网络出版时间:2024 - 11 - 18 15:40:04 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20241115.1541.009

CDKN3 在肿瘤中的表达及预后相关性分析

陈邦捷[1],王欣仪[2],杨祎品[1],李海文[3],邵 伟[4],顾康生[1]

([1] 安徽医科大学第一附属医院肿瘤内科,合肥 230022;[2] 安徽医科大学第一附属医院肿瘤放疗科,合肥 230022;[3] 安徽医科大学第三附属医院消化内科,合肥 230061;[4] 安徽医科大学基础医学院病原生物学教研室,合肥 230032)

摘要 目的 探讨细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 3(CDKN3)在不同肿瘤中的表达变化及其对肿瘤分期预后和免疫治疗的影响。**方法** 使用 TCGA、CCLE、ICGC 和 GTEx 数据库评估 CDKN3 在不同肿瘤中的表达特征;采用 GEPIA2 平台和 Kaplan-Meier 法分别评估 CDKN3 对肿瘤病理分期和生存预后的影响;采用 TIMER 平台评估 CDKN3 对肿瘤免疫微环境和免疫治疗的影响,并利用生物信息学方法进一步探讨 CDKN3 对免疫检查点和免疫治疗关键预测指标的影响。GeneMANIA 构建 CDKN3 的蛋白质 - 蛋白质相互作用(PPI)网络。京都基因和基因组百科全书(KEGG)以及基因本体(GO)数据库富集分析 CDKN3 相关的生物学过程和信号通路。通过转染 CDKN3 siRNA 验证 CDKN3 对 HepG2 细胞增殖、侵袭、迁移和凋亡的影响。**结果** CDKN3 在肿瘤中普遍高表达。CDKN3 的高表达通常与较晚的病理分期和不良的生存预后相关。CDKN3 表达水平与绝大部分免疫检查点呈负相关,与肿瘤突变负荷(TMB)、微卫星不稳定(MSI)和碱基配对修复(MMR)基因呈正相关。CDKN3 与细胞周期、细胞衰老和 p53 信号通路等相关。此外,EdU 染色、JC-1 染色、Transwell 和 Wound Healing 实验证实 CDKN3 促进 HCC 细胞的增殖、侵袭和迁移,抑制其凋亡。**结论** CDKN3 的异常表达与肿瘤的分期预后和免疫微环境特征密切相关,是一种潜在的肿瘤预后标志物和免疫治疗辅助靶点。

关键词 CDKN3;肿瘤;泛癌分析;预后评估;免疫治疗;生物标志物;肝细胞癌

中图分类号 R 730.49

文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492(2024)11 - 1944 - 15

doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2024.11.009

细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 3(cyclin-dependent kinase inhibitor 3, CDKN3),最早通过酵母双杂交筛选从 HeLa cDNA 文库中分离出来[1]。CDKN3 负责去磷酸化细胞周期蛋白依赖性激酶 1(cyclin-dependent kinase 1, CDK1)、CDK2 和 CDK3 的活化磷酸苏氨酸残基(pThr)[2]。CDKN3 在细胞周期调控中发挥关键作用[3],并且在多种肿瘤中出现异常表达。

然而,CDKN3 在肿瘤免疫治疗和肿瘤微环境中发挥的作用尚未得到系统分析,因此课题组检测了 34 种不同肿瘤组织和邻近正常组织中 CDKN3 的表达水平,以及 CDKN3 对肿瘤免疫细胞浸润的影响,特别探讨了 CDKN3 表达水平与动态免疫生物标志物,如肿瘤突变负荷(tumor mutation burden, TMB)和微卫星不稳定性(microsatellite instability, MSI),以及免疫检查点之间的相关性。该研究为阐明 CDKN3 在肿瘤治疗中的作用提供了基础,有助于确定 CDKN3 是否有望成为新的肿瘤治疗靶点和预后预测指标。

1 材料与方法

1.1 生物信息分析

1.1.1 *数据收集与处理* 泛癌分析的数据来自于 TCGA 和 CCLE 数据库,从 ICGC 数据库中提取与肝细胞癌(liver hepatocellular carcinoma, LIHC)相关的数据,并通过其门户网站进行分析。本课题组在 R 环境中使用 RMA 函数(R 版本:4.2.0, http://www.rproject.org/)对整个数据集进行过滤,删除缺失和重复的结果,并使用 $\log_2(TPM+1)$ 进行转换。患者的年龄、性别、肿瘤分期、临床分期和其他临床数据从门户网站检索。有关 TMB 和 MSI 的数据仅可从 TCGA 数据库获得。本研究通过分别计算重复

2024 - 07 - 20 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:82071770);安徽省重点研究与开发计划项目(编号:202004j07020044);合肥市自然科学基金项目(编号:2022033)

作者简介:陈邦捷,男,硕士研究生;

邵 伟,男,教授,博士生导师,通信作者,E-mail:shaowei@ahmu.edu.cn;

顾康生,男,教授,主任医师,博士生导师,通信作者,E-mail:gukangsheng@ahmu.edu.cn

中国知网 https://www.cnki.net

基因序列中插入或缺失事件的数量和每百万碱基对的总突变率来获得 TMB 和 MSI 值。

1.1.2 *CDKN3 表达水平与预后和临床分期的关系* GEPIA2 是一个在线平台(http://gepia2.cancer-pku.cn/#index),使用通用处理技术检查来自 TCGA 和 GTEx 数据库的 RNA 测序表达数据。GEPIA2 的"Survival"模块用于研究 CDKN3 表达与肿瘤预后之间的关系。此外,GEPIA2 还具有互动功能,包括基于病理分期的分析。

1.1.3 *Cox 回归分析和生存分析* 在 R 环境下,利用 TCGA 数据库,采用 Cox 回归分析法研究 CDKN3 表达与各癌症类型的总生存期(overall survival, OS)和无病生存期(disease free surviaval, DFS)之间的关系。将患者分为 CDKN3 高表达组和 CDKN3 低表达组后,使用 Kaplan-Meier 法绘制每种肿瘤类型相关的生存曲线。使用受试者工作曲线(receiver operating characteristic, ROC)和 R 包(documentation.org/packages/Survival)研究生存率。曲线之间的差异采用对数秩检验,$P<0.05$。

1.1.4 *免疫细胞浸润分析* Tumor Immune Estimation Resource(TIMER)是一个数据库驱动的网络应用程序(http://timer.cistrome.org/),计算 6 种主要免疫细胞类型(包括 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)的免疫细胞浸润得分,并评估肿瘤纯度。TIMER 先前已经计算并保存了 TCGA 数据库中泛癌数据的免疫细胞浸润评分,对浸润数据进行检索和检查可以确定 CDKN3 表达和浸润之间是否存在联系。

1.1.5 *CDKN3 表达水平和药物反应的关系* CellMiner(http://discover.nci.nih.gov/cellminer/)提示 CDKN3 表达与药物反应之间的关系。CellMiner 是为肿瘤研究设计的数据库和查询工具,旨在促进 NCI-60 癌细胞系的分子和药理学数据的整合与研究,由 60 个不同的人类癌症细胞系小组组成,已被美国国家癌症研究所的开发治疗项目用于筛选超过 10 万种化合物和天然物质。

1.1.6 *蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction,PPI)网络构建* GeneMANIA 是一个交互式网站(http://www.genemania.org),用于构建 PPI 网络,提供基因功能预测假设并识别具有相似作用的基因。该网络整合算法中使用了物理相互作用、共表达、共定位、基因富集分析、基因相互作用和网站预测等生物信息学方法。

1.1.7 *CDKN3 相关通路富集分析* 在 STRING 数据库中使用"CDKN3"和"Homo sapiens"进行搜索。设置了以下主要参数:最低交互作用分数要求[Low confidence (0.150)]、网络边缘的含义(evidence)、要显示的交互作用者的最大数目(no more than 50 interactors in the first shell)和活跃的交互作用源(experiments),最终检索到 CDKN3 结合蛋白。整合这两个数据集以进行京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)数据库富集分析。通过将基因列表上传到 Database for annotation, visualization, and integrated discovery (DAVID)平台,所选参数为"OFFICIAL_GENE_SYMBOL"和"Homo sapiens",R 软件包的"tidyr"和"ggplot2"显示富集的通路。"clusterProfiler"运行基因本体(gene ontology,GO)数据库富集分析。

1.1.8 *基于 Genomic Cancer Survival Analysis (GSCA)的 CDKN3 拷贝数变异分析* GSCA 是一个基于 TCGA 数据库整合多组学数据的网络服务器(http://bioinfo.life.hust.edu.cn/web/GSCA/)。GSCA 提供的研究包括拷贝数变异(copy number variation, CNV)、甲基化、通路活性和免疫浸润。本研究利用 GSCA 网站分析了不同肿瘤中 CDKN3 的 mRNA 水平与 CNV 之间的相关性。

1.1.9 *基于 GSCA 的 CDKN3 甲基化谱研究* 利用 GSCA 网站分析不同肿瘤中 CDKN3 的 mRNA 水平与甲基化之间的相关性。

1.2 分子生物学实验

1.2.1 *实验试剂和仪器* 改良 Eagle 培养基(美国 Grand Island Biological 公司);10% 热灭活胎牛血清和 1% 抗生素(100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 硫酸链霉素)、苯甲基磺酰氟购自中国西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;放射免疫分析缓冲试剂、双喹啉酸蛋白质测定试剂盒、JC-1 染色试剂盒购自中国碧云天生物技术有限公司;聚偏二氟乙烯膜(美国默克密理博公司);化学发光显色试剂盒(美国赛默飞世尔科技公司);EdU Apollo DNA 体外检测试剂盒(中国广州市锐博生物科技有限公司);兔抗 CDKN3、兔抗 MMP-2、兔抗 MMP-9、兔抗 Bax、兔抗 Bcl-2、兔抗 PCNA、兔抗 β-actin 购自英国 Abcam 公司;Quantity One 软件(4.6.2, 美国 Bio-Rad Laboratories);荧光显微镜(BX43, 日本奥林巴斯株式会社)。

1.2.2 *标本收集* 本研究经安徽医科大学第一附属医院伦理委员会(Quick-PJ 2023-05-30)批准。肝癌和癌旁组织取自安徽医科大学第一附属医院普外

中国知网 https://www.cnki.net

科。所有患者均根据 WHO 标准确诊为肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)并接受根治性手术。手术标本立即放入液氮中快速冷冻,然后在 -80 ℃ 冰箱中保存。所有参与者均知情同意。

1.2.3 细胞培养 人肝癌细胞株(HepG2 细胞)购自中国科学院分子细胞科学卓越创新中心(上海)。细胞在改良 Eagle 培养基中生长,含 10% 热灭活胎牛血清和 1% 抗生素(100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 硫酸链霉素)。细胞在 37 ℃、5% CO_2 的湿化培养箱中培养。

1.2.4 Western blot 使用放射免疫分析缓冲试剂和苯甲基磺酰氟提取总蛋白。使用双喹啉酸(BCA)蛋白质测定试剂盒测定蛋白质浓度。每个样品中的蛋白质经 10% 十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,并转移到聚偏二氟乙烯膜上。细胞膜用含 5% 脱脂奶粉的磷酸盐缓冲液阻断 1 h。转印膜与一抗在 4 ℃孵育过夜后,用 TBST(Tris 盐缓冲液 + Tween -20)洗涤 3 次,每次 15 min。用化学发光显色试剂盒显色,用 Quantity One 软件分析。所用抗体为兔抗 CDKN3(1∶1 000)、兔抗 MMP-2(1∶1 000)、兔抗 MMP-9(1∶1 000)、兔抗 Bax(1∶1 000)、兔抗 Bcl-2(1∶1 000)、兔抗 PCNA(1∶1 000)和兔抗 β-actin(1∶2 000)。

1.2.5 Transwell 实验 Transwell 实验可用于测定细胞迁移能力。将 100 ml 无血清培养基感染人 HepG2 细胞和 Matrigel,并将其加入上腔。然后在下腔加入 600 ml 添加 20% 胎牛血清的 DMEM。2 d 后,从 5%(v/v)CO_2 培养箱中取出 24 孔板,用 10% 甲醛溶液固定上腔室的细胞,并用 0.1% 结晶紫染色 20 min 和 15 min。在显微镜下随机选择 5 个视野,计数视野中的细胞数。在进行 Transwell 的侵袭实验时,还需要用铺有 Matrigel 的滤膜将上腔和下腔隔开。

1.2.6 Wound Healing 实验 将处于对数生长期的细胞以 1×10^6/ml 的密度接种于 6 孔板中。培养 24 h 直至细胞达到底部面积的 70%。在培养基中加入不含胎牛血清的培养基。用 10% 甲醛溶液固定细胞,用 0.1% 结晶紫染色 20 min 和 15 min。用倒置显微镜观察线性划痕并拍照。

1.2.7 EdU 染色检测 使用 EdU Apollo DNA 体外检测试剂盒进行 EdU 检测。在 24 孔板的每孔中接种约 6×10^3 个细胞,培养至正常生长阶段。过夜培养后,在培养基中加入 50 μmol/L EdU,在 37 ℃/5% CO_2 条件下培养 2 h,然后用 4% 多聚甲醛、甘氨酸和 1% Triton X-100 处理细胞。然后用 Apollo 和 Hoechst 染色细胞 30 min。使用荧光显微镜采集图像。

1.2.8 JC-1 染色检测 JC-1 染色试剂盒用于检测不同组间线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)的差异。细胞用 PBS 冲洗 1 次,加入 1.5 ml JC-1 染色液,黑暗培养 20 min。然后用 1 × 冷染色缓冲液洗涤细胞 2 次。最后用荧光显微镜观察不同样品中的 MMPs。

1.3 统计学处理 使用 Spearman 检验评估 CDKN3 表达水平与免疫浸润评分、TMB、MSI、错配修复(mismatch repair, MMR)和 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)基因之间的关系。使用偏相关回归分析评估 CDKN3 表达水平与各种免疫细胞浸润程度之间的关系。配对和非配对 t 检验用于比较泛癌组织和正常组织中 CDKN3 的表达水平。细胞和分子生物学实验部分,使用 SPSS(22.0 版本)进行统计分析。为了确定两组之间的差异是否具有统计学意义,进行双尾 Student t 检验。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CDKN3 在肿瘤中的表达变化及其与病理分期的关系 利用 GTEx 数据库分析了 CDKN3 在正常组织中的表达水平(图 1A)。利用 CCLE 数据库分析了 CDKN3 在不同肿瘤细胞株和正常细胞系中的表达水平,结果显示 CDKN3 在肿瘤细胞中的表达水平明显高于正常细胞,且在肿瘤细胞中表达水平的异质性范围更窄(图 1B)。在 TCGA 数据库中,本课题组获得了 26 种肿瘤组织和邻近正常组织中 CDKN3 的表达情况。其中,CDKN3 在 24 种肿瘤(图 1C, $P<0.05$)中,表达水平均明显高于相应的正常组织。本研究进一步结合 TCGA 和 GTEx 数据库分析了 CDKN3 在 34 种不同肿瘤组织和邻近正常组织中的表达情况。基于整合数据库,CDKN3 在 32 种肿瘤中表达明显升高(图 1D,$P<0.05$)。然而,在睾丸生殖细胞瘤癌(图 1D,$P<0.001$)和甲状腺癌(图 1D, $P<0.05$)中,CDKN3 明显低表达。此外,在 GEPIA2 平台上,CDKN3 在肿瘤不同病理分期中的表达水平差异有统计学意义(图 2,$P<0.05$)。

2.2 CDKN3 在肿瘤中的预后和生存分析 在 TCGA 数据集中,使用 Cox 比例风险模型阐明了 CDKN3 表达水平对不同肿瘤患者 OS 的预后价值(图

中国知网 https://www.cnki.net

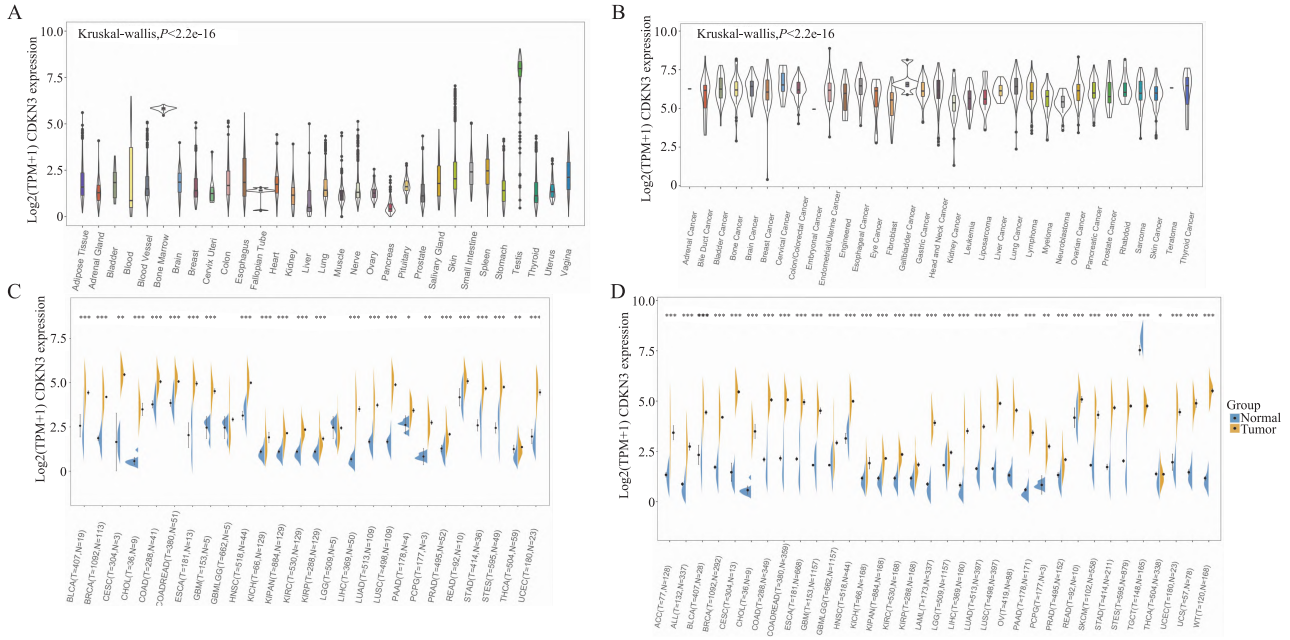

图 1　CDKN3 在肿瘤中的表达变化

Fig. 1　Expression changes of CDKN3 in tumors

A: Data from the GTEx database demonstrate CDKN3 mRNA expression levels in healthy tissues from multiple organs[$\log_2(TPM+1)$]; B: The expression of CDKN3 in tumor cell lines was different from normal cell lines in CCLE database; C: Expression differences of CDKN3 in 26 tumor tissues and neighboring normal tissues in TCGA database; D: The expression of CDKN3 in 34 tumor tissues and neighboring normal tissues was different in TCGA and GTEx databases; * $P<0.05$, * * $P<0.01$, * * * $P<0.001$ *vs* normal tissue.

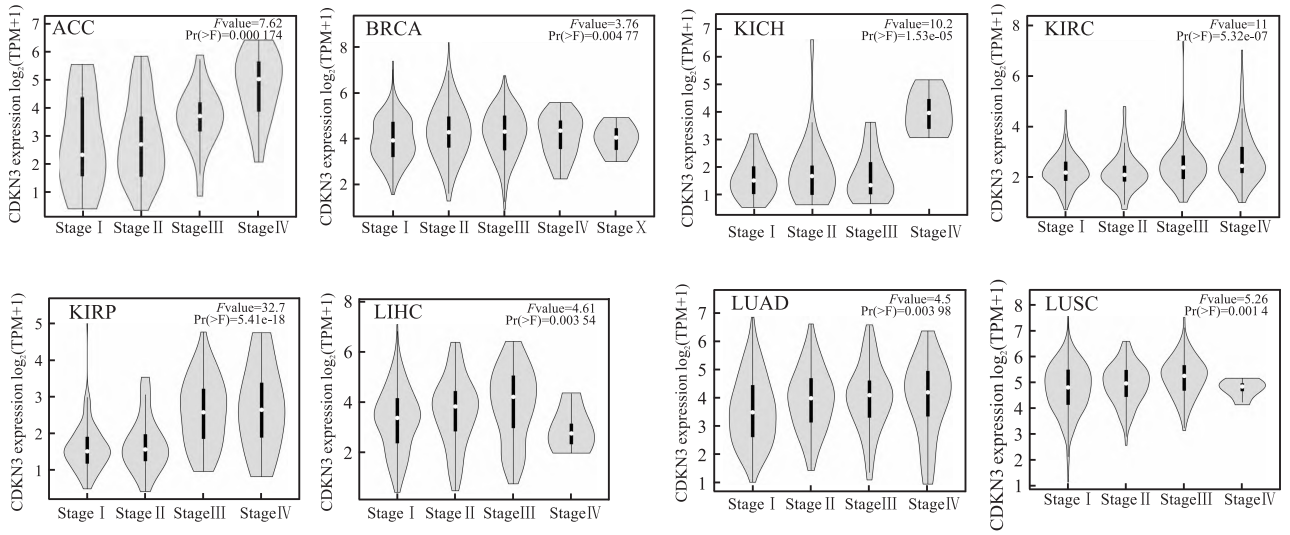

图 2　GEPIA2 平台分析 CDKN3 表达水平与肿瘤病理分期的相关性

Fig. 2　Correlation between CDKN3 expression level and tumor pathological stage was analyzed by GEPIA2 platform

3A)。此外,Kaplan-Meier 曲线显示,CDKN3 高表达水平与 12 种肿瘤患者更短的 OS 有关(图 3B)。TCGA 数据库数据显示,CDKN3 高表达水平与泛癌(包含 39 种癌症类型)较短的 OS 相关(图 3C)。同样,对于 DFS,风险比图显示 CDKN3 的表达水平与大多数肿瘤的 DFS 相关(图 4A)。Kaplan-Meier 分析显示,CDKN3 在 12 种肿瘤中的高表达,提示较差的 DFS(图 4B)。在泛癌(包含 32 种癌症类型)中,CDKN3 高表达与更差的 DFS 相关(图 4C)。本研究还对乳腺癌、卵巢癌、肺癌和胃癌队列的 OS、无进展生存期(progression free survival, PFS)、无远处转移生存期(distant metastasis free survival,DMFS)、进展

中国知网 https://www.cnki.net

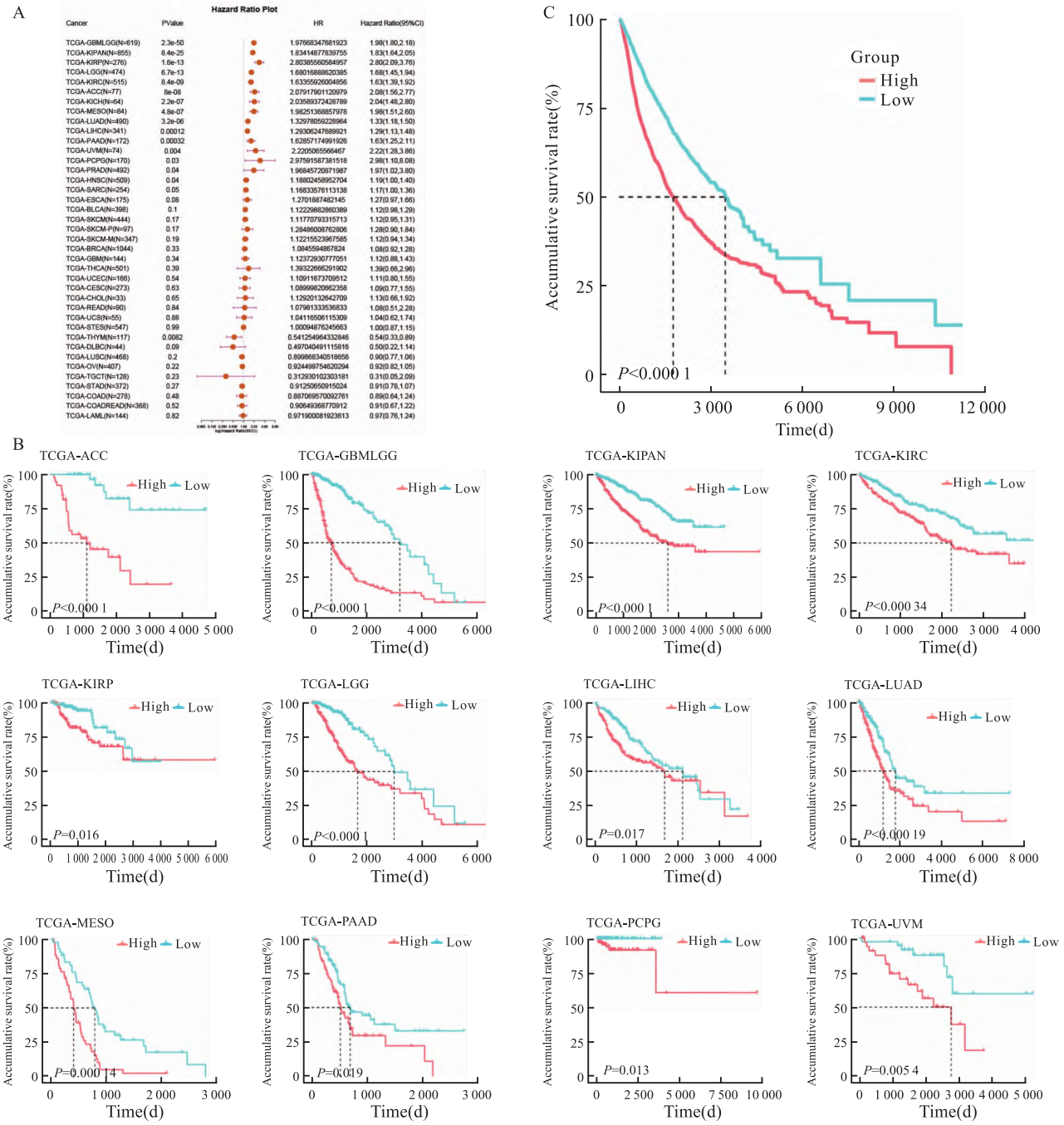

图 3　CDKN3 表达水平对不同肿瘤患者 OS 的预后分析

Fig. 3　Prognostic analysis of the expression level of CDKN3 on OS in patients with different tumors

A: The relationship between the expression levels of OS and CDKN3 in patients with different tumors under Cox proportional risk model in TCGA database; B: Kaplan – Meier curve in TCGA database showed the relationship between the expression level of OS and CDKN3 in ACC, GBMLGG, KIPAN, LGG, KIRC, LUAD, MESO, UVM, KIRP, LIHC, PAAD and PCPG patients; C: The relationship between OS and CDKN3 expression levels in pancancer (39 cancer types) in the TCGA database.

后生存期(post progression survival,PPS)和无复发生存期(recurrence free survival, RFS)数据以及 CDKN3 表达情况进行 Meta 分析并生成了森林图(图 5)。Meta 分析的综合结果显示,除胃癌外,CDKN3 在其他 3 种肿瘤中的高表达均与不良预后显著相关。

2.3　CDKN3 在各种恶性肿瘤中的表达与免疫细胞浸润程度的关系　使用来自 TCGA 的 TIMER 数据库中的 6 种免疫细胞类型(B 细胞、$CD4^+$ T 细胞、$CD8^+$ T 细胞、中性粒细胞、巨噬细胞和树突状细胞)的浸润评分,通过偏相关分析研究 CDKN3 表达

中国知网 https://www.cnki.net

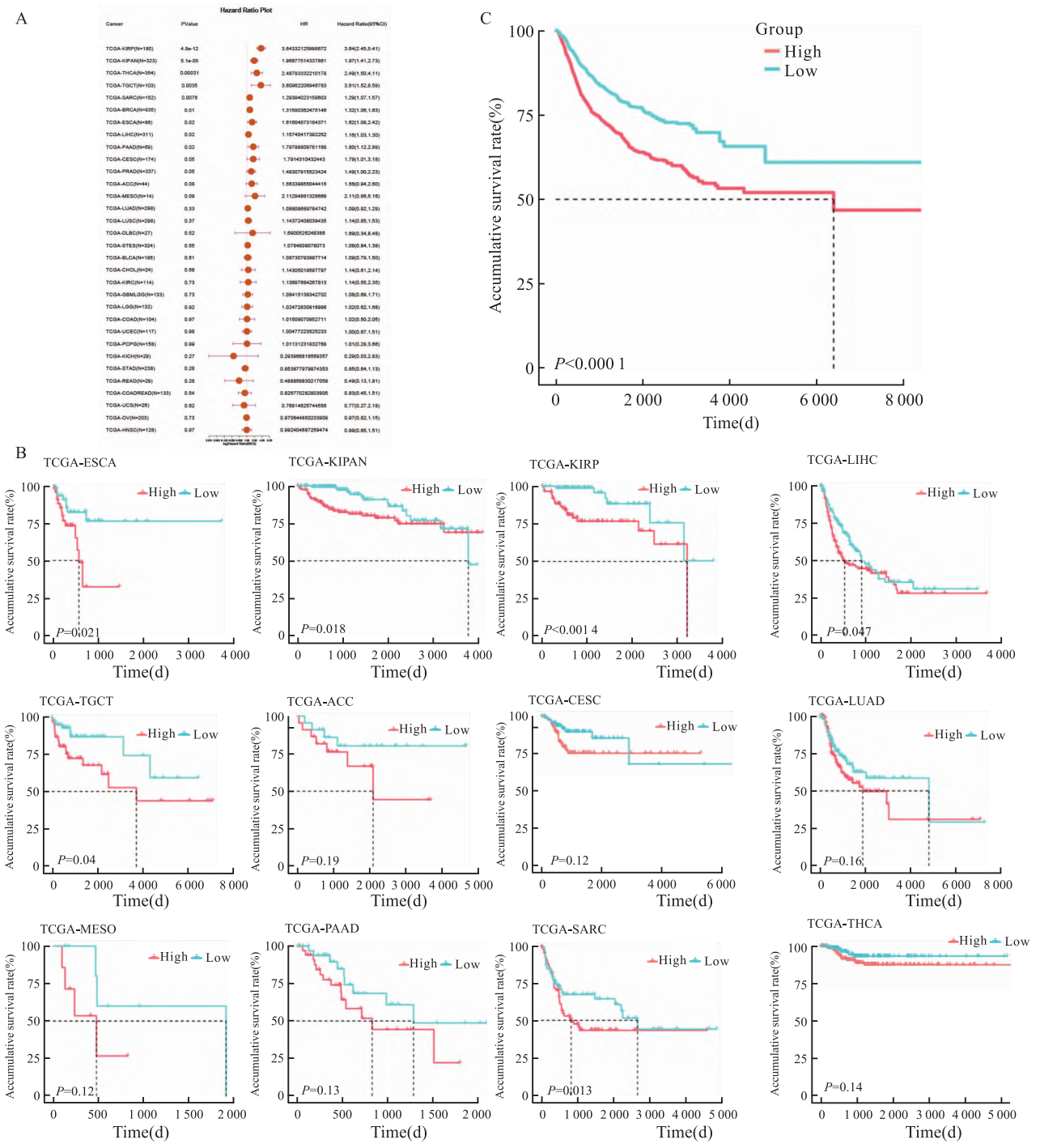

图 4　CDKN3 表达水平对不同肿瘤患者 DFS 的预后分析

Fig. 4 Prognostic analysis of CDKN3 expression level on DFS in patients with different tumors

A: Relationship between DFS and CDKN3 expression in patients with different tumors under Cox proportional risk model in TCGA database; B: Kaplan – Meier curves in TCGA database showed the relationship between DFS and CDKN3 expression levels of ESCA, KIPAN, KIRP, LIHC, TGCT, ACC, CESC, LUAD, MESO, PAAD, SARC and THCA; C: Relationship between DFS and CDKN3 expression levels in pancancer (39 cancer types) in the TCGA database.

与肿瘤微环境中免疫细胞浸润程度之间的关系(图6)。偏相关分析是在控制其他变量的线性影响的条件下,分析两变量间的线性相关性。如图所示,如果 $P<0.05$,说明两变量之间存在线性相关的关系;如果 $P>0.05$,则一般认为两变量之间无线性相关的关系。R 值越大,说明两变量之间的线性相关程度越强;R 值小,则线性相关程度越低。本研究还采用 ESTIMATE 方法计算了免疫评分(ImmuneScore)

中国知网 https://www.cnki.net

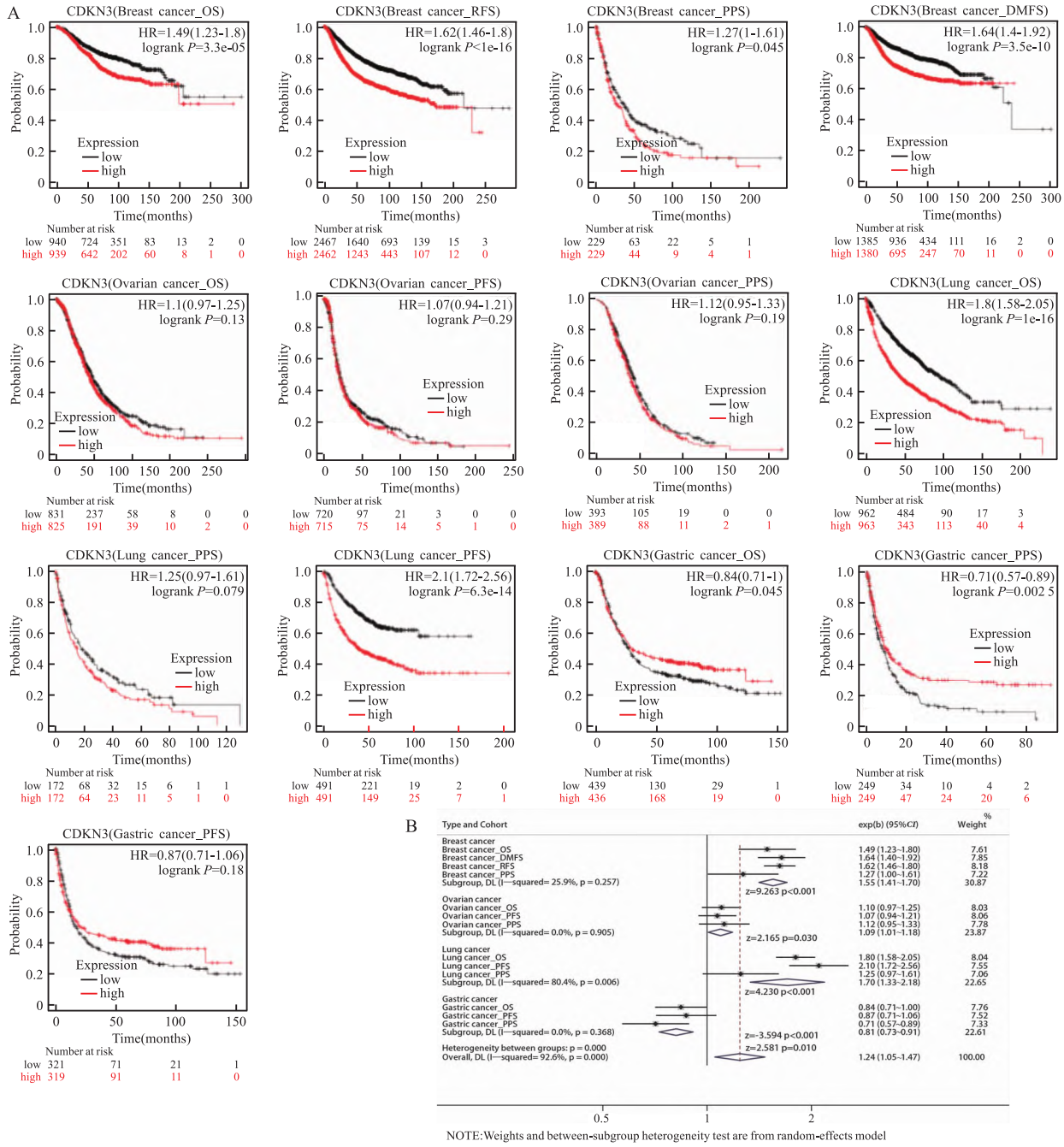

图 5　乳腺癌、卵巢癌、肺癌和胃癌等队列的 OS、PFS、DMFS、PPS 和 RFS 与 CDKN3 表达水平的关系

Fig. 5　The relationship between OS, PFS, DMFS, PPS and RFS and CDKN3 expression levels in breast cancer, ovarian cancer, lung cancer and gastric cancer groups

A: The relationship between OS, PFS, DMFS, PPS, RFS and CDKN3 expression in four cancers; B: The meta-analysis summarizes the data in Figure 5A to generate a forest map.

和基质评分(StromalScore)。分析显示在 ACC、CESC、LUSC、PCPG、STAD、STES、TGCT 和 UCEC 这 8 种肿瘤中,CDKN3 表达水平与 Stromalscore、Immunescore 和 ESTIMATEScore 相关(图 7)。

2.4　CDKN3 表达水平与肿瘤免疫检查点和免疫治疗标志物相关　为了探索 CDKN3 在肿瘤免疫治疗中的潜在价值,本研究比较了 CDKN3 表达水平与不同类型肿瘤中免疫检查点之间的相关性。CDKN3 在 CESC、LUSC、TGCT 和 THYM 中的表达与大多数免疫检查点分子呈负相关(图 8A)。TMB 和 MSI 是免疫治疗的生物标志物。本研究评估了 CDKN3 表达水平与 TMB 和 MSI 之间的相关性。在

中国知网 https://www.cnki.net

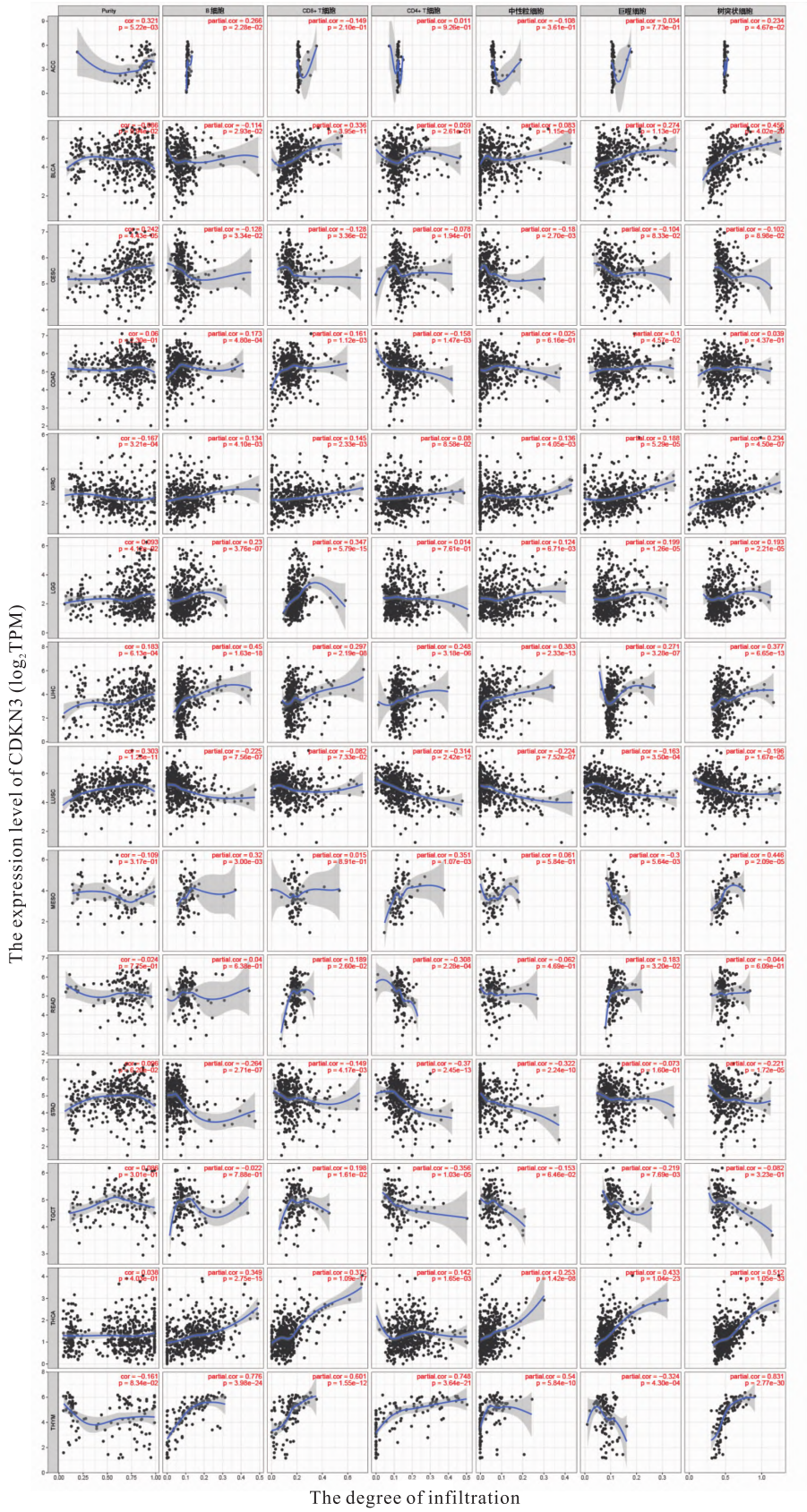

图 6　TIMER 数据库中获得的 6 种免疫细胞(B 细胞、CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、中性粒细胞、巨噬细胞和树突状细胞)浸润程度与 CDKN3 表达水平的关系

Fig. 6　The relationship between the degree of infiltration of 6 kinds of immune cells (B cells, CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, neutrophils, macrophages and dendritic cells) and the expression level of CDKN3 obtained from the TIMER database

中国知网 https://www.cnki.net

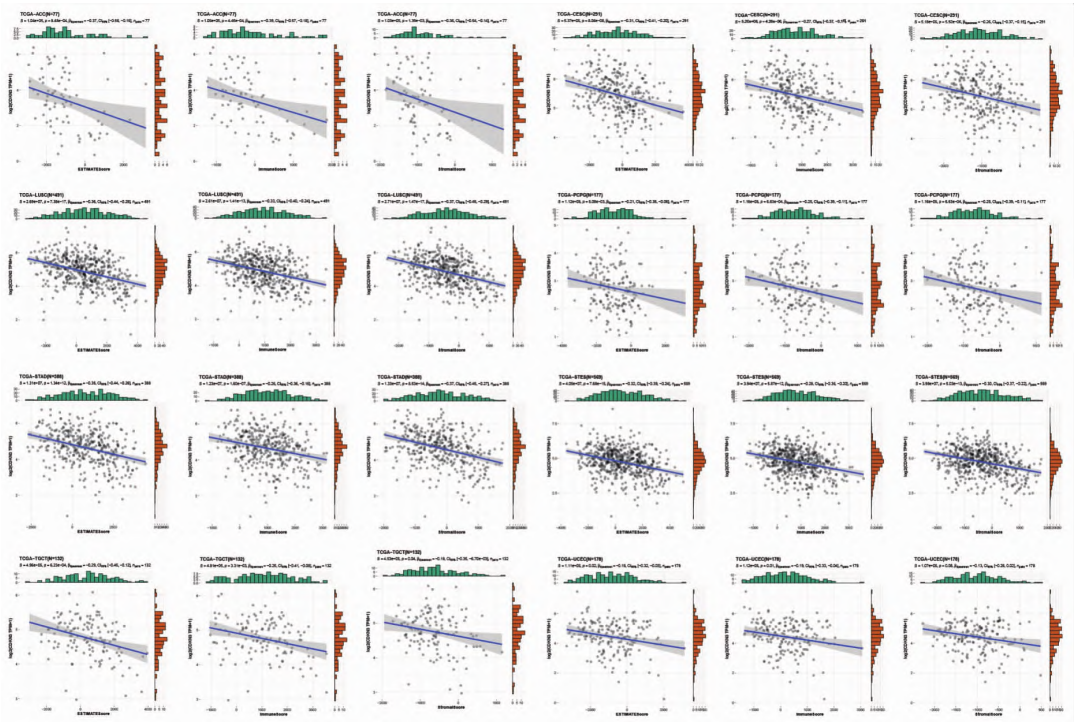

图 7 ACC、CESC、LUSC、PCPG、STAD、STES、TGCT 和 UCEC 中 CDKN3 表达水平与 Stromalscore、Immunescore 和 ESTIMATEScore 的相关性

Fig. 7 Correlation of CDKN3 expression levels in ACC, CESC, LUSC, PCPG, STAD, STES, TGCT and UCEC with Stromalscore, Immunescore and ESTIMATEScore

COAD、STES、SARC、STAD、PRAD、LUSC、LIHC 和 UVM 中，CDKN3 表达水平与 TMB 呈正相关；但在 GBMLGG 中，CDKN3 表达水平与 TMB 呈负相关（图 8B）。此外，CDKN3 的表达与 GBMLGG、LGG、LUAD、COAD、READ、BRCA、STES、KIPAN、STAD、PRAD、UCEC、KIRC、LUSC、PCPG、ACC 和 KICH 中的 MSI 呈正相关（图 8C）。本研究进一步评估了 CDKN3 表达水平与 5 个碱基配对修复（MMR）基因（PMS2、MSH6、MSH2、MLH1 和 EPCAM）表达水平之间的相关性，以确定 CDKN3 在免疫治疗中的价值。如图 8D 所示，CDKN3 与大多数肿瘤中 MMR 基因的表达密切相关。值得注意的是，在大多数肿瘤中，CDKN3 的表达水平与 MSH2 和 MSH6 呈正相关。

2.5 CDKN3 表达水平与药物反应相关 图 9 反映了 CDKN3 表达水平与药物反应之间的相关性。CDKN3 的表达水平与阿尼地尔、氯雷他定、富马酸福莫特罗等 8 种药物的反应呈正相关（$P<0.01$）。而与 Haterumalide NA 甲酯、吡卡那明、沙利小檗碱等 8 种药物的反应呈负相关（$P<0.01$）。

2.6 PPI 网络构建和通路富集分析 在 GeneMANIA 通过物理相互作用、共表达、共定位、基因富集分析、遗传相互作用和网站预测等生物信息学方法构建 CDKN3 的 PPI 网络（图 10A）。GO 富集的生物学过程（BPs）主要与细胞周期相关。KEGG 分析表明，CDKN3 主要富集的通路是细胞周期、细胞衰老和 p53 信号通路等（图 10B）。

2.7 CDKN3 表达水平与基因 CNV 和甲基化水平的关系 利用 GSCA 平台提供的 CNV、甲基化谱数据和 CDKN3 mRNA 表达之间的关系进行 Spearman 相关性检验。结果显示，在 LUSC、HNSC、BLCA、COAD、SARC 和 CESC 中，CDKN3 mRNA 水平与 CNV 呈显著正相关（$P<0.05$，图 11A、B）。然而在 THCA、KIRP、LAML、KIRC、LIHC、LGG 或 KICH 中并没有观察到这种相关性（图 11A）。此外，本研究还分析了 CDKN3 mRNA 水平与其甲基化水平之间的相关性。除 GBM、THYM、KICH、KIRC 和 KIRP 外，在大多数肿瘤中，CDKN3 mRNA 水平与其甲基化水平密切相关，尤其在 LIHC、SARC、STAD 和 LUSC 中非常明显（$P<0.0001$，图 11）。

2.8 CDKN3 对 HCC 细胞侵袭和迁移的影响 首先，对临床收集到的样本进行 Western blot 检测，结果显示 CDKN3 在 HCC 组织中的表达水平高于癌旁组织（图 12A）。为了进一步研究 CDKN3 对 HCC 侵

中国知网 https://www.cnki.net

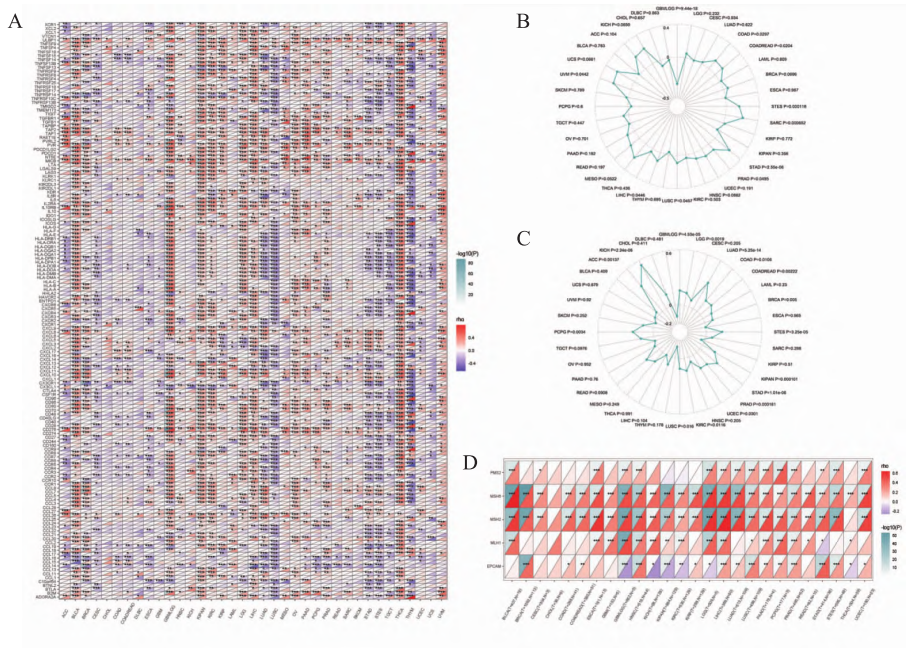

图 8 CDKN3 表达水平与不同类型肿瘤中免疫检查点之间的相关性

Fig. 8 Correlation between CDKN3 expression levels and immune checkpoints in different tumor types

A: Correlation between CDKN3 expression levels and immune checkpoint molecules in CESC, LUSC, TGCT and THYM; B: Correlation between CDKN3 expression levels and TMB in COAD, STES, SARC, STAD, PRAD, LUSC, LIHC, UVM and GBMLGG; C: Correlation between CDKN3 expression levels and MSI in GBMLGG, LGG, LUAD, COAD, READ, BRCA, STES, KIPAN, STAD, PRAD, UCEC, KIRC, LUSC, PCPG, ACC and KICH; D: Correlation of CDKN3 expression level with MMR, MSH2 and MSH6.

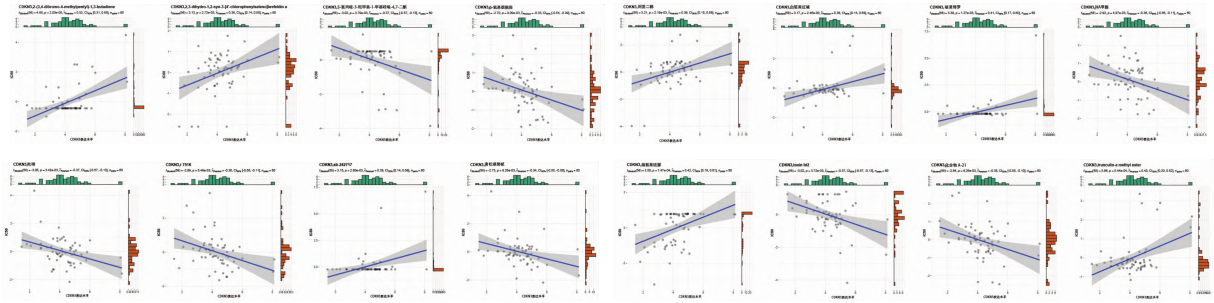

图 9 CDKN3 表达水平与药物反应之间的相关性

Fig. 9 Correlation between CDKN3 expression level and drug response

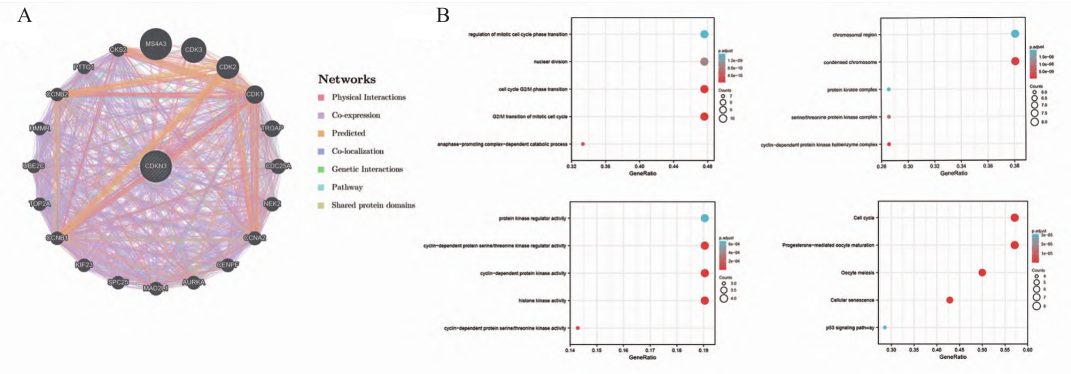

图 10 PPI 网络构建和通路富集分析

Fig. 10 PPI network construction and pathway enrichment analysis

A: PPI network of CDKN3; B: Biological process (BPs) of CDKN3 enrichment through GO.

中国知网 https://www.cnki.net

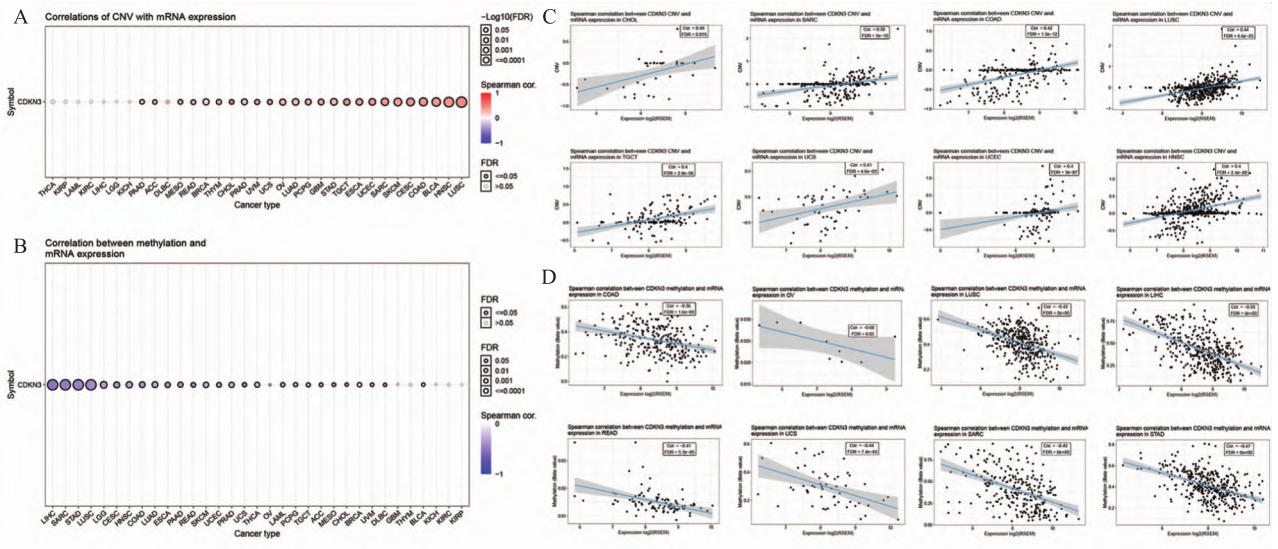

图 11 CDKN3 表达水平与基因 CNV 和甲基化水平的关系

Fig. 11 Relationship between CDKN3 expression level and CNV and methylation level

A: Spearman correlation analysis between CDKN3 mRNA level and CNV; B: Spearman correlation analysis between CDKN3 mRNA level and its methylation level; C: Scatter plot and Spearman regression line of 8 tumors with strong positive correlation between CDKN3 mRNA level and its CNV; D: Scatter plot and Spearman regression line of 8 tumors with strong negative correlation between CDKN3 mRNA level and its methylation level.

袭和迁移的影响,本研究将 CDKN3 siRNA 转染到 HepG2 细胞中,Wound Healing 和 Transwell 实验结果显示沉默 CDKN3 可降低 HepG2 细胞的侵袭和迁移能力(图 12B、12C)。图中 CDKN3 siRNA 组指用针对干扰 CDKN3 表达的 siRNA 转染 HepG2 细胞;Control siRNA 组指用一种不会导致任何细胞信息的特异性降解的 siRNA 随机序列转染 HepG2 细胞的阴性对照组,下同。基质金属蛋白酶 2(matrix metallopeptidase 2, MMP2)和基质金属蛋白酶 9(matrix metallopeptidase 9, MMP9)通过降解细胞外基质和基底膜的主要成分 IV 型胶原,在癌细胞的侵袭和迁移中发挥重要作用。Western blot 结果进一步表明沉默 CDKN3 能够抑制 MMP2 和 MMP9 的表达,与 Wound Healing 和 Transwell 实验结果一致(图 12D)。

2.9 CDKN3 对 HCC 细胞增殖和凋亡的影响 将 CDKN3 siRNA 转染到 HepG2 细胞中,EdU 染色显示沉默 CDKN3 能够抑制 HepG2 细胞的增殖(图 13A),JC-1 染色显示沉默 CDKN3 能够促进 HepG2 细胞的凋亡(图 13B)。Western blot 检测结果进一步表明沉默 CDKN3 能够提高 Bax 表达水平,降低 Bcl-2 表达水平,与 EdU 和 JC-1 染色结果一致(图 13C)。

3 讨论

细胞周期的进展受到细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶家族(CDKs)的调节[4],而 CDKN3 可使 CDK1 在 Thr161 位点去磷酸化,并降低 CKβ 在 Ser209 位点的磷酸化,进而抑制细胞周期的进展[5]。此外,CDKN3 还可以通过磷酸化和灭活 CDK2 抑制 G1/S 细胞周期的进程[3]。在许多类型的肿瘤中,CDKN3 都出现异常表达。例如,在宫颈癌[6]、肺腺癌[7]和乳腺癌[8]中,CDKN3 高表达与患者的低生存率相关;在肝细胞癌中,CDKN3 过表达并且能够促进肿瘤细胞增殖[9];在食管鳞癌中,CDKN3 的高表达与患者的淋巴转移或临床分期有关[10];在胃癌[11]和膀胱癌[2]中,敲低 CDKN3 能够抑制肿瘤细胞的增殖和侵袭,并促进细胞凋亡。同时,CDKN3 还与肝炎、肝硬化等癌前病变有关[12-13]。然而,CDKN3 在肿瘤免疫治疗和肿瘤微环境中的作用尚未得到系统分析。本研究旨在分析比较 CDKN3 在不同类型肿瘤中的表达情况及其对肿瘤预后、免疫浸润、免疫治疗和药物反应的影响,以确定 CDKN3 是否有望成为潜在的肿瘤免疫治疗和预后预测标志物。

从大量测序数据中,本研究需要识别和区分癌症基因中的驱动突变和乘客突变[14]。为此,本研究结合多种肿瘤类型的样本进行泛癌分析,以提高识别生物标志物的统计能力。本研究的数据来源包括 GTEx、TCGA 和 CCLE 数据库。本研究对 CDKN3 在正常细胞系和肿瘤细胞系中的表达情况进行了分析,并比较了 CDKN3 在肿瘤组织和邻近正常组织

中国知网 https://www.cnki.net

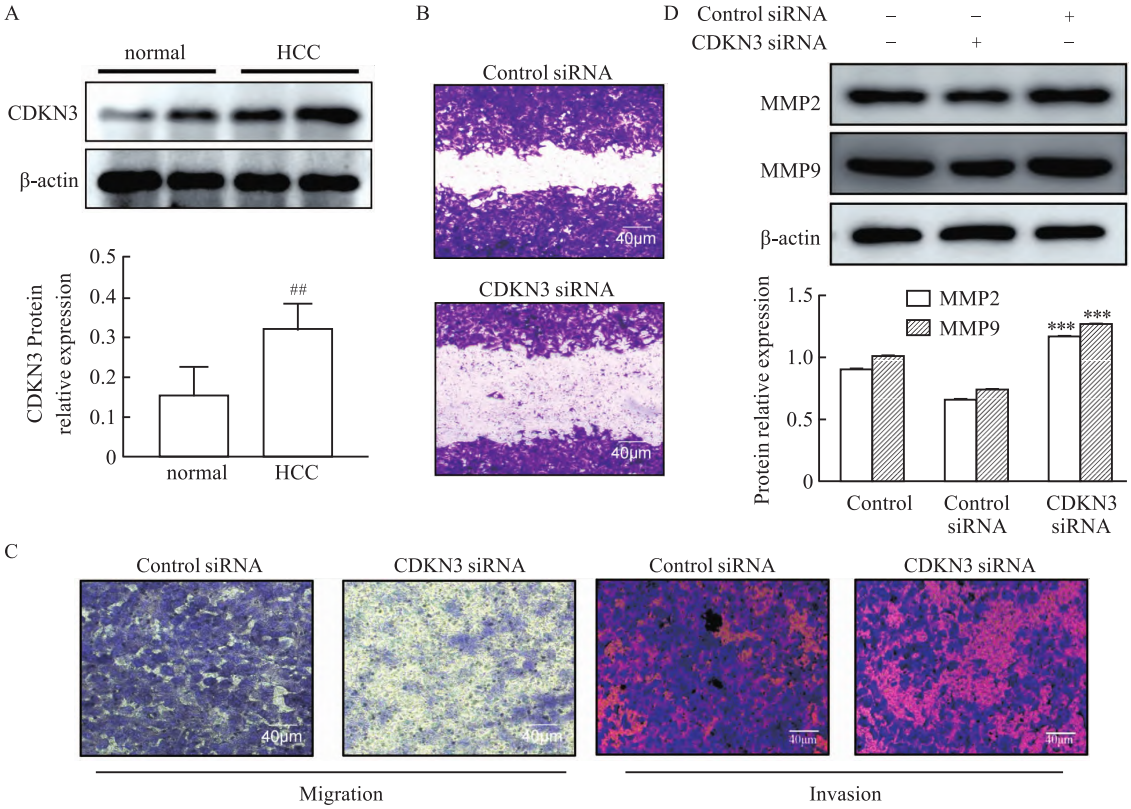

图 12　CDKN3 对 HCC 迁移和侵袭的影响 ×400

Fig. 12　Effects of CDKN3 on HCC migration and invasion ×400

A: Western blot results showed that the expression level of CDKN3 in HCC and paracancer tissues was different; B: The results of Wound Helaing experiment showed changes in the invasion ability of HepG2 cells after CDKN3 silencing; C: Transwell assay showed the changes of migration and invasion ability of HepG2 cells after CDKN3 silencing; D: Western blot results showed the expression changes of MMP2 and MMP9 in HepG2 cells after CDKN3 silencing; $^{\#\#}P<0.01$ *vs* normal tissue; $^{***}P<0.001$ *vs* Control siRNA.

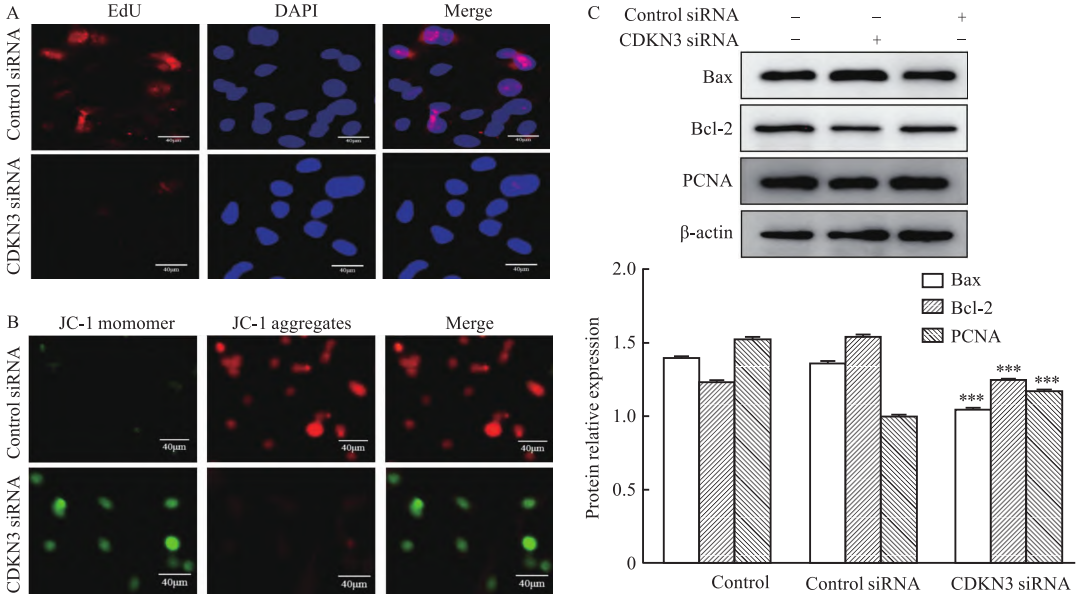

图 13　CDKN3 对 HCC 增殖和凋亡的影响 ×400

Fig. 13　Effects of CDKN3 on proliferation and apoptosis of HCC ×400

A: EdU staining showed the change of HepG2 cell proliferation after CDKN silencing; B: JC-1 staining showed the apoptosis level of HepG2 cells after CDKN silencing; C: Western blot results showed the expression changes of Bax, Bcl-2 and PCNA in HepG2 cells after CDKN3 silencing; $^{***}P<0.001$ *vs* Control siRNA.

中国知网 https://www.cnki.net

中的表达水平。结果显示,在不同肿瘤细胞株中,CDKN3 的表达水平均较高,且变化范围较正常细胞系窄。在 TCGA 和 GTEx 的整合数据库中,34 种肿瘤组织和邻近正常组织中,只有 2 种肿瘤组织中 CDKN3 的表达低于邻近正常组织。

本研究利用 GEPIA2 数据库证实了 CDKN3 表达水平与肿瘤病理分期之间的相关性。为了更好地理解 CDKN3 表达水平对肿瘤预后的影响,本研究分析了 CDKN3 表达水平与不同类型肿瘤的整体 OS 和 DFS 之间的关系。Cox 比例风险模型分析和 Kaplan-Meier 生存曲线显示,CDKN3 表达上调与较差的 OS 和 DFS 相关。此外,本研究还对乳腺癌、卵巢癌、肺癌和胃癌的 OS、PFS、DMFS、PPS 和 FP 进行了荟萃分析,生成了森林图。在乳腺癌($P<0.001$)、卵巢癌($P=0.030$)和肺癌($P<0.001$)中,CDKN3 的表达水平与整体预后呈正相关;然而,在胃癌($P<0.001$)中,CDKN3 的表达水平与整体预后呈负相关。

本研究分析了 CDKN3 在肿瘤免疫治疗和遗传学中的作用。根据 TIMER 数据库,CDKN3 表达水平与 B 细胞、$CD4^+$ T 细胞、$CD8^+$ T 细胞、中性粒细胞、巨噬细胞和树突状细胞的免疫浸润显著相关。TIMER 数据库还计算并保存 TCGA 数据库中泛癌数据的免疫细胞浸润评分,本研究分析发现 ACC、CESC、LUSC、PCPG、STAD、STES、TGCT 和 UCEC 的免疫浸润程度与 CDKN3 的相关性最为显著。

本研究进一步探讨了 CDKN3 在肿瘤免疫治疗中的潜力,显示 CDKN3 在 CESC、LUSC、DLBC、TGCT、THYM 和 UCS 中的表达与大多数免疫检查点分子呈负相关。其中尤其值得注意的是,在多种肿瘤,特别是 BLCA、GBMLGG、KIRC、LGG、LUAD、THCA 中,POCD1(即 PD1)和 POCD1LG2(即 PD-L2)的表达与 CDKN3 密切相关。MSI [15] 和 TMB [16] 作为生物标志物可被用来预测免疫治疗反应,MMR 是一种遗传信息维护基因[17],MMR 功能缺失会导致 TMB 和 MSI 增高[18]。本研究结果显示,CDKN3 的表达与大多数肿瘤类型中 5 个 MMR 基因(PMS2、MSH6、MSH2、MLH1 和 EPCAM)和 MSI 的突变明显相关。

事实上,肿瘤免疫治疗效果与多方面因素有关。第一是肿瘤微环境中免疫细胞的浸润情况。肿瘤可分为 3 种基本的免疫表型:免疫排斥型、免疫沙漠型和免疫炎症型。前两种也称为“冷肿瘤”,是对免疫治疗不敏感的非炎症性肿瘤。最后一种称为“热肿瘤”,即免疫炎症表型,被 T 细胞深度浸润,积极响应免疫治疗。本课题组对免疫细胞浸润水平及评分的研究即是关注该方面的。第二是免疫检查点的表达水平。免疫检查点是免疫治疗的靶点,其高表达意味着肿瘤可能存在严重的免疫抑制和逃避问题。第三是肿瘤自身突变的情况。肿瘤细胞突变积累得越多,越容易被免疫系统识别,免疫治疗的效果也就越好。本研究的 TMB、MSI 和 MMR 即是关注该方面的。其中 MMR 与 MSI 密切相关。碱基配对修复完整(pMMR)通常与微卫星稳定(MSS)相关联,预示着免疫治疗效果不佳。而碱基配对修复缺陷(dMMR)则往往与微卫星高度不稳定(MSI-H)相关联,预示着肿瘤对免疫治疗较为敏感。以上三方面是目前通过生物信息学方法预测免疫治疗效果的主要关注点。本研究的分析提示在某些肿瘤中,这三方面的预测结果可能有一定差异。这也反映了肿瘤免疫治疗效果存在的复杂异质性,需要结合临床研究进一步分析。

此外,本课题组还研究了 CDKN3 表达水平与药物反应之间的关系。先前的研究[19]表明 CDKN3 可与其他基因共同表达,促进细胞增殖。在本研究利用 GeneMANIA 软件构建的 CDKN3 基因的 PPI 网络和 GO 分析中,细胞周期是 CDKN3 高表达主要富集的生物过程。由于近十年已有多项研究[9, 20]表明 CDKN3 在多种肝脏癌前病变如肝炎、肝硬化中都发挥着作用,尤其是在这些癌前病变的恶性转化过程中具有重要意义。目前已有报道提示 CDKN3 表达水平与肝癌的病理分期[21]、临床预后和对阿霉素的敏感性有关[22],但尚未围绕 CDKN3 展开肝癌表型和功能层面的基础实验验证。基于此,本课题组选择 HCC 进行标本验证和体外验证。本研究运用细胞和分子生物学方法证实 CDKN3 在 HCC 组织和细胞中高表达,敲低 CDKN3 的表达能够抑制 HCC 细胞的增殖、侵袭和转移,促进凋亡。

据本课题组所知,这是首个基于 CDKN3 的泛癌分析。了解 CDKN3 在人类肿瘤中的作用对于肿瘤免疫治疗特别是个性化治疗有着重要意义。然而,这项研究也存在一些局限性。首先,CDKN3 在肿瘤中的高表达与预后不良有关,但其潜在机制尚未得到证实。其次,CDKN3 在不同肿瘤中的功能差异还需要进一步探索。总之,CDKN3 可能是一种潜在的生物标志物,在肿瘤免疫微环境的形成过程中发挥着重要作用,为肿瘤治疗提供了一个辅助靶点。

参考文献

[1] Cress W D, Yu P, Wu J. Expression and alternative splicing of

中国知网 https://www.cnki.net

the cyclin-dependent kinase inhibitor-3 gene in human cancer[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2017, 91(Pt B): 98 – 101. doi:10.1016/j.biocel.2017.05.013.

[2] Li M, Che N, Jin Y, et al. CDKN3 overcomes bladder cancer cisplatin resistance *via* LDHA-dependent glycolysis reprogramming [J]. Onco Targets Ther, 2022, 15: 299 – 311. doi:10.2147/OTT.S358008.

[3] Yu C, Cao H, He X, et al. Cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDKN3) plays a critical role in prostate cancer via regulating cell cycle and DNA replication signaling[J]. Biomedecine Pharmacother, 2017, 96: 1109 – 18. doi:10.1016/j.biopha.2017.11.112.

[4] Mughal M J, Bhadresha K, Kwok H F. CDK inhibitors from past to present: A new wave of cancer therapy[J]. Semin Cancer Biol, 2023, 88: 106 – 22. doi:10.1016/j.semcancer.2022.12.006.

[5] Nalepa G, Barnholtz-Sloan J, Enzor R, et al. The tumor suppressor CDKN3 controls mitosis[J]. J Cell Biol, 2013, 201(7): 997 – 1012. doi:10.1083/jcb.201205125.

[6] Barrón E V, Roman-Bassaure E, Sánchez-Sandoval A L, et al. CDKN3 mRNA as a biomarker for survival and therapeutic target in cervical cancer[J]. PLoS One, 2015, 10(9): e0137397. doi:10.1371/journal.pone.0137397.

[7] Deng X, Ma J, Zhou W, et al. GID2 interacts with CDKN3 and regulates pancreatic cancer growth and apoptosis[J]. Lab Invest, 2023, 103(6): 100122. doi:10.1016/j.labinv.2023.100122.

[8] Øvestad I T, Engesæter B, Halle M K, et al. High-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN) associates with increased proliferation and attenuated immune signaling[J]. Int J Mol Sci, 2021, 23(1): 373. doi:10.3390/ijms23010373.

[9] Jiang C H, Yuan X, Li J F, et al. Bioinformatics-based screening of key genes for transformation of liver cirrhosis to hepatocellular carcinoma[J]. J Transl Med, 2020, 18(1): 40. doi:10.1186/s12967 – 020 – 02229 – 8.

[10] Wang W, Liao K, Guo H C, et al. Integrated transcriptomics explored the cancer-promoting genes CDKN3 in esophageal squamous cell cancer[J]. J Cardiothorac Surg, 2021, 16(1): 148. doi:10.1186/s13019 – 021 – 01534 – 7.

[11] Abdel-Tawab M S, Fouad H, Othman A M, et al. Evaluation of gene expression of PLEKHS1 AADAC and CDKN3 as novel genomic markers in gastric carcinoma[J]. PLoS One, 2022, 17(4): e0265184. doi:10.1371/journal.pone.0265184.

[12] Chen C F, Feng X, Liao H Y, et al. Regulation of T cell proliferation by JMJD6 and PDGF-BB during chronic hepatitis B infection [J]. Sci Rep, 2014, 4: 6359. doi:10.1038/srep06359.

[13] Wu M, Liu Z, Zhang A, et al. Identification of key genes and pathways in hepatocellular carcinoma: A preliminary bioinformatics analysis[J]. Medicine, 2019, 98(5): e14287. doi:10.1097/MD.0000000000014287.

[14] Muiños F, Martínez-Jiménez F, Pich O, et al. In silico saturation mutagenesis of cancer genes[J]. Nature, 2021, 596(7872): 428 – 32. doi:10.1038/s41586 – 021 – 03771 – 1.

[15] Zheng Y, Huang Y, Bi G, et al. Multi-omics characterization and validation of MSI-related molecular features across multiple malignancies[J]. Life Sci, 2021, 270: 119081. doi:10.1016/j.lfs.2021.119081.

[16] Chan T A, Yarchoan M, Jaffee E, et al. Development of tumor mutation burden as an immunotherapy biomarker: Utility for the oncology clinic[J]. Ann Oncol, 2019, 30(1): 44 – 56. doi:10.1093/annonc/mdy495.

[17] Elez M. Mismatch repair: From preserving genome stability to enabling mutation studies in real-time single cells[J]. Cells, 2021, 10(6): 1535. doi:10.3390/cells10061535.

[18] Brown L C, Armstrong A J. Has mismatch repair-deficient cancer met its MATCH? [J]. J Clin Oncol, 2020, 38(3): 183 – 7. doi:10.1200/JCO.19.02860.

[19] Ma J, Zhou W, Yuan Y, et al. PSMD12 interacts with CDKN3 and facilitates pancreatic cancer progression[J]. Cancer Gene Ther, 2023, 30(8): 1072 – 83. doi:10.1038/s41417 – 023 – 00609 – y.

[20] Wang L, Sun L, Huang J, et al. Cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDKN3) novel cell cycle computational network between human non-malignancy associated hepatitis/cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) transformation[J]. Cell Prolif, 2011, 44(3): 291 – 9. doi:10.1111/j.1365 – 2184.2011.00752.x.

[21] Dai W, Miao H, Fang S, et al. CDKN3 expression is negatively associated with pathological tumor stage and CDKN3 inhibition promotes cell survival in hepatocellular carcinoma[J]. Mol Med Rep, 2016, 14(2): 1509 – 14. doi:10.3892/mmr.2016.5410.

[22] Dai W, Fang S, Cai G, et al. CDKN3 expression predicates poor prognosis and regulates adriamycin sensitivity in hepatocellular carcinoma *in vitro* [J]. J Int Med Res, 2020, 48(7): 300060520936879. doi:10.1177/0300060520936879.

Expression of CDKN3 in tumors and its correlation with prognosis

Chen Bangjie[1], Wang Xinyi[2], Yang Yipin[1], Li Haiwen[3], Shao Wei[4], Gu Kangsheng[1]

([1]*Dept of Oncology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei* 230022;
[2]*Dept of Radiation Oncology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei* 230022;
[3]*Dept of Gastroenterology, The Third Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei* 230061;
[4]*Dept of Pathogenic Biology, School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei* 230032)

Abstract ***Objective*** To investigate the expression changes of cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDKN3) in

(下转第 1966 页)

中国知网 https://www.cnki.net

DEGs to screen for genes related to AF. Machine learning methods such as the least absolute shrinkage and selection operator (LASSO), support vector machine recursive feature elimination (SVM-RFE), and random forest (RF) were utilized to screen potential biomarkers for AF. Immune infiltration analysis was conducted and the AF rat model was replicated for validation. ***Results*** A total of 377 DEGs were obtained, mainly enriched in pathways such as B cell receptor signaling and chemokine signaling. Machine learning algorithms identified matrix metalloproteinase 13 (MMP13) as a potential biomarker for AF. In AF samples, memory B cells, plasma cells, M0 macrophages, and M1 macrophages were higher than in PF samples, while resting CD4 memory T cells and resting dendritic cells were lower than in PF samples. MMP13 showed a positive correlation with M0 macrophages, activated mast cells, and immature B cells, and a negative correlation with resting mast cells. Experimental results showed that MMP13 expression levels were higher in rat AF samples compared to the control group. ***Conclusion*** The onset of AF involves various immune cells and signaling pathways. MMP13 is significantly upregulated in AF tissue and correlates with multiple immune cells, making it a potential novel biomarker of AF.

Key words anal fistula; weighted gene co-expression network analysis; machine learning; biomarker; immune infiltration

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82104876); Shandong Province Medical and Health Science and Technology Development Program (No. 2017WS802); Shandong Province Traditional Chinese Medicine Science and Technology Development Program (No. 2019-0379).

Corresponding author Pang Xue, E-mail: pangxue_sdutcm@163.com

(上接第 1957 页)

different tumors and its effect on tumor staging, prognosis and immunotherapy. ***Methods*** The expression characteristics of CDKN3 in different cancers using data from TCGA, CCLE, ICGC, and GTEx databases were evaluated. The GEPIA2 platform and Kaplan-Meier analysis were utilized to assess the effect of CDKN3 on tumor pathological staging and survival prognosis. The TIMER platform was employed to explore the influence of CDKN3 on the tumor immune microenvironment and immunotherapy. Its effect on immune checkpoint and key immunotherapeutic predictors using bioinformatics methods was explored. The GeneMANIA tool was used to construct the protein-protein interaction (PPI) network of CDKN3. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) and Gene Onotology (GO) enrichment analyses were conducted to explore the biological processes and signaling pathways associated with CDKN3. The effect of CDKN3 on HepG2 cell proliferation, invasion, migration, and apoptosis was validated through transfection with CDKN3 siRNA. ***Results*** CDKN3 was found to be widely overexpressed in tumors. High expression of CDKN3 was often associated with advanced pathological staging and poor survival prognosis. CDKN3 expression was negatively correlated with most immune checkpoints and positively correlated with tumor mutation burden (TMB), microsatellite instability (MSI), and mismatch repair (MMR) genes. CDKN3 was associated with cell cycle, cellular senescence, and the p53 signaling pathway. Furthermore, EdU staining, JC-1 staining, Transwell, and Wound Healing assays confirmed that CDKN3 promoted HCC cell proliferation, invasion, and migration while inhibiting apoptosis. ***Conclusion*** Abnormal expression of CDKN3 is closely related to tumor staging, prognosis, and immune microenvironment characteristics, making it a potential prognostic marker and immunotherapy adjuvant target in cancer.

Key words CDKN3; tumor; pan-cancer analysis; prognostic assessment; immunotherapy; biomarkers; hepatocellular carcinoma

Fund programs National Natural Science Foundation of China(No. 82071770); Anhui Province Key Research and Development Project(No. 202004j07020044);Hefei Natural Science Foundation(No. 2022033)

Corresponding authors Shao Wei, E-mail: shaowei@ahmu.edu.cn;Gu Kangsheng, E-mail:gukangsheng@ahmu.edu.cn

中国知网 https://www.cnki.net