

肺腺癌中通过靶向 CDT1 抑制肿瘤生长及其机制研究

米源^{1*}, 梁宇翔^{2*}, 王聪³, 李德思⁴, 宋春涛¹, 苏洁¹, 张庆财⁵, 王雷²

摘要 目的 探讨染色质许可和 DNA 复制因子 1 (CDT1) 在肺腺癌中的价值及作用机制。方法 从 TCGA 数据库中下载肺腺癌组织及正常肺组织基因表达数据及临床信息, 通过 R 语言进行差异分析、GO 分析、独立预后分析、与免疫治疗的相关性分析; 采集临床样本通过 PCR 检测 CDT1 在肺腺癌及正常组织中表达; 流式细胞术检测 si-CDT1 敲低组及 si-NC 对照组中细胞增殖及周期的变化; Transwell 检测各组侵袭能力的变化; Western blot 检测各组 CDT1、TPX2、p53 的表达变化。结果 TCGA 数据结果显示 CDT1 为差异基因, GO 分析表明 CDT1 与细胞周期密切相关, 在临床样本中验证了 CDT1 在肺腺癌组织中高表达; CDT1 可以作为预测肺腺癌预后的独立因素, 并且与肺腺癌免疫治疗的疗效相关; 敲低 CDT1 并与对照组相比, 敲低组细胞增殖能力下降, 阻滞在 G1 期, Transwell 的结果表明 CDT1 敲低组侵袭能力降低; 敲低 CDT1 使 TPX2 下降, p53 表达升高, 而过表达 CDT1 得到了相反。结论 证实了 CDT1 在肺腺癌中高表达并与预后差相关, 并通过影响 TPX2 及 p53 影响肺腺癌的发生发展。

关键词 肺腺癌; CDT1; p53; TPX2; 肿瘤增殖

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)02-0260-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.02.013

肺癌是癌症相关死亡的主要原因, 2018 年全球估计有 210 万新发肺癌诊断, 占全球癌症负担的 12%。在这一年估计有 180 万例病人死于肺癌, 占全球癌症死亡的五分之一^[1]。而肺腺癌是最常见的非小细胞肺癌的病理类型。近几十年来, 随着分子靶向治疗和免疫检查点抑制剂 (immune check-

point inhibitors, ICIs) 的发展在一定程度上提高了肺腺癌患者的生存率。然而, 肺腺癌患者 5 年生存率仍为 19%^[2]。因此, 迫切需要寻找新的靶点, 以优化个性化治疗并提高患者生存率。从公共数据库下载肺腺癌患者的基因数据, 通过分析显示染色质许可和 DNA 复制因子 1 (chromatin licensing and DNA replication factor 1, CDT1) 是差异基因。CDT1 对于 DNA 复制的启动是必不可少的, 在细胞复制和周期调节过程中发挥了重要作用^[3]。近年来, 有研究表明 CDT1 与前列腺癌^[4]、急性淋巴细胞白血病^[5]等多种肿瘤的发生发展及预后相关。然而, CDT1 在肺腺癌的发生发展的具体调控作用及预后的意义未见明确报道。该文旨在探索 CDT1 在肺腺癌中的表达、临床意义及潜在作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料 人肺腺癌细胞系 A549 及 20 对临床肺腺癌及正常标本均由河北医科大学第四医院保存。CDT1 过表达载体 pEGFP-N1-CDT1 和对照载体 pEGFP-N1 (上海, 生工生物工程股份有限公司), si-CDT1 和对照 si-NC (苏州吉玛生物科技有限公司), CDT1 和 GAPDH 引物 (美国 Thermo Fisher), 反转录试剂盒 (宝日医生物技术 (北京) 有限公司), PCR 试剂盒 (宝日医生物技术 (北京) 有限公司), CDT1 兔抗人单克隆抗体 (武汉博士德生物工程有限公司), TPX2 兔抗人多克隆抗体 (武汉博士德生物工程有限公司), p53 兔抗人多克隆抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司), GAPDH 鼠抗人单克隆抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司)。EDU 试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司), Transwell 膜嵌套 (美国 Corning 公司)。

1.2 方法

1.2.1 生物信息分析 TCGA (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) 数据库下载肺腺癌组织及正常组织基因表达, R 语言 limma 包进行差异表达分析, 将 $P < 0.05$ 且 $\log_2(\text{foldchange}) > 1$ 作为差异基因的标准, R 语言 ggplot2 包进行火山图制作, pheatmap 包进行热图的制作; survival、timeROC 包进行 cox 回归分析

2023-12-05 接收

基金项目: 河北省年度医学科学研究计划项目 (编号: 20221353); 河北省重点研发计划项目 (编号: 22377769D); 河北省自然科学基金 (编号: H2022206391); 河北医科大学第四医院科研创新团队项目 (编号: 2023B02)

作者单位: 河北医科大学第四医院¹ 急诊科、² 胸二科, 石家庄 050000

河北医科大学³ 药学院、⁵ 体育部, 石家庄 050000

⁴ 河北医科大学第三医院医务处, 石家庄 050000

作者简介: 米源, 男, 主治医师;

王雷, 男, 主任医师, 教授, 责任作者, E-mail: Yuankundu@163.com

* 对本文具有同等贡献

及制作 ROC 曲线,corrplot 包进行相关性分析;GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/>) 数据库信息进行肺腺癌 CDT1 表达的变化。

1.2.2 细胞培养和转染 肺腺癌 A549 细胞系培养于含有 10% 胎牛血清的 DMEM 的高糖培养基中,在 5% 的 CO₂、37℃ 恒温培养箱中培养,待细胞长到 90% 左右用含 0.25% 胰蛋白酶 EDTA 消化液(不含酚红)消化细胞,进行 1:2 传代培养。将呈对数生长期的细胞接种于 6 孔板上,细胞生长到 50% ~ 60% 时,更换无血清培养基,并按照 Lipofectamine™ 3000 说明书进行 siRNA 的转染,设立实验 si-CDT1 组和对照 si-NC 组。24 h 提取 mRNA,48 h 后收集蛋白。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 法检测基因的表达 将组织或细胞用裂解液进行裂解,按照 RNA 提取试剂盒说明书提取各组样本 RNA,测定各组 RNA 浓度,按反转录试剂盒进行 cDNA 的反转录。按 PCR 试剂说明书进行基因扩增。以 GAPDH 的 Ct 值作为内参,采用 2^{-ΔΔCt} 法进行数据分析。

1.2.4 Western blot 法检测相关蛋白表达 PBS 洗涤转染后的 A549 细胞,用含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液收集蛋白,按 BCA 试剂盒测定总蛋白的浓度。通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质。冰水浴转到 PVDF 膜。室温用含 5% 脱脂奶粉液封膜进行封闭,4℃ 分别加入一抗过夜。次日用 TBST 洗膜并与二抗孵育 1.5 h,最后用 ECL 试剂来可视化蛋白质条带,用 Image 软件检测蛋白条带的表达。

1.2.5 流式细胞术检测细胞周期及增殖的变化 将转染的 A549 细胞用 75% 乙醇制备成单细胞悬液,固定 6 h 以上后用冷 PBS 漂洗 3 次,加入碘化吡啶注意避光。上机检测周期的变化。收集各组细胞,按照 EDU 试剂盒说明书进行处理,上机进行检测。

1.2.6 Transwell 侵袭实验 收集转染后的 A549 细胞吹打为单细胞悬液进行细胞计数,重悬在无血清培养液中,在上室加入 10 × 10⁴ 个细胞的培养液。下室加入含 10% 血清的培养液 600 μl,放入细胞培养箱中培养 24 h。24 h 后经清洗、固定、染色、晾干后在倒置显微镜下(×200)视野随机选取 4 个视野,观察穿膜细胞数取平均值。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 21.0 中 *t* 检验或单因素方差分析(ANOVA)分析统计差异,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,α = 0.05。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CDT1 生物信息筛查结果及组织表达 TCGA 数据库下载肺腺癌组织表达结果显示 CDT1 在肺腺癌中高表达(图 1A、B);GO 分析表明 CDT1 与细胞纺锤体组装相关(图 1C);GEPIA 数据库信息说明在肺腺癌组织中 CDT1 高表达,课题组也通过 PCR 检测临床 20 组样本验证了数据库信息的准确性,差异有统计学意义(P < 0.000 1)(图 1D、E)。

2.2 CDT1 表达对肺腺癌预后的影响 对 TCGA 数据库中肺腺癌患者的数据进一步分析,通过单因素 Cox 及多因素 Cox 分析结果均显示 CDT1 的表达可作为独立的预后指标(P < 0.001)(图 2A、B);通过绘制生存曲线,CDT1 与肺腺癌患者的预后相关(P = 0.032)(图 2C),绘制 CDT1 表达水平的 ROC 曲线,然后计算了 ROC 曲线下面积(AUC)。对肺腺癌患者 1 年、3 年、5 年生存时间的 AUC 分别为 64.3%、62.8% 和 57.7%,表明 CDT1 可能是肺腺癌患者预后的预测生物标志物(图 2D)。

2.3 CDT1 对免疫治疗的预测作用 将 CDT1 表达量与免疫监测点表达量进行 pearson 相关性分析,具体数值结果(表 1),总体相关性分析(图 3A);肿瘤突变负荷(Tumor mutational burden, TMB)已被批准作为免疫检查点抑制剂的预测生物标志物,分析 CDT1 与肿瘤突变负荷的关系,结果表明 CDT1 的表达与肿瘤突变负荷成正相关,表明 CDT1 的表达与免疫治疗的疗效密切相关(图 3B)。

表 1 CDT1 表达量与免疫监测点相关性分析

基因	基因	相关性系数	P
CDT1	CD70	0.223	0
CDT1	CD274	0.221	0
CDT1	CD28	-0.203	0
CDT1	PDCD1	0.207	0
CDT1	CD276	0.385	0

2.4 敲低 CDT1 在肺腺癌 A549 细胞中的功能变化 通过 PCR(*t* = 30.36, P < 0.000 1)及 Western blot(*t* = 8.801, P = 0.000 9)验证了 si-CDT1 可以明显降低 CDT1 的表达,差异有统计学意义(图 4A、B);流式细胞术显示 si-CDT1 组细胞增殖能力明显降低(*t* = 6.093, P = 0.003 7)(图 4C);流式细胞术分析细胞周期显示 si-CDT1 组 G0/G1 期明显升高(*t* = 11.72, P = 0.000 3),差异有统计学意义(图 4D);Transwell 实验显示 CDT1 组细胞侵袭能力明显降低

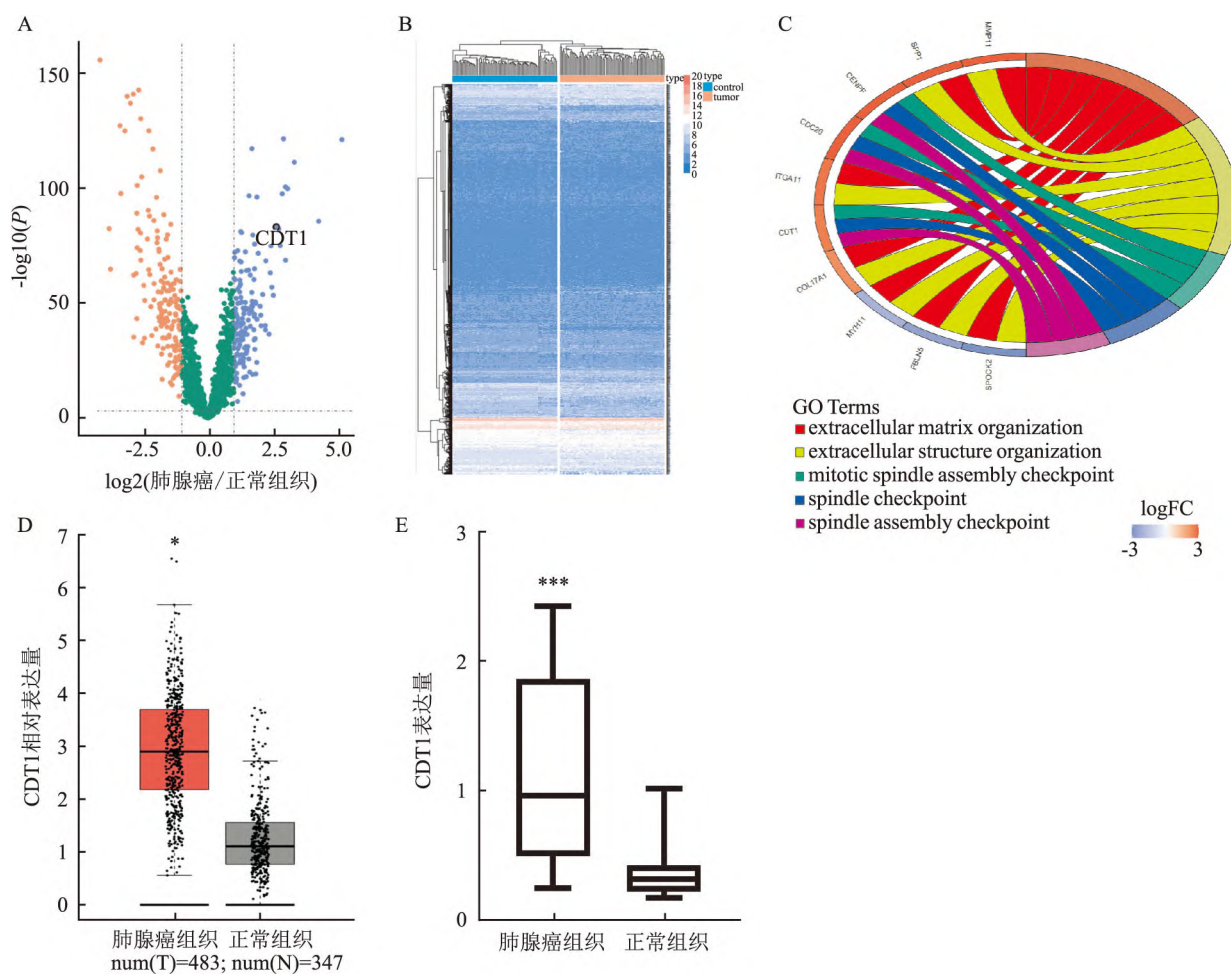


图1 生物信息结果及 CDT1 在肺腺癌组织中表达

A:TCGA 数据库中各基因变化情况;B:TCGA 数据库中各基因的表达情况;C:GO 分析结果;D:GEPIA 中 CDT1 在肺腺癌、正常组织中的表达;E:临床肺腺癌组织及正常组织的 CDT1 的表达;与正常组比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

($t = 11.52$, $P = 0.0003$), 差异有统计学意义(图 4E)。

2.5 敲低、过表达 CDT1 后 p53、TPX2 的表达变化

敲低 CDT1 后 p53($t = 3.434$, $P = 0.0264$) 表达相对于对照组表达明显升高, TPX2($t = 12.35$, $P = 0.0002$) 表达明显降低, 差异有统计学意义; 过表达 CDT1 后 p53($t = 3.758$, $P = 0.0198$) 表达明显降低, TPX2($t = 6.944$, $P = 0.0023$) 表达明显升高, 差异有统计学意义。见图 5。

3 讨论

肺癌是全球癌症死亡的主要死因, 2020 年全球有 2 206 771 例新发肺癌病例和 1 796 144 例死亡病例^[6], 而肺腺癌又是其主要亚型。尽管近几十年来免疫治疗、放疗和手术切除等多模式治疗策略取得了长足进步, 但治愈肺癌的结果仍不尽如人意, 其 5 年生存率不到 20%^[6]。因此, 迫切需要有效的肺腺

癌生物标志物和新的治疗靶点。

有研究^[7]表明 CDT1 与多种肿瘤的预后相关, 但在肺腺癌中作用机制及预后未见明确报道。本研究中, 数据库信息及临床样本显示 CDT1 在肺腺癌组织中高表达, 因此 CDT1 有望作为肺腺癌治疗新的靶点。

TCGA 数据库分析结果表明 CDT1 可作为预测肺腺癌的预后指标, 高表达的 CDT1 患者与低存活率有关。并且 1 年内准确性是更高的。并且近年来, 针对免疫检查点的免疫疗法的临床应用提高了临床疗效, 改变了肺腺癌的治疗范式^[8]。因此课题组将 CDT1 的表达与免疫监测点表达量进行了相关性分析, 在这些分子中与 CD276 正相关最大, CD276 是一种共刺激/共抑制分子, 作为一种共刺激分子, CD276 信号诱导细胞免疫及增强细胞毒性 T 细胞的生成, 而作为一种共抑制分子可以抑制 Treg 细胞, 从而诱导肿瘤免疫逃逸反应^[9]。

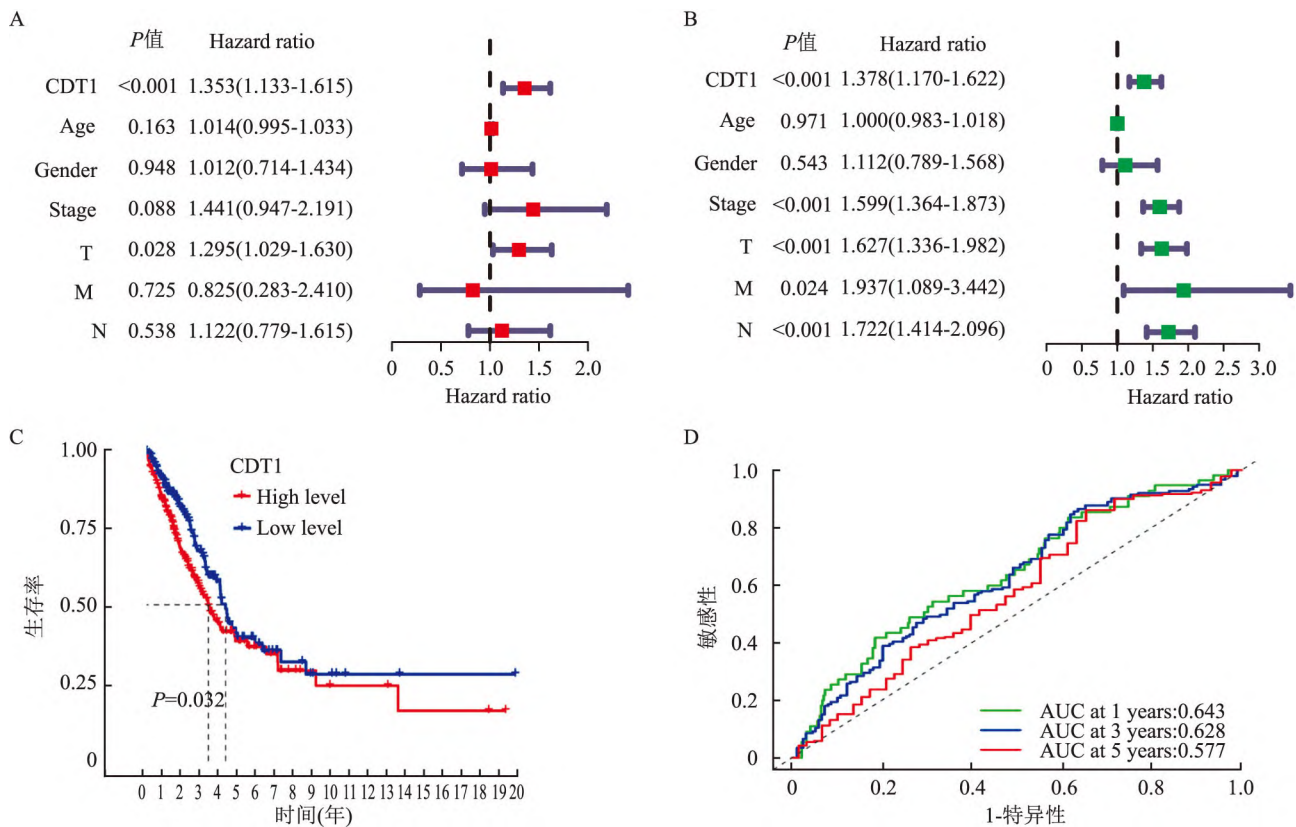


图2 CDT1 对肺腺癌预后的分析

A:对 TCGA 数据库进行单因素 Cox 分析;B:对 TCGA 数据库进行多因素 Cox 分析;C:CDT1 对肺腺癌生存时间的分析;D:CDT1 用于预测肺腺癌患者生存时间的 ROC 曲线

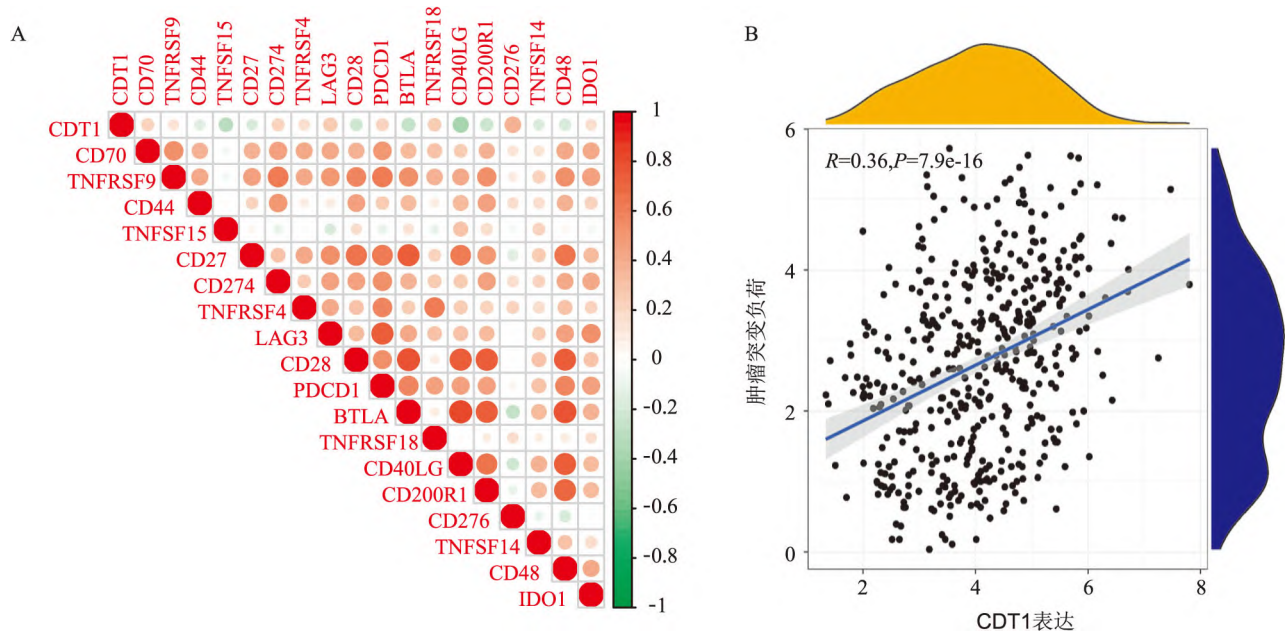


图3 CDT1 对免疫治疗的预测作用

A:CDT1 对免疫检查点的相关性分析;B:CDT1 表达与肿瘤突变负荷的相关性分析

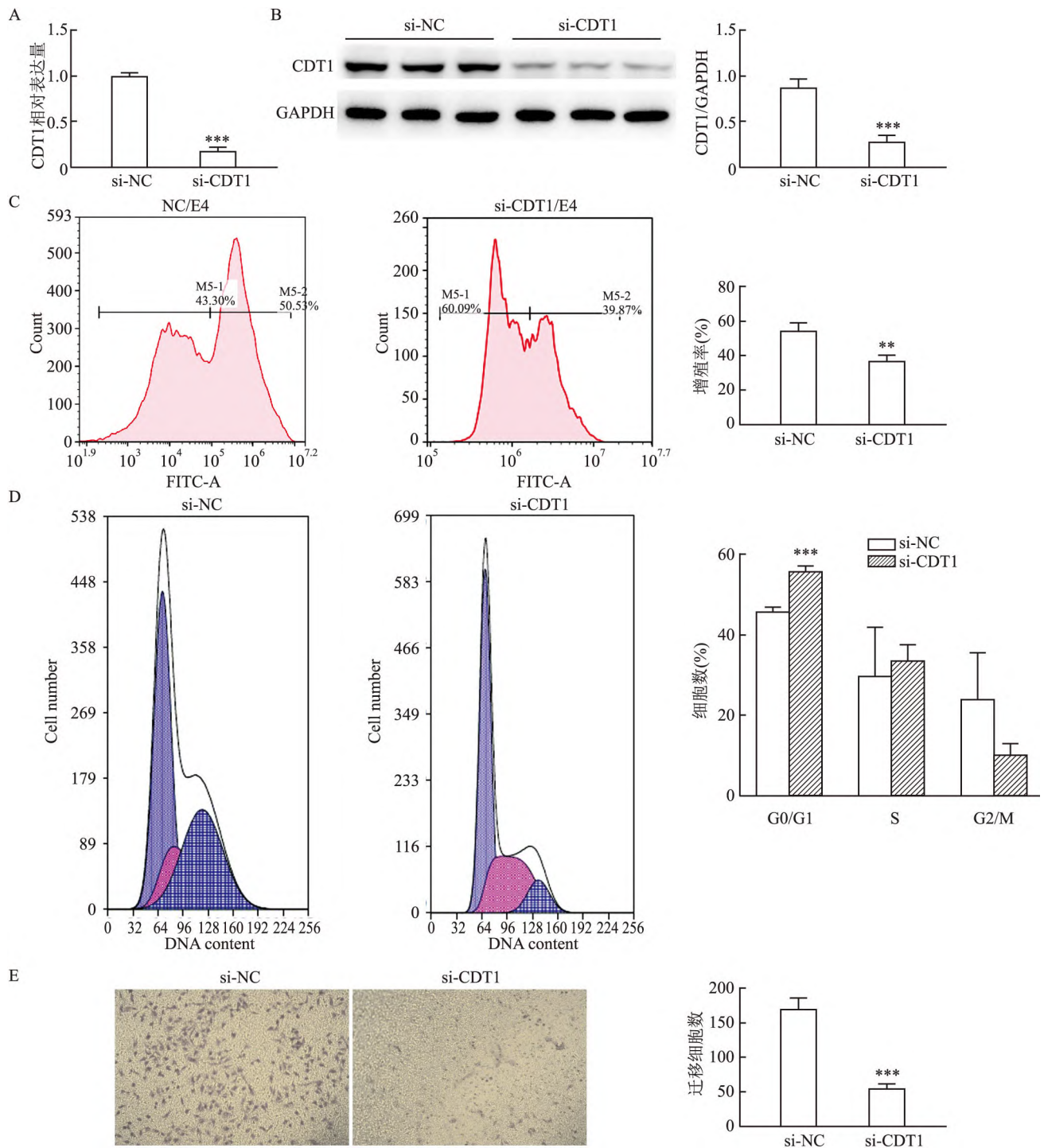


图4 沉默 CDT1 抑制 A549 细胞的增殖、侵袭

A:PCR 检测敲低 CDT1 后基因表达变化;B:Western blot 检测敲低 CDT1 后蛋白表达变化;C:EDU 检测各组细胞增殖变化;D:流式细胞术检测各组细胞周期变化;E:Transwell 检测各组迁移能力变化 ×200;与 si-NC 比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

最后本研究将 CDT1 的表达与肿瘤突变负荷 (Tumor mutational burden, TMB) 进行了相关性分析, TMB 是指肿瘤细胞中体细胞突变的总负荷。高 TMB 患者可能对免疫治疗有反应。TMB 已被开发作为免疫检查点抑制剂的一种预测性生物标志物^[10]。该

实验结果表明 CDT1 表达与 TMB 成正相关。综上所述结果表明 CDT1 的表达与肺腺癌的免疫治疗存在密切的关系。

随后 CDT1 对肿瘤细胞功能的影响进行了实验验证。通过 siRNA 敲低 CDT1 基因后, 发现肺腺癌

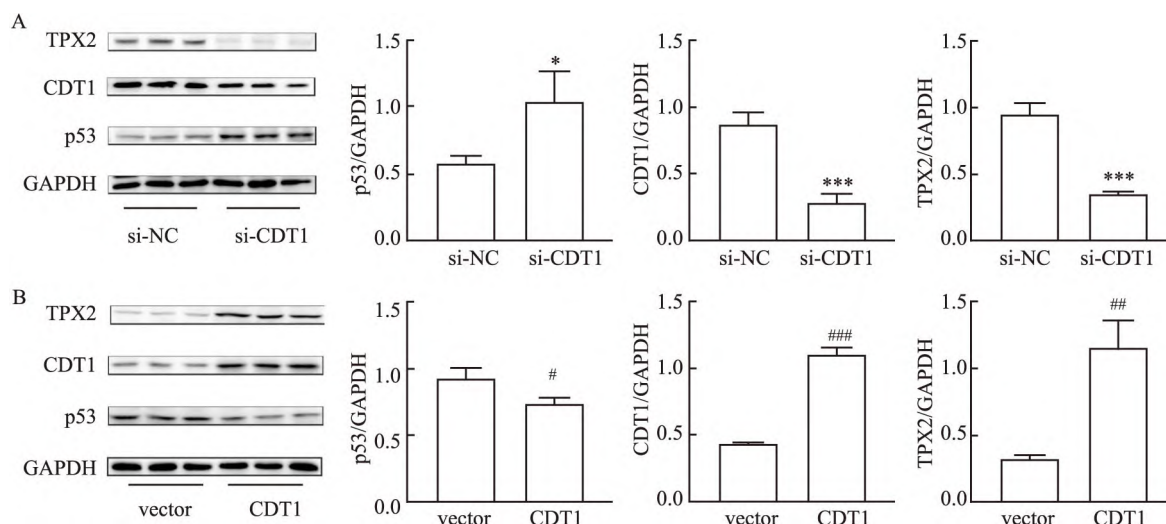


图5 敲低、过表达 CDT1 后 p53、TPX2 的表达变化

A:敲低 CDT1 后 p53、TPX2 的表达;B:过表达 CDT1 后 p53、TPX2 的表达;与 si-NC 比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$;与 vector 比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

增殖能力下降, G0/G1 期细胞明显增加。这与 Cai et al^[3] 在前列腺癌细胞中也发现敲低 CDT1 抑制肿瘤的增殖及改变细胞周期的结果是相一致的。侵袭和转移的激活是癌症的主要特征之一^[11]。又通过 Transwell 实验验证了敲低 CDT1 后细胞侵袭转移能力明显下降。Maimaiti et al^[12] 在乳腺癌中同样发现影响 CDT1 可以改变肿瘤的侵袭转移能力, 本文结果与之一致。

接下来本研究进一步对 CDT1 可能影响肿瘤的通路进行了验证。首先通过肿瘤蛋白互作网络的结果发现 CDT1 与非洲爪蟾驱动蛋白样蛋白 2 (TPX2) 关系密切。TPX2 是有丝分裂纺锤体功能所需的微管相关蛋白, 不仅在细胞周期中起作用, 还参与肿瘤转移、凋亡等过程^[13], 同时 Chen et al^[14] 发现在乳腺癌中靶向 TPX2 可以通过激活 p53 抑制肿瘤的增殖。Western blot 显示敲低 CDT1 后, TPX2 表达降低, p53 表达增加, 而过表达 CDT1 后相应蛋白的表达发生了相反的变化。综上所述表明敲低 CDT1 可能通过影响 TPX2 促进 p53 的表达达到抗肿瘤的结果。

本研究揭示了 CDT1 在肺癌的发生发展中的潜在意义和可能机制, 但仍存在一定的局限性。首先, CDT 的功能评估尚缺乏体内实验的验证。其次, CDT1 的表达与预后意义需要多中心的临床样本去验证。最后, 尽管这项研究表明 CDT1 在调节细胞周期和影响免疫治疗的机体分子机制有待进一步探索。

综上所述, 本研全面系统地评价了 CDT1 在肺癌的发展及预后的影响。为肺癌的治疗确定了新的预后生物标志物和治疗靶点。

参考文献

- [1] Schabath M, Cote M. Cancer progress and priorities: lung Cancer [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2019, 28(10): 1563-79.
- [2] Zhu M, Zeng Q, Fan T, et al. Clinical significance and immunometabolism landscapes of a novel recurrence-associated lipid metabolism signature in early-stage lung adenocarcinoma: a comprehensive analysis [J]. Front Immunol, 2022, 13: 783495.
- [3] Cai C, Zhang Y, Hu X, et al. CDT1 is a novel prognostic and predictive biomarkers for hepatocellular carcinoma [J]. Front Oncol, 2021, 11: 721644.
- [4] Wang C, Che J, Jiang Y, et al. CDT1 facilitates metastasis in prostate cancer and correlates with cell cycle regulation [J]. Cancer Biomark, 2022, 34(3): 459-69.
- [5] Shi H, Huang S, Luo W, et al. Elevated expression of CDT1 in childhood acute lymphoblastic leukemia promotes cell proliferation, invasion and migration through activation of EMT [J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2021, 35.
- [6] Jin C, Du L, Nuerlan A, et al. High expression of RRM2 as an independent predictive factor of poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma [J]. Aging (Albany NY), 2020, 13(3): 3518-35.
- [7] Zheng L, Meng Y, Campbell J, et al. Multiple roles of DNA2 nuclease/helicase in DNA metabolism, genome stability and human diseases [J]. Nucleic Acids Res, 2020, 48(1): 16-35.
- [8] Song P, Li W, Guo L, et al. Identification and validation of a novel signature based on NK cell marker genes to predict prognosis and immunotherapy response in lung adenocarcinoma by integrated

- analysis of single-cell and bulk RNA-sequencing [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 850745.
- [9] Zhang C, Hao X. Prognostic significance of CD276 in non-small cell lung cancer [J]. *Open Med (Wars)*, 2019, 14: 805–12.
- [10] Sung M, Wang Y, Li C. Open the technical black box of tumor mutational burden (TMB): factors affecting harmonization and standardization of panel-based TMB [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (9): 5097.
- [11] Saha T, Solomon J, Samson A O, et al. Invasion and metastasis as a central hallmark of breast cancer [J]. *J Clin Med*, 2021, 10 (16): 3498.
- [12] Maimaiti Y, Zhang N, Zhang Y, et al. CircFAM64A enhances cellular processes in triple-negative breast cancer by targeting the miR-149-5p/CDT1 axis [J]. *Environ Toxicol*, 2022, 37 (5): 1081–92.
- [13] Zhang B, Zhang M, Li Q, et al. TPX2 mediates prostate cancer epithelial-mesenchymal transition through CDK1 regulated phosphorylation of ERK/GSK3 β /SNAIL pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 546: 1–6.
- [14] Chen M, Zhang H, Zhang G, et al. Targeting TPX2 suppresses proliferation and promotes apoptosis via repression of the PI3k/AKT/P21 signaling pathway and activation of p53 pathway in breast cancer [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 507 (14): 74–82.

Targeting CDT1 inhibit tumor growth and its mechanism in lung adenocarcinoma

Mi Yuan¹, Liang Yuxiang², Wang Cong³, Li Desi⁴, Song Chuntao¹, Su Jie¹, Zhang Qingcai⁵, Wang Lei²

(¹Dept of Emergency, ²Dept of Thoracic Surgery, The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shi Jiazhuang 050000; ³Dept of Pharmacy, ⁵Dept of Sports, Hebei Medical University, Shi Jiazhuang 050000; ⁴Dept of Medical, The Third Hospital of Hebei Medical University, Hebei Medical University, Shi Jiazhuang 050000)

Abstract Objective To explore the clinical significance and mechanisms of chromatin licensing and DNA replication factor 1 (CDT1) in lung adenocarcinoma). **Methods** The gene expression samples of lung adenocarcinoma tissue and normal lung tissue were downloaded from the TCGA database, and perform differential analysis, GO analysis, independent prognosis analysis, and correlation analysis with immunotherapy using R language. CDT1 expression in lung adenocarcinoma and normal tissues was detected by PCR in clinical samples. The changes of cell proliferation and cycle in si-CDT1 knockdown group and si-NC control group were detected by flow cytometry. The invasive ability of each group was detected by Transwell. The expressions of CDT1, TPX2 and p53 in each group were detected by Western blot. **Results** The TCGA data analysis revealed CDT1 as a differentially expressed gene. GO analysis indicated that CDT1 was closely associated with the cell cycle. The high expression of CDT1 in lung adenocarcinoma tissues was validated in clinical samples. CDT1 could serve as an independent factor for predicting the prognosis of lung adenocarcinoma and had predictive value for immunotherapy in lung adenocarcinoma. Knockdown of CDT1 resulted in a significant decrease in cell proliferation ability compared to the control group, and cells were noticeably arrested in the G1 phase. Transwell assay results demonstrated a significant reduction in invasive capacity in the CDT1 knockdown group. Knockdown of CDT1 led to a significant decrease in TPX2 expression and a significant increase in p53 expression, while overexpression of CDT1 yielded the opposite effect. **Conclusion** Results demonstrate the elevated expression of CDT1 in lung adenocarcinoma, its association with prognostic significance, and its impact on lung adenocarcinoma's occurrence and development by influencing TPX2 and p53.

Key words lung adenocarcinoma; CDT1; p53; TPX2; tumor proliferation