

CDK4基因在肺癌中的表达及其意义

李保林¹, 钟金琼², 邹丽君³, 胡恭华³, 高艳芳³

(1. 赣南医学院基础医学院; 2. 赣南医学院第一附属医院检验科; 3. 赣南医学院公共卫生与健康管理学院, 江西 赣州 341000)

摘要:目的: 研究 *CDK4* 基因在肺癌中的表达及其作用, 为肺癌的治疗及预后提供依据。方法: (1) 从 TCGA 数据库中获取肺癌数据, 采用 R 软件对 *CDK4* 基因在肺癌中突变率进行统计学分析, 并用卡方检验比较不同肺癌病理分型中 *CDK4* 基因突变率差异情况; (2) 用配对 *t* 检验方法对癌组织跟癌旁组织 *CDK4* 基因差异表达进行比较; (3) 对 293 例肺癌组织样本的 *CDK4* mRNA 表达水平使用单因素 Log-rank 检验, 分析 *CDK4* mRNA 与肺癌无复发生存时间的关系, 并用 COX Regression model 校正 TNM 分期因素后, 再进一步对患者年龄进行相关性分析, 对患者性别、T 分期、N 分期、M 分期进行方差分析。结果: (1) 肺鳞状细胞癌 *CDK4* 基因突变率为 0.0014; 肺腺癌 *CDK4* 基因突变率为 0.04; 小细胞肺癌 *CDK4* 基因突变率为 0; Pan-Cancer *CDK4* 基因突变率为 0.04; 采用卡方检验发现肺腺癌、肺鳞状细胞癌和小细胞肺癌中 *CDK4* 基因突变差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。 (2) 配对 *t* 检验结果显示, 与癌旁组织相比, *CDK4* 基因在癌组织中显著上调 ($P < 0.01$)。 (3) 单因素 Log-rank 生存分析 *CDK4* 基因与预后关系表明, *CDK4* 基因与肺癌预后有关 ($P < 0.01$)。 (4) 对 *CDK4* 基因与临床特征 (TNM 分期、性别) 进行方差分析, 结果显示, *CDK4* 基因与患者性别、年龄、肿瘤远处转移无明显相关, *CDK4* 基因与肿瘤淋巴结侵犯、肿瘤大小呈正相关 (P 均 < 0.01)。结论: 不同病理分型肺癌中 *CDK4* 基因突变率不同, *CDK4* 基因与肺癌发生、发展密切相关, 可作为判断肺癌淋巴结转移、预后的一项新指标。

关键词: 肺癌; *CDK4* 基因; 预后分析

中图分类号: R361⁺.2 文献标志码: A 文章编号: 1001-5779(2023)01-0001-05

DOI: 10.3969/j.issn.1001-5779.2023.01.001

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



The expression of *CDK4* in lung cancer and its significance

LI Bao-lin¹, ZHONG Jin-qiong², ZOU Li-jun³, HU Gong-hua³, GAO Yan-fang³

(1. School of Basic Medicine, Gannan Medical University; 2. Department of Laboratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Gannan Medical University; 3. School of Public Health and Health Management, Gannan Medical University, Ganzhou, Jiangxi 341000)

Abstract: Objective: To study the expression and function of *CDK4* gene in lung cancer, and to provide basis for the treatment and prognosis of lung cancer. **Methods:** (1) Lung cancer data were obtained from the TCGA database, and R software was used to statistically analyze the mutation rate of *CDK4* gene in lung cancer, and the chi-square test was used to compare the difference in the mutation rate of *CDK4* gene in different pathological types of lung cancer; (2) With paired T test, the differential expression of *CDK4* gene in cancer tissue and adjacent tissue was compared; (3) The *CDK4* mRNA expression level of 293 lung cancer tissue samples was analyzed by single factor log-rank test to analyze *CDK4*. The relationship between mRNA and recurrence-free survival time of lung cancer was analyzed, and the COX Regression model was used to correct TNM staging factors, and then further correlation analysis was performed on patients' age, and variance analysis was performed on patient gender, T stage, N stage, and M stage. **Results:** (1) The mutation rate in lung

基金项目: 国家自然科学基金项目(81903364); 江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ170862); 赣南医学院校级重点项目和博士启动基金项目(QD201601, ZD201701)

作者简介: 李保林, 女, 硕士, 讲师, 研究方向: 分子毒理学。E-mail: libaolin67@163.com

通信作者: 高艳芳, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 环境毒理学。E-mail: gaoyanfang1201@163.com

投稿网址: <http://gnyxyxb.gmu.cn>

— 1 —

squamous cell carcinoma was 0.001 4; the mutation rate in lung adenocarcinoma was 0.04; the mutation rate in small cell lung cancer was zero; the pan-cancer mutation rate was 0.04; There was a statistically significant difference in *CDK4* gene mutation between squamous cell carcinoma and small cell lung cancer ($P < 0.01$). (2) The results of paired T test showed that compared with adjacent tissues, *CDK4* gene expression was significantly up-regulated in cancer tissues ($P < 0.01$). (3) Univariate log-rank survival analysis showed that the relationship between *CDK4* gene and prognosis showed that *CDK4* gene was related to the prognosis of lung cancer ($P < 0.01$). (4) Variance analysis was performed on *CDK4* gene and clinical characteristics (TNM stage, gender), and age correlation analysis was performed. The results showed that: *CDK4* gene was positively correlated with tumor lymph node invasion and tumor size ($P < 0.01$). **Conclusion:** The mutation rate of *CDK4* gene in different pathological types of lung cancer is different. *CDK4* gene is closely related to the occurrence and development of lung cancer, and it can be used as a new indicator for judging lymph node metastasis and prognosis of lung cancer.

Key words: Lung cancer; *CDK4* gene; Prognostic analysis

根据2018年全球癌症统计数据,在两性中,肺癌是最常诊断的癌症(占总病例数11.6%)和癌症死亡的主要原因(占总癌症死亡人数的18.4%)^[1]。在主要类型的癌症中,肺癌被认为是世界上最慢性的癌症。肺癌的常规治疗包括不同的医疗干预措施,如化疗、手术切除和放射治疗。然而,这种方法缺乏特异性,也会损害邻近的正常细胞^[2]。因此,寻找手术、放疗和化疗以外治疗肺癌的方法有很重要的意义。

细胞周期调控蛋白是维持正常有序细胞周期的关键因素,细胞周期蛋白依赖性激酶4(Cyclin-dependent kinase 4, *CDK4*)蛋白与细胞周期素(CyclinD)形成*CDK-cyclinD*复合物,使晚G1期细胞跨越限制点向S期发生转换。*CDK4*已被证实是一种癌基因,在人类大多数肿瘤细胞中过表达,其过表达可促进肿瘤进展^[3-4],同时将*CDK4*基因敲除及应用针对*CDK4*抑制剂联合其他抑制剂作用于多种肿瘤细胞时,肿瘤细胞的生长得到有效控制。因此,本研究拟分析*CDK4*基因在肺癌中的表达情况及其意义,有利于指导临床治疗、评估患者预后,为制定科学有效的肺癌防制策略和实施干预提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 资料来源 从The Cancer Genome Atlas (TCGA)数据库(<http://www.cbioportal.org/index.do>)收集肺鳞状细胞癌、肺腺癌、小细胞肺癌、Pan-Cancer病例,从Gene Expression Omnibus(GEO)数据GSE19804(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE19804>)中收集*CDK4* mRNA表达情况,从GEO数据GSE30219(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE30219>)中收集*CDK4* mRNA表达情况及患者预

后信息。

1.2 资料分析方法

1.2.1 采用R软件,对*CDK4*基因在肺癌中突变率进行统计学分析,并用卡方检验比较不同肺癌病理分型中*CDK4*基因突变情况。

1.2.2 将GEO数据GSE19804中60例肺癌组织样本的癌组织和癌旁正常组织进行配对*t*检验,分析*CDK4*基因的表达差异情况。

1.2.3 将GEO数据GSE30219的肺癌组织样本使用单因素Log-rank检验,分析*CDK4* mRNA与肺癌无复发生存时间的关系,并用COX Regression model校正TNM分期因素后,再进一步对患者年龄进行相关性分析,对患者性别、T分期、N分期、M分期进行方差分析,得出*CDK4*基因与这些因素之间的关系。

1.3 质量控制 将数据按照基因组检测平台文件要求进行处理,由两人独立进行并对结果进行比对。

2 结果

2.1 不同肺癌病理分型中的*CDK4*基因突变率

见表1。对于肺鳞状细胞癌,从TCGA,Provisional数据库中获得的数据显示:观察例数为522例,突变率为0.001 9;从TCGA,Nature 2012数据库中获得的数据显示:观察例数为178,突变率为0。总计观察例数700例,突变率为0.001 4。

对于肺腺癌,从Broad,Cell 2012数据库中获得的数据显示:观察例数为183例,突变率为0.06;从TCGA,Nature2014数据库中获得的数据显示:观察例数为230例,突变率为0.07;从TSP,Nature 2008数据库中获得的数据显示:观察例数为163例,突变率为0;从MSKCC,2015数据库中获得的数据显示:观察例

数为34例,突变率为0;从TCGA,Provisional数据库中获取数据显示:观察例数为504例,突变率为0.03。总计观察例数为1114例,突变率为0.04。

对于小细胞肺癌,从CLCGP,Nat Genet 2012数据库中获取数据显示:观察例数为29例,突变率为0;从U Cologne, Nature 2015数据库中获取数据显示:观察例数为110例,突变率为0;从Johns Hopkins,Nat Genet 2012数据库中获取数据显示:观察例数为51例,突变率为0。总计观察例数为190例,

突变率为0。

对于Pan-Cancer,从TCGA,Nat Genet 2016数据库中获取数据显示:观察例数为1144例,突变率为0.04。

采用卡方检验比较不同肺癌病理分型中CDK4基因突变情况,结果肺腺癌、肺鳞状细胞癌和小细胞肺癌中CDK4基因突变差异有统计学意义($\chi^2=34.035, P<0.01$)。

表1 CDK4基因在不同肺癌病理分型中的突变率

数据来源	肺癌类型	观察例数	CDK4		参考文献
			n	ratio	
TCGA, Provisional	鳞状细胞癌	522	1	0.0019	
TCGA, Nature 2012		178	0	0.00	[5]
Broad, Cell 2012		183	11	0.06	[6]
TCGA, Nature 2014		230	17	0.07	[7]
TSP, Nature 2008	肺腺癌	163	0	0.00	[8]
MSKCC 2015		34	0	0.00	[9]
TCGA, Provisional		504	17	0.03	
CLCGP, Nat Genet 2012	小细胞肺癌	29	0	0.00	[10]
U Cologne, Nature 2015		110	0	0.00	[11]
Johns Hopkins, Nat Genet 2012		51	0	0.00	[5]
TCGA, Nat Genet 2016	Pan-Cancer	1144	49	0.04	[12]

2.2 肺癌与癌旁组织中CDK4基因表达 从GSE19804数据库中获取数据显示:在60例癌跟癌旁正常组织样本的配对比较,与癌旁组织相比,CDK4基因表达在癌组织中显著上调($t=8.06, df=59, P<0.01$),见表2。

表2 CDK4基因在GSE19804中的结果

组别	mean	STD	t	df	P
癌组织	10.5364	0.4896	8.06	59	<0.01
正常组织	10.0770	0.4414			

2.3 CDK4基因与预后的关系 从GSE30219获取的293例样本分析CDK4基因与肺癌患者无复发生存时间的关系,单因素Log-rank生存分析结果:CDK4基因与肺癌生存预后相关($P<0.01$),见表3。

2.4 CDK4基因与临床特征的关系 从GSE30219数据库中获取的数据,对患者CDK4基因进行相关性分析,结果显示,CDK4基因与肿瘤患者性别、年龄、远处转移(M分期)之间的关系差异无统计学意义($P>0.05$),但与肺癌的淋巴结受累程度和范围(N分期)、原发肿瘤体积(T分期)呈正相关。见表4。

表3 CDK4基因与预后的cox生存分析(GSE30219)

样本量	Z	B	P
293	3.6	0.5156	<0.01

表4 CDK4基因与临床特征的关系(GSE30219)

临床特征	F/r	P	备注
M(转移与否)	1.77	0.057	(组间)方差分析
N(淋巴结分级)	19.06	<0.01	(组间)方差分析
T(肿瘤大小分级)	14.6	<0.01	(组间)方差分析
性别	1.9	0.169	(组间)方差分析
年龄	0.1057*	0.071	相关分析

注:*为r值。

3 讨论

CDK4基因^[13]位于人类第12号染色体长臂13-14区(12q13-12q14),mRNA序列全长为2.14kb,eDNA全长912bp,可翻译产生含有303个氨基酸的多肽链,蛋白分子量为34KD。CDK4基因是丝氨酸/苏氨酸激酶家族的成员,其有序激活和失活可调控细胞周期有序进行。CDK4基因是细胞周期的正

性调节因子, *CDK4* 基因过表达能导致细胞分裂加速, 促进肿瘤发生发展。邱秀华等^[3]研究发现, *CDK4* 在肺癌细胞中的表达高于癌旁肺组织, 肺癌组织中高于正常水平的 *CDK4* 基因使肺癌组织的增殖周期加快。本研究我们通过配对 *t* 检验比较分析 *CDK4* 基因在 60 例癌跟癌旁正常组织中的表达情况得出, *CDK4* 基因表达在癌组织中显著上调, 说明 *CDK4* 基因与肺癌的发生密切相关。

CDK4 基因过表达机制研究比较少, 基因表达受调控序列、调控蛋白、调节 RNA 等多因素共同调节, 在生物体内外环境的刺激下, 顺式作用元件的基因突变、基因扩增导致的多拷贝、mRNA 量增高可能导致基因过表达。杨丹^[3]在细胞周期调控与肿瘤基因治疗的研究中发现, 在引起细胞周期紊乱失控, 诱导肿瘤发生的调控因子中, *CDK4* 基因与肿瘤发生关系最为密切, 结果显示, *CDK4* 基因突变率 < 1%。尹信等^[14]研究发现, 非小细胞肺癌癌组织 *CDK4* 基因阳性表达 > 89.5%, 正常组织 < 15.6%。以上两者的结果不相符, 说明基因突变不是 *CDK4* 基因过表达的主要原因。但小细胞肺癌 *CDK4* 基因无突变与基因无明显过表达一致, 说明基因突变与过表达可能存在一定关联。

早期诊断及精确预后分析是提高肺癌患者生存率的关键, 所以能找到一种可及时反映肺癌的发生并准确预测患者预后情况的肿瘤标志物至关重要^[15]。国际上广泛采用 TNM 肿瘤分期系统, T 指肿瘤原发灶的情况, N 指区域淋巴结受累情况, M 指远处转移。根据淋巴结受累的程度和范围, 用 N0 ~ N3 表示。肿瘤的分级和分期是制订方案和估计预后的重要指标^[16]。本研究结果表明, *CDK4* 基因与肿瘤患者性别、年龄、远处转移无明显相关, 但与肺癌的淋巴结受累程度和范围、原发肿瘤体积显著相关, 淋巴结转移程度及 T 分期越高, *CDK4* 基因表达越高。这与张月等^[17]在 *CDK4* 胞浆中的表达与肺癌临床病理学特征及预后的关系研究中得出的结果相符。可初步认为 *CDK4* 基因与肺癌的发生、发展密切相关, 可作为判断肺癌淋巴结转移、预后的一项新指标, 并为肿瘤发病机理、临床治疗研究提供新思路。*CDK4/6* 抑制剂则通过选择性抑制 *CDK4/6* 功能, 阻止肿瘤细胞从 G1 期进展到 S 期。即使对 *CDK4/6* 信号明显激活的 NSCLC 患者, *CDK4/6* 抑制剂的单药治疗也不太可能非常有效。临床试验研究 *CDK4/6* 抑制剂联合 ERK、MEK 或 mTOR 抑制剂。即使这些组合最终比 *CDK4/6* 抑制剂单药治疗更有

效, 一个主要的挑战仍然是确定谁会对这些组合有反应的预测生物标志物^[18]。未来还需对 *CDK4/6* 抑制剂联合应用于不同分类肺癌治疗尤其 T 和 M 分期及预后方面进行深入研究, 达到提高肺癌患者的生存率和生存时间的目的。

综上所述, *CDK4* 基因在非小细胞肺癌中的过表达可促进非小细胞肺癌的发生发展, 降低患者的生存期, 同时, 从 *CDK4* 基因过表达机制、细胞内外刺激因素、肿瘤微环境、*CDK4/6* 抑制剂等多个角度研究 *CDK4* 基因在非小细胞肺癌中作用, 有利于获得更多的靶向治疗方法。

参考文献:

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6):394-424.
- [2] SHARMA P, MEHTA M, DHANJAL D S, et al. Emerging trends in the novel drug delivery approaches for the treatment of lung cancer[J]. Chem Biol Interact, 2019, 309: 108720.
- [3] 杨丹. 肿瘤靶向抗 *CDK4* 胞内抗体的抑瘤效应分析[D]. 长春: 吉林大学, 2010.
- [4] 邱秀华, 满晓波, 蒋虹, 等. 实时荧光定量 PCR 检测非小细胞肺癌中 *cdk4* 基因表达[J]. 第二军医大学学报, 2005, 26(9): 1071-1072.
- [5] CHARLES M R, STEFFEN D, ERIC W S, et al. Comprehensive genomic analysis identifies SOX2 as a frequently amplified gene in small-cell lung cancer[J]. Nat Genet, 2012, 44(10): 1111-1116.
- [6] MARCIN I, ALICE H B, PETER S, et al. Hammerman, mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing[J]. Cell, 2012, 150(6): 1107-1120.
- [7] THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma[J]. Nature, 2014, 511(7511): 543-550.
- [8] LI DING, GAD G, DAVID A W, et al. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma[J]. Nature, 2008, 455(7216): 1069-1075.
- [9] NAIYER A, MATTHEW D H, ALEXANDRA S, et al. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer[J]. Science, 2015, 348(6230): 124-128.

(下转第 9 页)

- [2] GÖLLNER S, OELLERICH T, AGRAWAL-SINGH S, et al. Loss of the histone methyltransferase EZH2 induces resistance to multiple drugs in acute myeloid leukemia [J]. *Nat Med*, 2017,23(1):69-78.
- [3] QIU Z, ZHU W, MENG H, et al. CDYL promotes the chemoresistance of small cell lung cancer by regulating H3K27 trimethylation at the CDKN1C promoter [J]. *Theranostics*, 2019,9(16):4717-4729.
- [4] JONES S, WANG T L, SHIH IE M, et al. Frequent mutations of chromatin remodeling gene ARID1A in ovarian clear cell carcinoma [J]. *Science*, 2010, 330 (6001) : 228-231.
- [5] DI CROCE L, HELIN K. Transcriptional regulation by Polycomb group proteins [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, 20(10):1147-1155.
- [6] MCCABE MT, OTT HM, GANJI G, et al. EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations [J]. *Nature*, 2012, 492 (7427) : 108-112.
- [7] KIM K H, ROBERTS C W. Targeting EZH2 in cancer [J]. *Nat Med*, 2016,22(2):128-134.
- [8] GARDNER E E, LOK B H, SCHNEEBERGER V E, et al. Chemosensitive relapse in small cell lung cancer proceeds through an EZH2-SLFN11 axis [J]. *Cancer Cell*, 2017,31(2):286-299.
- [9] KOSTER R, DI PIETRO A, TIMMER-BOSSCHA H, et al. Cytoplasmic p21 expression levels determine cisplatin resistance in human testicular cancer [J]. *J Clin Invest*, 2010,120(10):3594-3605.
- [10] HUANG J, ZHOU Y, THOMAS G S, et al. NEDD8 inhibition overcomes CKS1B-induced drug resistance by upregulation of p21 in multiple myeloma [J]. *Clin Cancer Res*, 2015,21(24):5532-5542.
- (收稿:2022-10-15)(修回:2023-01-04)
(责任编辑:敖慧斌)

(上接第 4 页)

- [10] STIRLINGD, MAGNESSR R, STONER, et al. Angiotensin II inhibits luteinizing hormone-stimulated cholesterol side chain cleavage expression and stimulates basic fibroblast growth factor expression in bovine luteal cells in primary culture [J]. *J Biol Chem*, 1990, 265 (1) : 5-8.
- [11] JULIE G, JING S L, SE J J, et al. Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer [J]. *Nature*, 2015,524(7563):47-53.
- [12] JOSHUA D C, ANTON A, JAEGIL, et al. Distinct patterns of somatic genome alterations in lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas [J]. *Nat Genet*, 2016,48(6):607-616.
- [13] KHATIB Z A, MATSUSHIME H, VALENTINE M, et al. Coamplification of the CDK4 gene with MDM2 and GLI in human sarcomas [J]. *Cancer Res*, 1993, 53 (22):5535.
- [14] 尹信,夏靖华,王磊. CDK4 与 Ki-67 在非小细胞肺癌中的表达及其意义 [J]. *临床与病理杂志*, 2018, 38 (12):2576-2582.
- [15] 李杏杏. Let-7 低表达与肺癌预后及 HMGA2 与肺癌发生发展相关性的 meta 分析 [D]. 长春:吉林大学, 2016.
- [16] 陈杰,周桥. 病理学(第 3 版)[M]. 北京:人民卫生出版社, 2015.
- [17] 张月,周颖,刘真,等. CDK4 蛋白在胞浆中的表达与肺癌临床病理学特征及预后的关系 [J]. *南方医科大学学报*, 2012,32(11):1572-1575.
- [18] PACHECO J, SCHENK E. CDK4/6 inhibition alone and in combination for non-small cell lung cancer [J]. *Oncotarget*, 2019,10(6):618-619.
- (收稿:2019-10-12)(修回:2022-09-27)
(责任编辑:刘仰斌)