulated in non-small cell lung cancer, and its expression is significantly related to the overall survival of patients with lung adenocarcinoma and is expected to become a potential target for the diagnosis and treatment of non-small cell lung cancer.

Keywords

YKT6, Non-Small Cell Lung Carcinoma, Expression, Prognosis

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

肺癌是全球癌症死亡的主要原因之一，约占癌症总死亡人数的 18% [1]。根据组织病理类型的不同，肺癌主要分为非小细胞肺癌(Non-small cell lung carcinoma, NSCLC)和小细胞肺癌(Small cell lung carcinoma, SCLC)，而 NSCLC 是肺癌主要的病理类型[2]。目前肺癌的治疗方法有手术、化疗、靶向治疗、免疫疗法等，虽已显著提高了患者的生存率，但大多数确诊的晚期肺癌患者的总生存率不足 20% [3]。因此，迫切需要进一步探索肺癌的发生发展机制，寻找新的治疗靶点，研发更有效的治疗药物。

可溶性 N-乙基马来酰亚胺敏感性因子附着蛋白受体(Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor, SNARE)是位于细胞器和细胞膜上的一类跨膜蛋白，它可精确地调节外泌体的产生和释放。YKT6 是一种从酵母到人类高度保守的 SNARE 蛋白质，与膜融合和囊泡运输有关，并参与外泌体的形成和释放[4]。然而，目前关于 YKT6 在 NSCLC 中的作用的研究较少。本文利用公共数据库对 YKT6 在 NSCLC 中的表达及预后进行分析，为寻找 NSCLC 分子标志物及治疗靶点提供依据。

2. 材料与方法

2.1. YKT6 在泛癌中的表达

下载 TCGA (<https://portal.gdc.cancer.gov>)数据库[5]中泛癌项目中的 RNA seq 数据，进行 log2 转化，并使用 R 语言中的 ggplot2 包对 YKT6 在癌症中的表达进行统计分析及可视化，分析 YKT6 在肿瘤组织与癌旁组织中的表达情况。

2.2. YKT6 在肺癌中的表达水平

Ualcan (<http://ualcan.path.uab.edu/index.html>)数据库是一个全面的、用户友好的交互式网络资源，用于分析癌症 OMICS 数据[6]。我们使用 Ualcan 数据库分析 YKT6 在 LUAD 及 LUSC 中的表达水平。HPA

(<https://www.proteinatlas.org>)数据库是利用转录组学和蛋白质组学技术,从 RNA 和蛋白水平研究人类不同组织和器官中的蛋白表达情况的开放性数据库[7]。我们使用 HPA 数据库分析并比较 NSCLC 组织和正常组织中 YKT6 蛋白的表达水平。

2.3. YKT6 表达水平和临床病理特征的关系

为了进一步探索 YKT6 的表达水平与临床病理特征的关系,我们使用 Ualcan 网站进行分析。首先打开网址,选择 TCGA,基因输入 YKT6,癌症设为 Lung adenocarcinoma、Lung squamous cell carcinoma,探究 YKT6 表达水平与临床分期的关系。

2.4. YKT6 对肺癌患者诊断和预后价值

Kaplan-Meier plotter (<http://www.kmplot.com>)整合了 GEO、TCGA 等数据库的芯片数据,提供包括肺癌在内的多种癌症的预后信息。我们使用该数据库对 YKT6 的表达与肺癌患者预后的相关性进行分析;随后我们下载 TCGA 数据库中 LUAD、LUSC 项目 HTSeq-FPKM 格式的 RNAseq 数据,转换成 TPM 格式并进行 log2 转化,并使用 R 语言 pROC 包分析相关资料并使用 ggplot2 包对结果进行分析和可视化,绘制 ROC 曲线。

3. 结果

3.1. YKT6 在泛癌中的表达情况

为了探究 YKT6 与癌症之间的关系,我们分析了 TCGA 数据库中包含未配对肿瘤和非肿瘤组织的表达,使用 R 语言分析 YKT6 在不同癌组织中的表达情况。结果显示,与正常组织相比,YKT6 在膀胱尿路上皮癌(Bladder urothelial carcinoma, BLCA)、浸润性乳腺癌(Breast invasive carcinoma, BRCA)、宫颈鳞癌和腺癌(Cervical squamous cell carcinoma and endocervical adenocarcinoma, CESC)、胆管癌(Cholangiocarcinoma, CHOL)、结肠癌(Colon adenocarcinoma, COAD)、食管癌(Esophageal carcinoma, ESCA)、多形成性胶质细胞瘤(Glioblastoma multiforme, GBM)、头颈鳞状细胞癌(Head and neck squamous cell carcinoma, HNSC)、肾嫌色细胞癌(Kidney chromophobe renal cell carcinoma, KICH)、肾透明细胞癌(Kidney renal clear cell carcinoma, KIRC)、肾乳头状细胞癌(Kidney renal papillary cell carcinoma, KIRP)、肝细胞肝癌(Liver hepatocellular carcinoma, LIHC)、LUAD、LUSC、前列腺癌(Prostate adenocarcinoma, PRAD)、直肠腺癌(Rectum adenocarcinoma, READ)、胃癌(Stomach adenocarcinoma, STAD)以及子宫内膜癌(Uterine corpus endometrial carcinoma, UCEC)中均呈现较高的表达水平(见图 1)。

3.2. YKT6 mRNA 在 NSCLC 组织与正常组织中的表达情况

通过搜索 Ualcan 数据库,YKT6 在 LUAD 和 LUSC 中的表达水平均高于正常组织(图 2(a)和图 2(b)),且具有显著性差异($P < 0.001$)。

3.3. YKT6 蛋白在 NSCLC 组织与正常组织的表达情况

检索 HPA 数据库的结果表明,在 4 例肺癌组织中,YKT6 均呈中 - 高水平的表达,其中 1 例 LUAD 强染色(图 3(b)),1 例 LUAD 中等程度染色(图 3(e)),2 例肺鳞癌中等程度染色(图 3(c)和图 3(f)),而 2 例正常组织无明显染色(图 3(a)和图 3(d))。

3.4. YKT6 表达与肺癌临床分期的相关性

通过 Ualcan 数据库分析 YKT6 的表达水平与临床分期的相关性。结果表明 YKT6 表达水平与 LUAD

和 LUSC 的临床分期均显著相关(图 4(a)和图 4(b))。

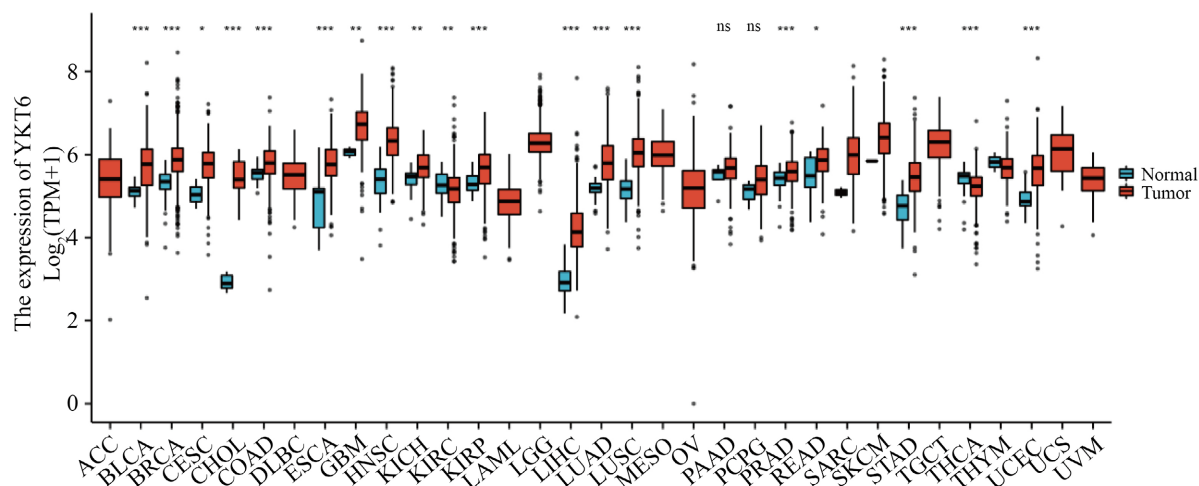
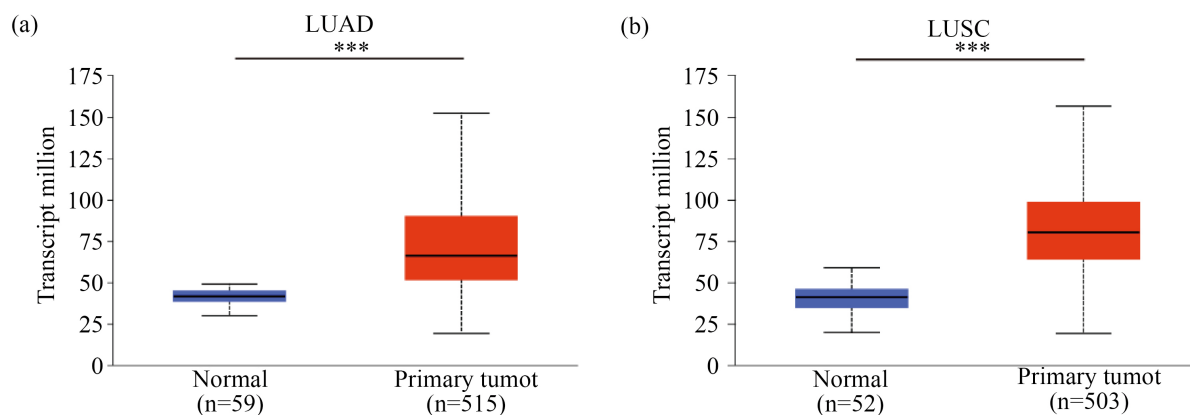


Figure 1. Expression of YKT6 in pan carcinoma

图 1. YKT6 在泛癌中的表达



(a) YKT6 在肺腺癌中高表达; (b) YKT6 在肺鳞癌中高表达

Figure 2. High expression of YKT6 mRNA in lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma

图 2. YKT6 mRNA 在肺腺癌和肺鳞癌中高表达

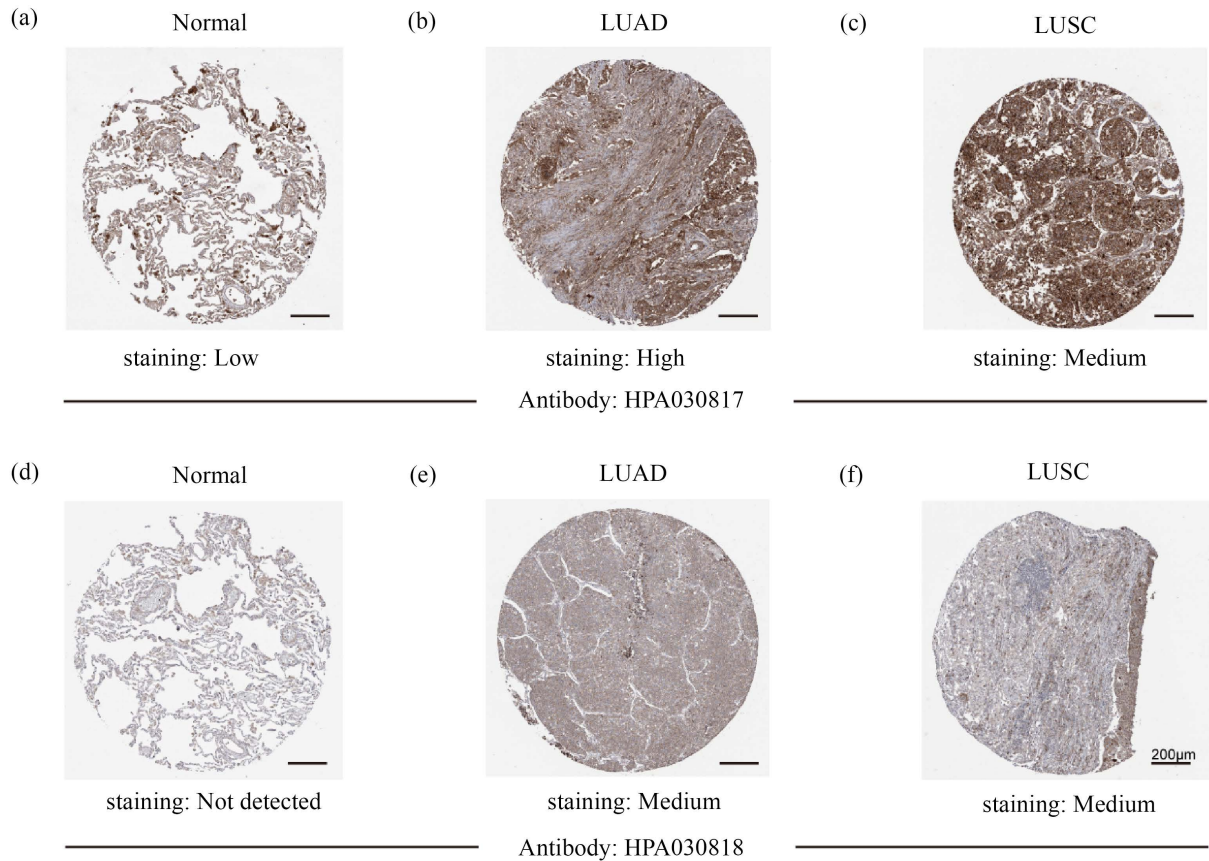
3.5. YKT6 表达水平与肺癌预后的相关性

我们探究了 YKT6 表达与肺癌患者预后之间的关系。结果表明, YKT6 表达与肺癌患者总生存(Overall survival, OS) ($P = 3.1 \times 10^{-5}$)、首次进展生存期(First progression, FP) ($P = 1.6 \times 10^{-7}$)显著相关, 与进展后生存期(Post progression survival, PPS)无显著相关性($P = 0.059$) (图 5(a)~(c)); 随后我们探究了 YKT6 表达与 LUAD 和 LUSC 患者 OS、无复发生存期(Recurrence free survival, RFS)的相关性。结果表明, YKT6 表达与 LUAD 患者 OS ($P = 0.00096$)显著相关, 与患者 RFS ($P = 0.072$)无明显相关性(图 5(c)和图 5(d)); 而 YKT6 表达与 LUSC 患者的 OS ($P = 0.086$)、RFS ($P = 0.3$)均无明显相关性(图 5(e)和图 5(f))。

3.6. ROC 曲线

为了评估 YKT6 对 NSCLC 的诊断价值, 我们绘制了接收者操作特征(receiver operating characteristic

curve, ROC)曲线, 并计算曲线下面积(Area under curve, AUC); 结果显示 LUAD 和 LUSC 的 AUC 分别为 0.864、0.842 (图 6(a)和图 6(b)), 表明 YKT6 的表达对 LUAD 和 LUSC 有很好的诊断价值。



(a) 49 岁女性正常组织, 低染色; (b) 51 岁女性肺腺癌, 强染色; (c) 66 岁男性肺鳞癌, 中染色; (d) 49 岁女性正常组织, 未检测到; (e) 49 岁男性肺腺癌, 中染色; (f) 65 岁男性肺鳞癌, 中染色。

Figure 3. High expression of YKT6 protein in lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma

图 3. YKT6 蛋白在肺腺癌和肺鳞癌中高表达

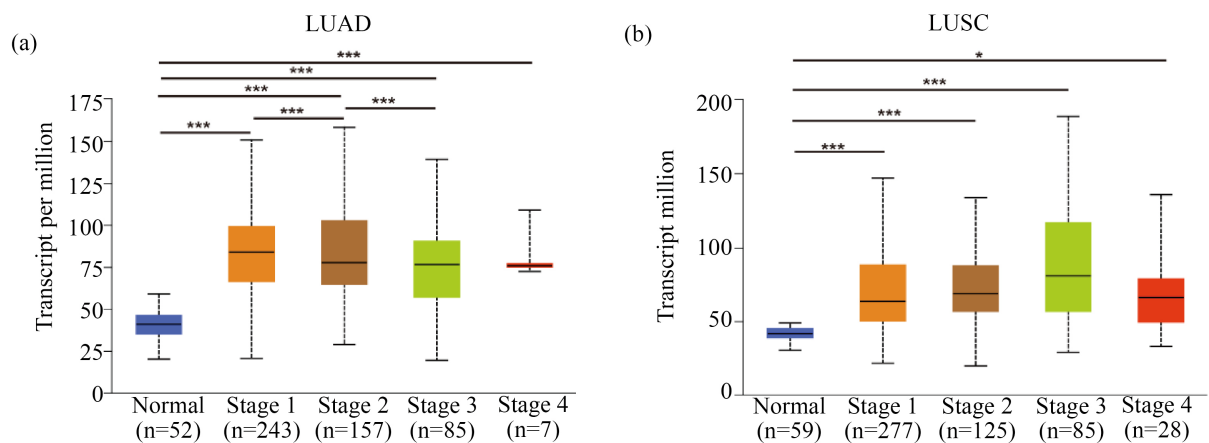
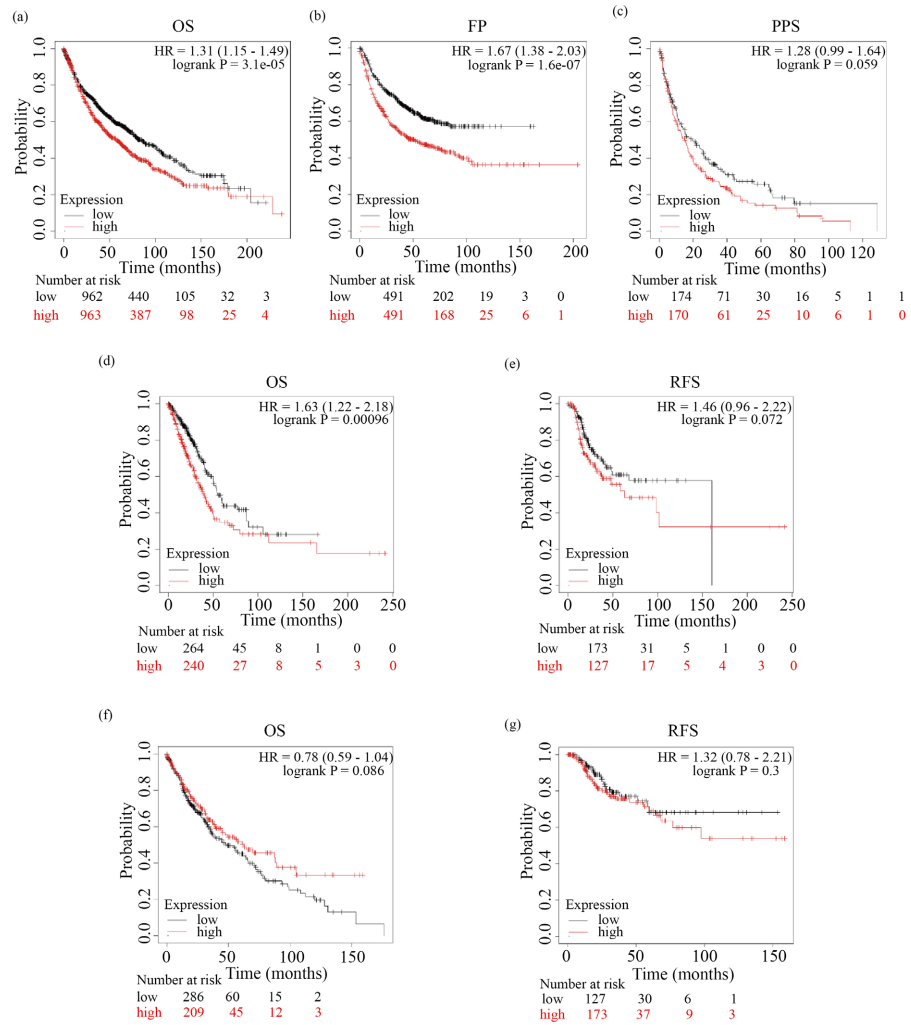


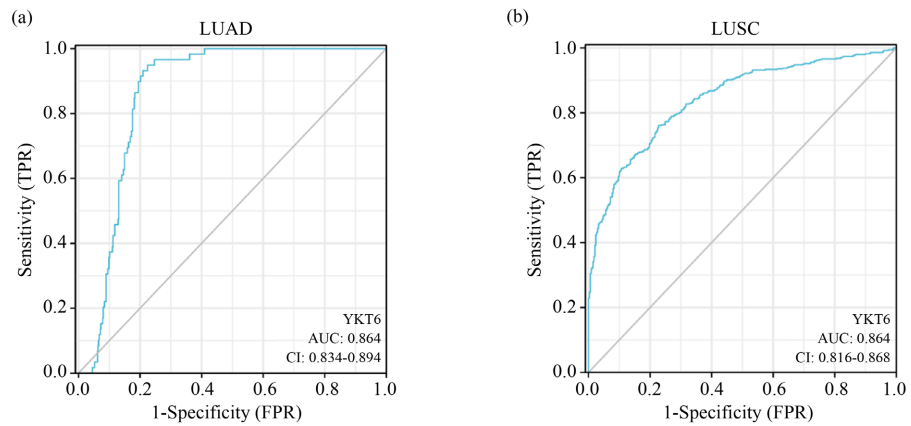
Figure 4. Correlation between YKT6 and the staging of lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma

图 4. YKT6 与肺腺癌和肺鳞癌疾病分期的相关性



(a)~(c) 肺癌患者的 OS、FP 和 PPS; (d)和(e) 肺腺癌患者的 OS 和 RFS; (f) (g) 肺鳞癌患者的 OS 和 RFS

Figure 5. Correlation between YKT6 and prognosis of lung cancer
图 5. YKT6 与肺癌预后的相关性



(a) 肺腺癌; (b) 肺鳞癌

Figure 6. ROC curve
图 6. ROC 曲线

4. 讨论

肺癌是最常见的癌症之一[8]。其中, NSCLC 是最为常见的类型。超过七成的肺癌患者在确诊时, 已处于局部晚期或晚期阶段, 这使得部分患者初诊时已失去手术机会[9]。目前的化疗药物缺乏特异性、副作用较大, 在临床中已陷入治疗“瓶颈”, 肺癌患者亟需更为有效、及时、个性化的治疗[10]。

YKT6 是一种进化高度保守的 SNARE 蛋白, 可调节高尔基体膜融合[11]。与其他 SNARE 蛋白不同, YKT6 没有跨膜结构域, 但在羧基端具有保守的串联半胱氨酸基序[12]。最近研究表明, YKT6 的高表达与乳腺癌的侵袭有关[13]。此外, YKT6 也可作为口腔鳞状细胞癌预后和免疫治疗反应的潜在预测指标, 与细胞侵袭、转移和 CD8⁺T 细胞浸润有关[14]。

在本研究中, 我们下载了 TCGA 数据库中肿瘤的转录组数据以及临床信息, 使用 R 语言进行分析, 探究 YKT6 在各种恶性肿瘤组织中的表达情况。结果表明, YKT6 在膀胱尿路上皮癌、乳腺浸润癌等 18 种癌症中高表达, 这也为 YKT6 在各种癌症中的研究奠定了基础。基于 Ualcan 和 HPA 数据库发现: 无论是 LUAD 还是 LUSC, YKT6 基因和蛋白表达水平均高于正常组织及癌旁组织。越来越多的证据表明, 肿瘤细胞释放过量的外泌体, 影响肿瘤的发生、发展、转移和耐药, 而 YKT6 与外泌体的生成和释放有关[15]。因此, 我们推测 YKT6 可能通过调节外泌体的形成与释放进而参与于 NSCLC 的发生与进展。Xu 等人研究发现, YKT6 的高表达与 LIHC 的进展密切相关, 可作为判断其预后不良的潜在生物学标志[16]。目前尚未有 YKT6 与 NSCLC 预后的关系的报道, 我们的分析结果表明, YKT6 表达与 LUAD 的 OS 显著相关; YKT6 对 LUAD 和 LUSC 均具有一定的诊断价值。然而, 尽管有以上结果, 但我们的研究仍有一部分局限性, 我们仅仅通过在生物信息学网站进行了一些分析和验证, 缺乏更深入的体内和体外实验, 这些都是我们在后期需要加以改正的地方。但本研究是经过反复分析验证, 结果是准确的, 为 NSCLC 的机制的探索提供了新的方向。

以上结果表明, YKT6 在 NSCLC 中表达上调, 与 NSCLC 患者的临床病理学特征和预后相关, 可作为 NSCLC 潜在的诊断和预后生物标志物。靶向 YKT6 可能是未来 NSCLC 治疗的新方向。

基金项目

国家自然科学基金青年基金(81802290, 81800182); 山东省自然科学基金(ZR2018BH020)。

参考文献

- [1] Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., et al. (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **71**, 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- [2] Rodriguez-Canales, J., Parra-Cuentas, E. and Wistuba, I.I. (2016) Diagnosis and Molecular Classification of Lung Cancer. In: Reckamp, K., Ed., *Lung Cancer. Cancer Treatment and Research*, Vol. 170, Springer, Cham, 25-46. https://doi.org/10.1007/978-3-319-40389-2_2
- [3] Arbour, K.C. and Riely, G.J. (2019) Systemic Therapy for Locally Advanced and Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer: A Review. *JAMA*, **322**, 764-774. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.11058>
- [4] Gordon, D.E., Bond, L.M., Sahlender, D.A. and Peden, A.A. (2010) A Targeted siRNA Screen to Identify SNAREs Required for Constitutive Secretion in Mammalian Cells. *Traffic*, **11**, 1191-204. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01087.x>
- [5] Tomczak, K., Czerwińska, P. and Wiznerowicz, M. (2015) The Cancer Genome Atlas (TCGA): An Immeasurable Source of Knowledge. *Contemporary Oncology*, **19**, A68-A77. <https://doi.org/10.5114/wo.2014.47136>
- [6] Chandrashekar, D.S., Bashel, B., Balasubramanya, S.A.H., et al. (2017) UALCAN: A Portal for Facilitating Tumor Subgroup Gene Expression and Survival Analyses. *Neoplasia*, **19**, 649-658. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2017.05.002>
- [7] Navani, S. (2016) Manual Evaluation of Tissue Microarrays in a High-Throughput Research Project: The Contribution of Indian Surgical Pathology to the Human Protein Atlas (HPA) Project. *Proteomics*, **16**, 1266-1270.

- <https://doi.org/10.1002/pmic.201500409>
- [8] Guha, N., Merletti, F., Steenland, N.K., *et al.* (2010) Lung Cancer Risk in Painters: A Meta-Analysis. *Environmental Health Perspectives*, **118**, 303-312. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901402>
- [9] Fujino, T., Suda, K., Koga, T., *et al.* (2022) Foretinib Can Overcome Common On-Target Resistance Mutations after Capmatinib/Tepotinib Treatment in NSCLCs with MET Exon 14 Skipping Mutation. *Journal of Hematology & Oncology*, **15**, Article No. 79. <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01299-z>
- [10] 张绪红. 洛铂作为一线化疗药物对晚期食管鳞状细胞癌的临床疗效和毒副作用[J]. 中国处方药, 2019, 17(7): 83-85.
- [11] McNew, J.A., Sogaard, M., Lampen, N.M., *et al.* (1997) Ykt6p, a Prenylated SNARE Essential for Endoplasmic Reticulum-Golgi transport. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 17776-17783. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.28.17776>
- [12] Shirakawa, R., Goto-Ito, S., Goto, K., *et al.* (2020) A SNARE Geranylgeranyltransferase Essential for the Organization of the Golgi Apparatus. *The EMBO Journal*, **39**, e104120. <https://doi.org/10.15252/emj.2019104120>
- [13] Kluger, H.M., Kluger, Y., Gilmore-Hebert, M., *et al.* (2004) cDNA Microarray Analysis of Invasive and Tumorigenic Phenotypes in a Breast Cancer Model. *Laboratory Investigation*, **84**, 320-331. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700044>
- [14] Yang, Z., Yan, G., Zheng, L., *et al.* (2021) YKT6, as a Potential Predictor of Prognosis and Immunotherapy Response for Oral Squamous Cell Carcinoma, Is Related to Cell Invasion, Metastasis, and CD8+ T Cell Infiltration. *Oncoimmunology*, **10**, Article 1938890. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2021.1938890>
- [15] Webber, J., Yeung, V. and Clayton, A. (2015) Extracellular Vesicles as Modulators of the Cancer Microenvironment. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **40**, 27-34. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.01.013>
- [16] Xu, J.Z., Jiang, J.J., Xu, H.J., *et al.* (2021) High Expression of YKT6 Associated with Progression and Poor Prognosis of Hepatocellular Carcinoma. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, **56**, 1349-1354. <https://doi.org/10.1080/00365521.2021.1961305>