

肺腺癌中3P_tRNA-Arg-TCT-4-1的表达及对增殖的影响

何志鹤^{1,2}, 王成海^{1,3}

¹扬州大学医学院病理学教研室, 江苏 扬州

²张家港市第二人民医院医院呼吸内科, 江苏 张家港

³江苏省中西医结合老年病防治重点实验室, 江苏 扬州

收稿日期: 2024年6月17日; 录用日期: 2024年7月11日; 发布日期: 2024年7月18日

摘要

目的: 研究肺腺癌(LUAC)中3P_tRNA-Arg-TCT-4-1的表达情况及其临床意义, 并探索3P_tRNA-Arg-TCT-4-1对LUAC细胞生长和生存预后的影响。方法: 收集我院手术切除的LUAC 71例标本及临床特征。qRT-PCR检测3P_tRNA-Arg-TCT-4-1在LUAC组织中的表达水平, 统计分析3P_tRNA-Arg-TCT-4-1的表达与LUAC病理特征的相关性。通过Kaplan-Meier统计方法分析3P_tRNA-Arg-TCT-4-1表达对肺腺癌患者生存预后的影响。采用CCK-8增殖实验检测3P_tRNA-Arg-TCT-4-1对LUAC细胞增殖的影响。结果: qRT-PCR实验结果显示, 在71对LUAC组织中3P_tRNA-Arg-TCT-4-1相对表达量为 3.491 ± 0.222 , 明显高于癌旁正常组织($t = 10.064, P = 0.000 < 0.05$); 统计分析结果显示3P_tRNA-Arg-TCT-4-1的表达与LUAC的分化程度($\chi^2 = 11.112, P = 0.001$)和肿瘤大小($\chi^2 = 4.616, P = 0.032$)密切相关(P 均 < 0.05), 而与患者年龄、性别、淋巴结转移和TNM分期之间无相关性(P 均 > 0.05)。在与患者生存预后的关系上, 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1正常或阴性表达组总生存期时间明显长于高表达组($\chi^2 = 5.885, P = 0.002 < 0.05$)。CCK-8增殖实验提示过表达3P_tRNA-Arg-TCT-4-1增强了LUAC细胞的增殖活性, 而降低3P_tRNA-Arg-TCT-4-1表达则减弱了LUAC细胞的增殖活性(P 均 < 0.05)。结论: 在LUAC中3P_tRNA-Arg-TCT-4-1表达水平升高, 是一个新的促进增殖的促癌基因; 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1有可能成为治疗生长旺盛的LUAC分子标志物。

关键词

肺腺癌, 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1, 增殖活性, 临床特征

Expression of 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 in Lung Adenocarcinoma and Its Effect on Proliferation

Zhihe He^{1,2}, Chenghai Wang^{1,3}

¹Department of Pathology, Medical College of Yangzhou University, Yangzhou Jiangsu

²Department of Respiratory Medicine, Zhangjiagang Second People's Hospital, Zhangjiagang Jiangsu

³Jiangsu Key laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Prevention and Treatment of Senile Diseases, Yangzhou University, Yangzhou Jiangsu

Received: Jun. 17th, 2024; accepted: Jul. 11th, 2024; published: Jul. 18th, 2024

Abstract

Objective: To investigate the expression of 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 in lung adenocarcinoma (LUAC) and its clinical significance, and to explore the effect of 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 on the growth, survival and prognosis of LUAC cells. **Methods:** The clinical features and specimens of 71 pairs of LUAC were collected. The expression level of 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 in LUAC tissues was detected by qRT-PCR, and the correlation between the expression of 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 and the pathological characteristics of LUAC was statistically analyzed. The effect of 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 expression on survival and prognosis of lung adenocarcinoma patients was analyzed by the Kaplan-Meier statistical method. The effect of 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 on the proliferation of LUAC cells was detected by the CCK-8 proliferation assay. **Results:** The results of qRT-PCR showed that the relative expression of 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 in 71 pairs of LUAC tissues was 3.491 ± 0.222 , which was significantly higher than that in adjacent normal tissues ($t = 10.064$, $P = 0.000 < 0.05$). Statistical analysis showed that the expression of 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 was closely correlated with the differentiation degree of LUAC ($\chi^2 = 11.112$, $P = 0.001$) and tumor size ($\chi^2 = 4.616$, $P = 0.032$) (both $P < 0.05$). There was no correlation with age, sex, lymph node metastasis, and TNM stage (all $P > 0.05$). With survival and prognosis, the total survival time of the 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 expression group was significantly longer than that of the high expression group ($\chi^2 = 5.885$, $P = 0.002 < 0.05$). The proliferation experiment of CCK-8 suggested that overexpression of 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 enhanced the proliferation activity of LUAC cells while silencing expression of 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 decreased the proliferation activity of LUAC cells ($P < 0.05$). **Conclusion:** 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 expression level is increased in LUAC, which is a new oncogene promoting proliferation. 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 may be a LUAC molecular marker for the treatment of vigorous growth.

Keywords

Lung Adenocarcinoma, 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1, Proliferative Activity, Clinical Features

Copyright © 2024 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

肺腺癌(lung adenocarcinoma, LUAC)是人类中最常诊断的癌症,在全球癌症发病率中排名第一[1][2]。引发 LUAC 的病因包括吸烟、空气污染和职业性危险因数和遗传基因突变等[3]。尽管肺腺癌能够早发现和早诊,但其发生发展的生理机制和潜在生物标志物仍有待进一步阐明。

转运 RNA (Transfer RNA, tRNA)作为一种非编码 RNA,传统上被认为是蛋白质转化过程中的一种适配分子[4]。近年来,在大规模基因测序时发现了一类新的非编码小 RNA,它们来源于 tRNA 前体或成熟序列,起名 tRNA 衍生片段(tRNA-derived fragments, TRDF) [5][6]。与 tRNA 的随机降解不同,这些片段的发生是在特定 tRNA 修饰酶作用下进行精确位点切割而形成的新产物,长度为 14~50 nt [7]。目前已有不多的文献表明知 TRDF 参与了一些肿瘤的增殖、凋亡、侵袭和转移等生物学过程[7]-[11],例如,TRF-3027 (tRNA^{Gly-GCC})可能与 ma 诱导沉默复合物(RISCs)的重要组分 AGO 结合,阻断复制蛋白 A1 (RPA1)抑制细胞增殖,调节 DNA 损伤反应[8]。3'-tsRNA-LeuCAG 在体外快速分裂细胞,在小鼠原位肝细胞癌模型中能诱导细胞凋亡。它与 mRNA (RPS28 和 RPS15)结合以增强其翻译,阻断了 18s 前核糖体 RNA 加工,导致 40S 核糖体亚基数量减少,从而诱导细胞凋亡[9]。在结直肠癌中 5'tiRNA-Val-CAC 促进了细胞的生长和增殖[10]。tRF/miR-1280 通过抑制支持 CSC 表型的 Notch 信号通路抑制结直肠癌细胞的生长和转移[11]。本实验通过分析 NCBI 在线数据集 GSE83527、GSE62182 和 GSE110907 得到 LUAC 中差异表达的 tRNA 衍生片段,其中 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 表达水平上调,并在 71 例 LUAC 组织中得到验证。本实验旨在探讨 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 的表达、临床病理意义以及对增殖的影响。

2. 材料与方法

2.1. 临床标本

71 例新鲜的 LUCA 组织来自我院胸外科手术切除患者,时间为 2021 年 8 月~2023 年 12 月,患者年龄范围 43~68 岁,中位年龄为 56 岁。患者手术前均未行化疗或放疗处理。纳入标准:1) 经病理检查确诊为 LUCA;2) 入组前未进行手术、化疗等抗肿瘤治疗;3) 患者临床资料和随访资料完整。排除标准:1) 患有其他原发和转移性肿瘤;2) 合并有心肝肾等重要脏器功能障碍和血液系统疾病、免疫功能障碍。肿瘤分期参照第 8 版美国肿瘤联合会肺腺癌分期系统,分为 I 期 18 例、II 期 22 例、III 期 31 例。本研究经扬州大学附属医院伦理委员会批准,并与患者签署知情同意书。

2.2. 材料和细胞

3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 过表达和降低表达的质粒由云舟生物科技(广州)股份有限公司合成。质粒转染过程按 Lipofectamine 2000 试剂盒(Invitrogen 公司)说明书步骤进行。肺腺癌细胞株 NCI-H1975 购买于中国科学院上海细胞库。

2.3. 细胞培养

NCI-H1975 的培养基为含 10%胎牛血清 + 90% DMEM 培养基(Invitrogen 公司),其中还包括 100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素(Invitrogen 公司)抗生素。放置于 37℃且含 5% CO₂ 细胞培养箱孵育。

2.4. qRT-PCR 实验

总 RNA 提取试剂盒分离 LUCA 组织后,用 Prime-Script RT Reagent (TAKARA)试剂盒进行逆转录,再用 Quanta bio PerfeCta SYBR Green FastMix (艾普拜生物)进行 qRT-PCR,按试剂说明书进行实验。

2.5. 细胞增殖活性实验

在指定的时间(12、24、48 和 72 h), 用 10 μ L CCK-8 溶液在 96 孔板中处理 NCI-H1975 细胞系, 并在孔中再孵育 1 小时。最后, 使用酶标仪评估 450 nm 处的吸光度。结果分析: 增殖比率 = (降低表达/过表达 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 细胞实验组 - 无细胞对照)/(无敲低表达/过表达 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 细胞阴性对照 - 无细胞对照) $\times$ 100%。

2.6. 统计学分析

所有数据均采用 GraphPad Prism 8.0 和 SPSS 16.0 软件进行分析, 计量数据用均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示, 组间均数的比较采用 t 检验, 计数资料采用 χ^2 检验。通过 Kaplan-Meier 统计方法分析 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 表达对肺腺癌患者生存预后的影响。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3. 结果

3.1. LUCA 组织中 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 的表达水平

如图 1 显示, qRT-PCR 实验结果显示在 71 对 LUCA 组织中 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 表达水平为 3.400 ± 0.238 , 明显高于癌旁正常组织 NC (其值设定为 1) ($t = 10.064$, $P = 0.000 < 0.05$)。该实验提示 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 在 LUCA 中可能发挥促癌基因的作用。

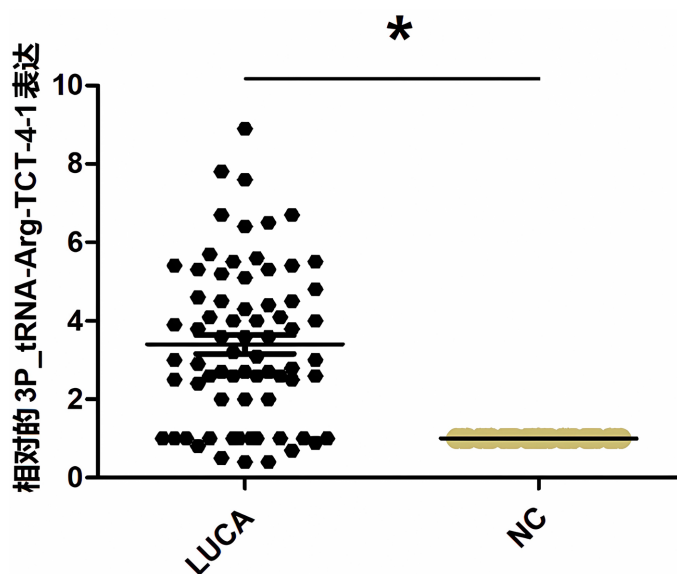


Figure 1. Results of qRT-PCR experiment. The expression level of 3P_tRNA-ARG-TCT-4-1 was up-regulated in LUCA

图 1. qRT-PCR 实验结果。3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 在 LUCA 中表达水平上调

3.2. 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 表达与 LUCA 临床特征的关联性

按 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 表达水平分为两组: 高表达组(54 例, 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 表达水平高于对照组)和正常/低表达组(17 例, 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 表达水平等于或低于对照组)。通过统计分析得出 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 的表达与 LUCA 的分化程度($\chi^2 = 11.112$, $P = 0.001$)、肿瘤大小($\chi^2 = 4.616$, $P = 0.032$)密切相关(P 均 < 0.05), 而与患者年龄、性别、肿瘤淋巴结转移和 TNM 分期之间无相关性(P 均 > 0.05), 见表 1。这一结果提示高表达的 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 参与了肺癌细胞的分化和增殖过程。

Table 1. Relationship between expression of 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 in LUCA and clinical features
表 1. 肺腺癌组织 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 表达与临床特征的关系

指标		高表达组(n = 54)	正常/低表达组(n = 17)	χ^2	P
性别	男	44	10	3.645	0.056
	女	10	7		
年龄	<55 岁	18	6	0.022	0.882
	≥55 岁	36	11		
肿瘤大小(直径)	≤5 cm	22	12	4.616	0.032
	>5 cm	32	5		
分化程度	中低分化	40	5	11.112	0.001
	高分化	14	12		
淋巴结转移	有	26	5	1.845	0.174
	无	28	12		
TNM 分期	I~II 期	30	10	0.056	0.813
	III 期	24	7		

3.3. 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 对肺癌细胞增殖活性的影响

正如 2.2 实验结果提示 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 与肿瘤直径大小(直径)密切相关, 因此进一步通过 CCK-8 实验研究 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 对肺腺癌细胞增殖活性的影响。实验结果如图 2 显示: 在 72 h 时, 过表达 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 后 NCI-H1975 细胞的增殖活性为 0.89 ± 0.03 , 明显高于对照组 0.69 ± 0.02 ($P < 0.05$); 而降低 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 表达后 NCI-H1975 细胞的增殖活性为 0.56 ± 0.02 , 明显低于对照组 0.70 ± 0.02 ($P < 0.05$)。该实验结果表明 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 能促进肺癌细胞的增殖活性, 有助于肿瘤的生长。

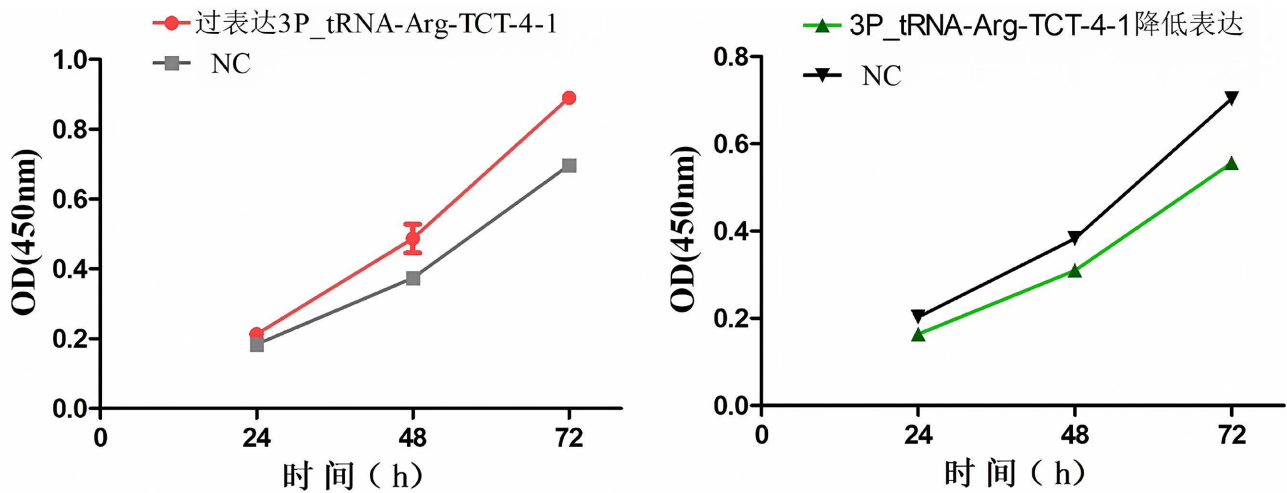


Figure 2. Proliferative activity of CCK-8. (A) After overexpression of 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1, proliferation activity of NCI-H1975 cells was increased ($P < 0.05$); (B) The proliferation activity of NCI-H1975 cells was decreased by decreasing the expression of 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 ($P < 0.05$)

图 2. CCK-8 增殖活性实验。(A) 过表达 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 后, NCI-H1975 细胞增殖活性升高($P < 0.05$); (B) 降低 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 表达则 NCI-H1975 细胞增殖活性下降($P < 0.05$)

3.4. 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 表达对肺腺癌患者生存预后的影响

3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 高表达组中位 Overall survival 生存时间为 22 个月(四分位区间 4~44 个月), 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 正常或阴性表达组中位 Overall survival 为 31 个月(四分位区间 9~50 个月)。正常或阴性表达组 Overall survival 明显长于高表达组($\chi^2 = 5.885$, $P = 0.002 < 0.05$), 见图 3。

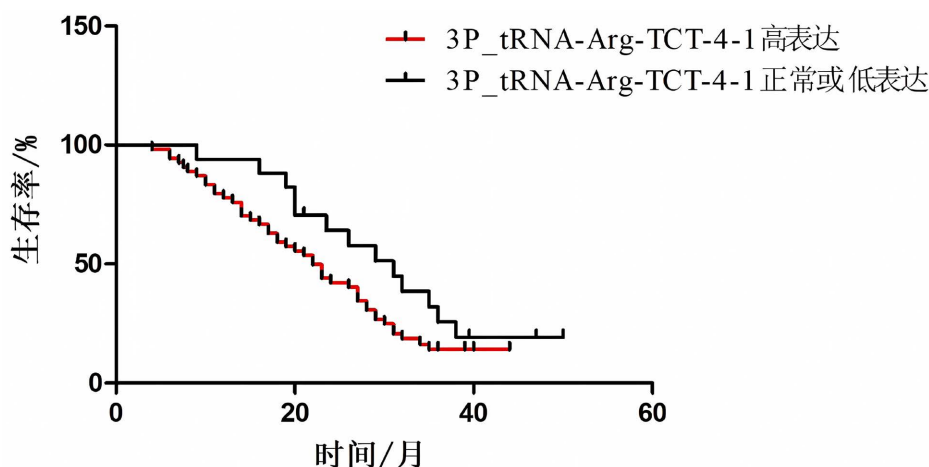


Figure 3. Survival curve of 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 expression and prognosis in patients with LUCA
图 3. 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 表达与肺腺癌患者预后的生存曲线图

4. 讨论

肺癌已成为世界范围内的致命恶性肿瘤, 主要组织病理学亚型为非小细胞肺癌和小细胞肺癌, 而非小细胞肺癌的 80% 以上[1] [2]。肺腺癌(LUAD)是最常见的非小细胞肺癌亚型, 5 年生存率约为 15% [1]。目前虽然在治疗肺癌上取得了很大的进展, 其复发和耐药仍然没有得到有效控制, 因此, 探索新的诊断和治疗方法至关重要。

越来越多的证据表明, TRDFs 调节细胞内基因转录、蛋白质翻译和表观遗传[7]-[11]。tRFs 参与多种分子调控机制, 如靶基因的 miRNA 样沉默、RNA 加工和降解、组蛋白修饰、核糖体组装和活性以及未折叠蛋白反应[12] [13]。此外, TRDF 在包括癌症等许多疾病中发挥关键作用[8]-[11]。例如, Ma 等人[14]发现 tRF-20-S998LO9D 在乳腺浸润性癌、头颈部鳞状细胞癌、肾透明细胞癌、肺鳞状细胞癌、和子宫内膜癌等多种癌症中均有高表达。抑制 tRF-20-S998LO9D 导致乳腺癌(MCF-7)和肺鳞癌(sk-mes1)细胞的细胞增殖减少。在多种癌症中, tRF-20-S998LO9D 升高预示预后不良。

在不同类型的肺癌中也有 TRDFs 的表达异常, 例如, 与健康个体相比, 非小细胞肺癌(NSCLC)患者和早期 NSCLC 患者外泌体中 tRF-Leu-TAA-005、tRF-Asn-GTT-010、tRF-Ala-AGC-036、tRF-Lys-CTT-049 和 tRF-Trp-CCA-057 的表达水平显著降低; 该结果这表明这五种外泌体 TRDFs 可能是 NSCLC 的有希望的诊断生物标志物[15]。Shi [16]等人通过分析三对 LUAD 组织中的 TRDFs 表达, 发现 tRF-29-79 在 LUAD 中下调, 而 tRF-29-79 的下调与较差的预后相关。功能上 tRF-29-79 可抑制 LUAD 细胞的增殖、迁移和侵袭。机制上 tRF-29-79 与 RNA 结合蛋白 PTBP1 相互作用, 促进 PTBP1 从细胞核到细胞质的运输, 从而调节 SLC1A5 pre-mRNA 的 3'非翻译区(UTR)的选择性剪接, 从而发挥其抗癌功能。Magesh [17]等人研究发现在吸烟诱导的肺鳞状细胞癌(LUSC)和非吸烟诱导的 LUSC 原发肿瘤样本中, TRDFs 表达差异很大, 表明烟草烟雾可能调节 TRDFs 表达, 促进癌症的发生和发展。本实验通过分析 NCBI 在线数据集 GSE83527、GSE62182 和 GSE110907 得到 LUAC 中差异表达的 tRNA 衍生片段, 其中 3P_tRNA-Arg-TCT-

4-1 表达升高, 然后对 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 在 LUCA 中的具体作用还尚未明了, 这就是本文的研究所在。

本研究 qRT-PCR 实验提示在肺腺癌组织中 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 表达水平高于癌旁正常肺组织, 提示 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 在肺腺癌的发生发展过程中起着促癌基因的作用。也说明了 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 作为 TRDFs 的一员, 在肺腺癌的发生发展中发挥了重要的作用和功能。分析 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 与临床参数的关系上, 统计分析发现高表达的 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 与肺腺癌的肿瘤直径大小、分化程度和生存预后密切相关, 而与患者年龄、性别、淋巴结转移和 TNM 分期之间无相关性。这一结果表明, 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 参与了肺腺癌细胞的增殖和分化, 即 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 在肺腺癌中表达水平越高, 肿瘤细胞分化越低, 越能生长增殖, 且患者预后不佳, 进一步说明 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 是一个促癌基因, 可成为肺腺癌增殖和预后判断的生物标志物。TNM 分期中的 T 代表原发肿瘤的大小和浸润深度, 但本研究结果显示 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 表达与肺腺癌的 TNM 分期无关, 但 $P = 0.056$, 也接近有统计学意义, 这可能是本研究标本数量偏少有关, 今后会进一步加大样本数目研究。另外通过 CCK-8 实验表明过表达 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 后, 细胞的增殖活性升高; 降低 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 表达后, 细胞的增殖活性下降, 再次提示 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 促进肺腺癌细胞的增殖活性, 参与了肺腺癌的生长过程。

5. 结论

综上所述, 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 在肺腺癌组织中表达水平上调, 与 LUCA 的肿瘤大小和生存预后密切相关; 可以作为 LUCA 生长的标志物和预后判断的指标。本研究探讨了 3P_tRNA-Arg-TCT-4-1 在肺腺癌增殖过程和预后判断中的作用, 为今后诊治生长旺盛的肺腺癌提供新策略。

参考文献

- [1] Siegel, R.L., Miller, K.D., Wagle, N.S. and Jemal, A. (2023) Cancer Statistics, 2023. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **73**, 17-48. <https://doi.org/10.3322/caac.21763>
- [2] Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A. and Jemal, A. (2018) Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **68**, 394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- [3] Blechter, B., Chien, L., Chen, T., Chang, I., Choudhury, P.P., Hsiao, C., et al. (2023) Polygenic Risk Score, Environmental Tobacco Smoke, and Risk of Lung Adenocarcinoma in Never-Smoking Women in Taiwan. *JAMA Network Open*, **6**, e2339254. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2023.39254>
- [4] Schimmel, P. (2017) The Emerging Complexity of the tRNA World: Mammalian tRNAs Beyond Protein Synthesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **19**, 45-58. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.77>
- [5] Yu, M., Lu, B., Zhang, J., Ding, J., Liu, P. and Lu, Y. (2020) tRNA-Derived RNA Fragments in Cancer: Current Status and Future Perspectives. *Journal of Hematology & Oncology*, **13**, Article No. 121. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00955-6>
- [6] Tosar, J.P. and Cayota, A. (2020) Extracellular tRNAs and tRNA-Derived Fragments. *RNA Biology*, **17**, 1149-1167. <https://doi.org/10.1080/15476286.2020.1729584>
- [7] Zhu, L., Ge, J., Li, T., Shen, Y. and Guo, J. (2019) tRNA-Derived Fragments and tRNA Halves: The New Players in Cancers. *Cancer Letters*, **452**, 31-37. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.03.012>
- [8] Balatti, V., Pekarsky, Y. and Croce, C.M. (2017) Role of the tRNA-Derived Small RNAs in Cancer: New Potential Biomarkers and Target for Therapy. *Advances in Cancer Research*, **135**, 173-187. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2017.06.007>
- [9] Kim, H.K., Fuchs, G., Wang, S., Wei, W., Zhang, Y., Park, H., et al. (2017) A Transfer-RNA-Derived Small RNA Regulates Ribosome Biogenesis. *Nature*, **552**, 57-62. <https://doi.org/10.1038/nature25005>
- [10] 周洁, 王磊, 王成海. 结直肠癌中 5'tRNA-Val-CAC 对增殖的影响及病理意义[J]. 实用临床医药杂志, 2022, 26(12): 96-101.

-
- [11] Huang, B., Yang, H., Cheng, X., Wang, D., Fu, S., Shen, W., *et al.* (2017) tRF/miR-1280 Suppresses Stem Cell-Like Cells and Metastasis in Colorectal Cancer. *Cancer Research*, **77**, 3194-3206. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-16-3146>
- [12] Shaukat, A., Kaliatsi, E.G., Stamatopoulou, V. and Stathopoulos, C. (2021) Mitochondrial tRNA-Derived Fragments and Their Contribution to Gene Expression Regulation. *Frontiers in Physiology*, **12**, Article 729452. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.729452>
- [13] Wen, J., Huang, Z., Li, Q., Chen, X., Qin, H. and Zhao, Y. (2021) Research Progress on the tsRNA Classification, Function, and Application in Gynecological Malignant Tumors. *Cell Death Discovery*, **7**, Article No. 388. <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00789-2>
- [14] Ma, J. and Liu, F. (2022) Study of tRNA-Derived Fragment tRF-20-S998LO9D in Pan-Cancer. *Disease Markers*, **2022**, Article 8799319. <https://doi.org/10.1155/2022/8799319>
- [15] Zheng, B., Song, X., Wang, L., Zhang, Y., Tang, Y., Wang, S., *et al.* (2022) Plasma Exosomal tRNA-Derived Fragments as Diagnostic Biomarkers in Non-Small Cell Lung Cancer. *Frontiers in Oncology*, **12**, Article 1037523. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1037523>
- [16] Shi, Y., Pan, Z., Feng, Y., Zhou, Q., Wang, Q., Wang, H., *et al.* (2024) tRF-29-79 Regulates Lung Adenocarcinoma Progression through Mediating Glutamine Transporter SLC1A5. *Carcinogenesis*, **45**, 409-423. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgae010>
- [17] Magesh, S., Gande, P., Yalamarty, R., John, D., Chakladar, J., Li, W.T., *et al.* (2023) Characterization of tRNA-Derived Fragments in Lung Squamous Cell Carcinoma with Respect to Tobacco Smoke. *International Journal of Molecular Sciences*, **24**, Article 5501. <https://doi.org/10.3390/ijms24065501>