

·生物信息学·

# CDKN2A 基因突变与肾细胞癌药物敏感性和预后的关系

李 松<sup>1</sup>,李瑞杰<sup>2</sup>,赵小磊<sup>1</sup>

(1.河南大学淮河医院泌尿外科,河南 开封 475000;

2.郑州市第二人民医院综合科,河南 郑州 450000)

**摘要:**目的 明确 CDKN2A 突变状态对肾癌进展机制及药物敏感性的影响。方法 使用开源网络工具 cBioPortal 分析肾癌患者 CDKN2A 突变类型、频率及生存状况(总体生存和无疾病生存),采用 GDSC 平台绘制关于 CDKN2A 的药物敏感火山图和散点图,基因集富集分析(GSEA)评估预定义基因集中的基因分布,绘制差异表达基因(DEGs)和 DEGs 火山图。结果 TCGA 数据显示,5.00%的肾细胞癌存在 CDKN2A 突变,CDKN2A 突变的肾细胞癌患者总体生存率和无病生存率较差;CDKN2A 突变可能会增加对 Tenovin-6 等药物的耐药性,这在各种肿瘤和肾细胞癌中的野生型具有显著的选择性。GO 和 KEGG 分析显示,DEGs 在与细胞分裂和多种代谢进展相关的通路中富集。结论 多个基因和通路途径可能在 CDKN2A 突变中起关键作用。

**关键词:**肾透明细胞癌;TCGA;CDKN2A;药物敏感性

中图分类号:R737.11

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2022.16.001

文章编号:1006-1959(2022)16-0001-06

## Relationship Between CDKN2A Gene Mutation and Drug Sensitivity and Prognosis of Renal Cell Carcinoma

LI Song<sup>1</sup>,LI Rui-jie<sup>2</sup>,ZHAO Xiao-lei<sup>1</sup>

(1.Department of Urology,Huaihe hospital,Henan University,Kaifeng 475000,Henan,China;

2.Department of General Medicine,Zhengzhou Second People's Hospital,Zhengzhou 450000,Henan,China)

**Abstract: Objective** To clarify the effect of CDKN2A mutation status on the progression mechanism and drug sensitivity of renal cell carcinoma.

**Methods** The open source network tool cBioPortal was used to analyze the mutation type, frequency and survival status (overall survival and disease-free survival) of CDKN2A in patients with renal cell carcinoma. The GDSC platform was used to draw the drug-sensitive volcano map and scatter plot of CDKN2A. The gene set enrichment analysis (GSEA) was used to evaluate the gene distribution in the predefined gene set, and the differentially expressed genes (DEGs) and DEGs volcano map were drawn. **Results** TCGA data showed that 5.00 % of renal cell carcinoma had CDKN2A mutation, and the overall survival and disease-free survival of patients with CDKN2A mutation were poor. CDKN2A mutations might increase resistance to drugs such as Tenovin-6, which was significantly selective for wild-type in various tumors and renal cell carcinoma. GO and KEGG analysis showed that DEGs were enriched in pathways associated with cell division and multiple metabolic processes. **Conclusion** Multiple genes and pathways may play a key role in CDKN2A mutation.

**Key words:** Kidney renal clear cell carcinoma;TCGA;CDKN2A;Drug sensitivity

肾透明细胞癌(kidney renal clear cell carcinoma)是泌尿系统肾细胞癌的一个独特亚型,根治性切除是肾细胞癌的主要治疗方法,其次是化疗和靶向治疗。然而,即使手术治疗成功,仍有 30%的患者可能出现肿瘤复发或远处转移<sup>[1-3]</sup>。不同基因突变的患者可能对不同的药物治疗产生耐药性,因此对不同基因突变的患者进行个体化治疗更为重要<sup>[4]</sup>。因此,确定肾细胞癌进展和预后的潜在生物标志物和潜在相关分子机制是必要的,寻找潜在相关的靶向药物对于个体化治疗至关重要。Xu J 等<sup>[5]</sup>研究证实,CDKN2A 启动子甲基化发生在支气管细胞癌变的早期。Hayashi T 等<sup>[6]</sup>研究了胃癌患者的肿瘤组织,发现

CDKN2A 的失活通常是由 5'CpG 岛的纯合缺失和高甲基化引起的,这在胃癌的发生发展中起着重要作用。Wang L 等<sup>[7]</sup>发现,在 77 例平滑肌肉瘤患者中,22%的患者存在 CDKN2A 基因启动子高甲基化,表明 CDKN2A 启动子高甲基化及其蛋白表达缺失与预后不良密切相关。然而,CDKN2A 在肾细胞癌中的作用尚不确定<sup>[8]</sup>。CDKN2A 突变状态可能影响某些肾细胞癌患者的病情进展和治疗。因此,探索 CDKN2A 突变患者的一些相关信号通路将有助于进一步了解肾细胞癌进展的分子水平机制,并为患者的个体化治疗策略提供指导。为了探索肾细胞癌预后和个体化治疗反应的机制,本研究对肾细胞癌的 RNA 测序数据集以分析基因突变,研究泛癌和肾细胞癌中 CDKN2A 突变的药物敏感性。

### 1 资料与方法

1.1 数据来源 从在线探索工具 TCGA 数据库下载 (<http://xena.ucsc.edu/>) 肾细胞癌基因表达谱(使用 AgilentG4502A\_07\_3 的肾细胞癌 RNA 表达和突变基因)和临床信息。采用开源网络工具 cBioPortal 分析 Kaplan-Meier 图和 CDKN2A 突变 (<http://www.>

基金项目:1. 河南省重点研发与推广专项(科技攻关)(编号:212102310685);2.河南省医学科技公关项目(编号:LHGJ20210578; LHGJ20200560);3.开封市科技开放合作项目(编号:2106006)

作者简介:李松(1990.4-),男,河南开封人,硕士,主治医师,主要从事泌尿外科、肾癌的研究

通讯作者:赵小磊(1980.8-),男,河南开封人,硕士,主治医师,主要从事泌尿外科、肾癌的研究

cbioportal.org/index.do)。BioPortal 数据库(<http://www.cbioportal.org>)整合了各种基因数据类型,包括 TC-GA、UCSC、GDAC 等,从 cBioPortal 数据库获得 600 份肾细胞癌样本,通过数据库筛选选项,提取患者相关资料,筛选条件:①“Cancer Type:KIRC”;②“Gene:CDKN2A”;③“Data Type:mRNA”。应用 survival 选项分析 600 份样本中 CDKN2A 突变情况与生存时间(总体生存和无疾病生存)关系图,对 3 种不同肾细胞癌研究中突变类型的 mRNA 表达进行比较。

1.2 GDSC 数据库分析 癌症药物敏感性基因组学数据库(GDSC)(<https://www.cancerrxgene.org/>)是癌症临床研究中常用的数据库之一,收集了大量关于肿瘤细胞药物敏感性的信息,进入数据库所有药物的界面,将“CDKN2A”数据集数据与化合物敏感性相关联,查看泛癌和肾细胞癌中 CDKN2A 突变在药物的细胞系 IC<sub>50</sub> 图,并绘制和生成与相应药物敏感性的火山图和散点图。

1.3 基因集富集分析 基因集富集分析(GSEA)用于评估按表型相关性排序的基因列表中预定义基因集中的基因分布,以确定它们对表型的作用(<http://software.broadinstitute.org/gsea/download.jsp>)。应用分子特征数据库(MSigDB),基于标称  $P$  值和标准化富集分数(NES)分析路径富集。根据 CDKN2A 基因表达量分为两组,通过 GSEA4.1.0 分析 CENPF 基因表达水平对各种生物通路基因集的影响,按照默认富集加权统计方法,选择 MSigDB 数据库的基因集(c2.cp.kegg.v7.2.symbols.gmt)作为参照基因集,置换次数为 1000 次,计算基因富集得分(enrichment score,ES)。

1.4 差异基因(DEGs)的鉴定与富集分析 使用 R 软件包在微阵列数据中选择  $-\log_{10}(P \text{ value}) > 2$  且  $|\log_2(\text{fold change})| < 1$  的 DEGs。由 DAVID(<http://david.ncifcrf.gov>)对 DEGs 进行 KEGG 途径和 GO 富

集分析,其中  $FDR < 0.05$ ,  $-\log FDR > 1.302$  的前几个通路被认为是显著的。

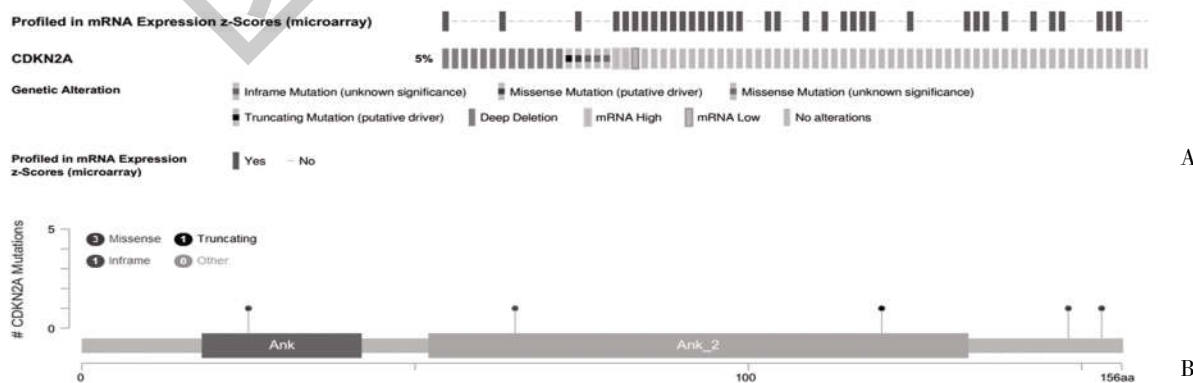
1.5 统计学方法 采用 Wilcoxon 试验比较突变型和野生型之间的 CDKN2A mRNA 表达水平;采用 Kaplan-Meier 法和 Log rank 检验,通过 Graphpad 计算不同 CDKN2A 组之间的临床结果;edgeR 和 GSEA 中的 FDR 分别采用 Benjamini-Hochberg 程序进行多次试验调整,以控制 FDR。 $P < 0.05$  被认为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 肾细胞癌中的 CDKN2A 表达及突变 600 例肾细胞癌样本中有 5.00% 的 CDKN2A 突变病例,其余为野生型(图 1A)。CDKN2A 在肾细胞癌中的突变类型包括亚基突变、错义突变、截断突变和跨越整个基因的深度缺失(图 1B)。其中,3.00% 为深度缺失,2.00% 为错义突变、截断突变和 inframe 突变(图 2A)。CDKN2A 突变类型为深度缺失的 mRNA 表达低于野生型(图 2B);与突变型相比,野生型的 CDKN2A 表达较高(图 2C);CDKN2A 在肾细胞癌中的表达高于正常肾组织。

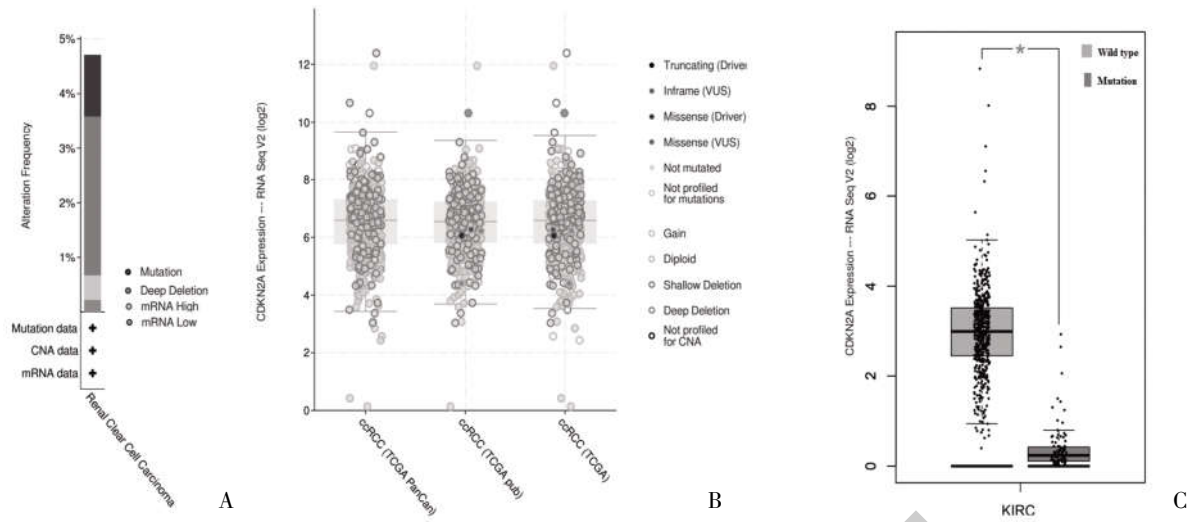
2.2 CDKN2A 基因突变对肾细胞癌患者预后和药物敏感性的影响 肾细胞癌患者的临床特征见表 1,生存分析显示,具有 CDKN2A 突变的肾细胞癌患者总体生存率和无病生存率较差(图 3),在泛癌和肾细胞癌中,CDKN2A 突变型可能比野生型增加对 Tenovin-6 等药物的耐药性,并且 Tenovin-6 对各种癌症和肾细胞癌中的野生型具有选择性(图 4)。

2.3 基于 GSEA 的 CDKN2A 突变信号通路分析 GSEA 分析显示,CDKN2A 突变信号通路主要富集在 Wnt-catenin 信号、泛素介导的蛋白水解、紧密连接、TGF- $\beta$  信号、磷脂酰肌醇信号、erbb 信号和粘附连接(图 5)。



注:A:突变频率;B:突变位点

图1 肾细胞癌中 CDKN2A 的突变

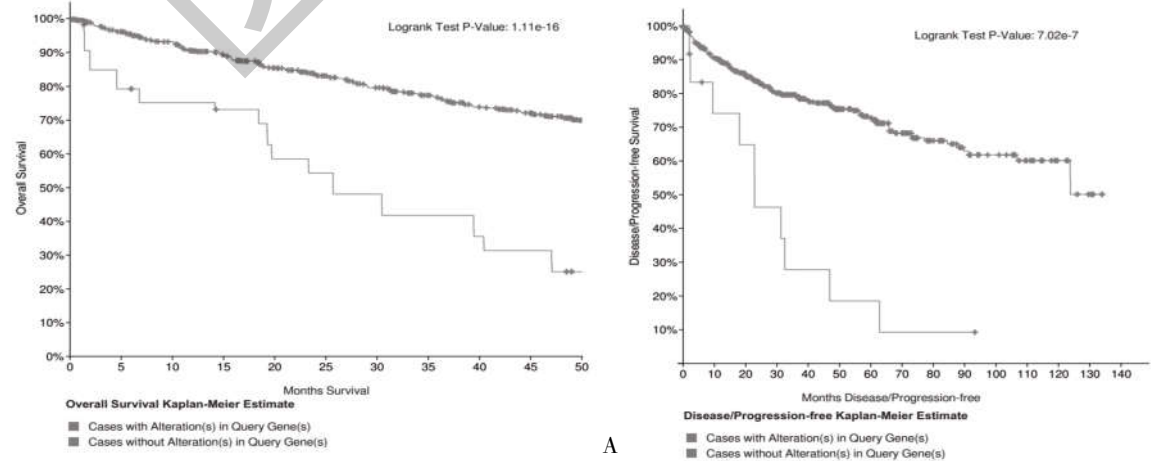


注:A、B:突变类型比率;C:基因表达

图 2 肾细胞癌中 CDKN2A 的突变表达

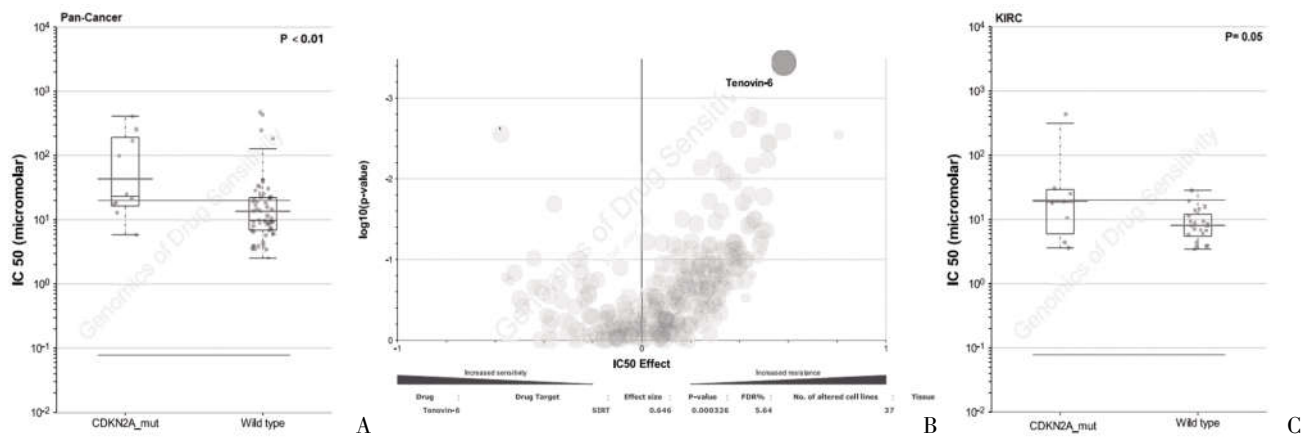
表 1 肾细胞癌患者的临床特征

项目	CDKN2A 突变		项目	CDKN2A 突变	
	野生型	突变型		野生型	突变型
平均年龄(岁)	57	53	AJCC 分期		
年龄范围(岁)	30~90	27~87	Stage I	60	2
性别			Stage II	115	9
女	168	7	Stage III	95	2
男	168	7	Stage IV	66	1
肿瘤分期			组织学分级		
T <sub>1</sub>	65	2	G1	55	2
T <sub>2</sub>	110	8	G2	120	8
T <sub>3</sub>	90	2	G3	100	4
T <sub>4</sub>	71	2	G4	61	0
N 分期					
N <sub>0</sub>	220	10			
N <sub>1</sub>	116	4			



注:A:CDKN2A 突变的肾透明细胞癌患者的总生存率;B:CDKN2A 突变的肾透明细胞癌患者的无疾病进展曲线

图 3 CDKN2A 基因突变对肾细胞癌患者预后的影响



注:A、B:具有 CDKN2A 突变的多种癌细胞类型对 Tenovin-6 等药物具有耐药性;C:具有 CDKN2A 突变的肾细胞癌细胞也对 Tenovin-6 具有耐药性

图 4 CDKN2A 基因突变对肾细胞癌患者药物敏感性的影响

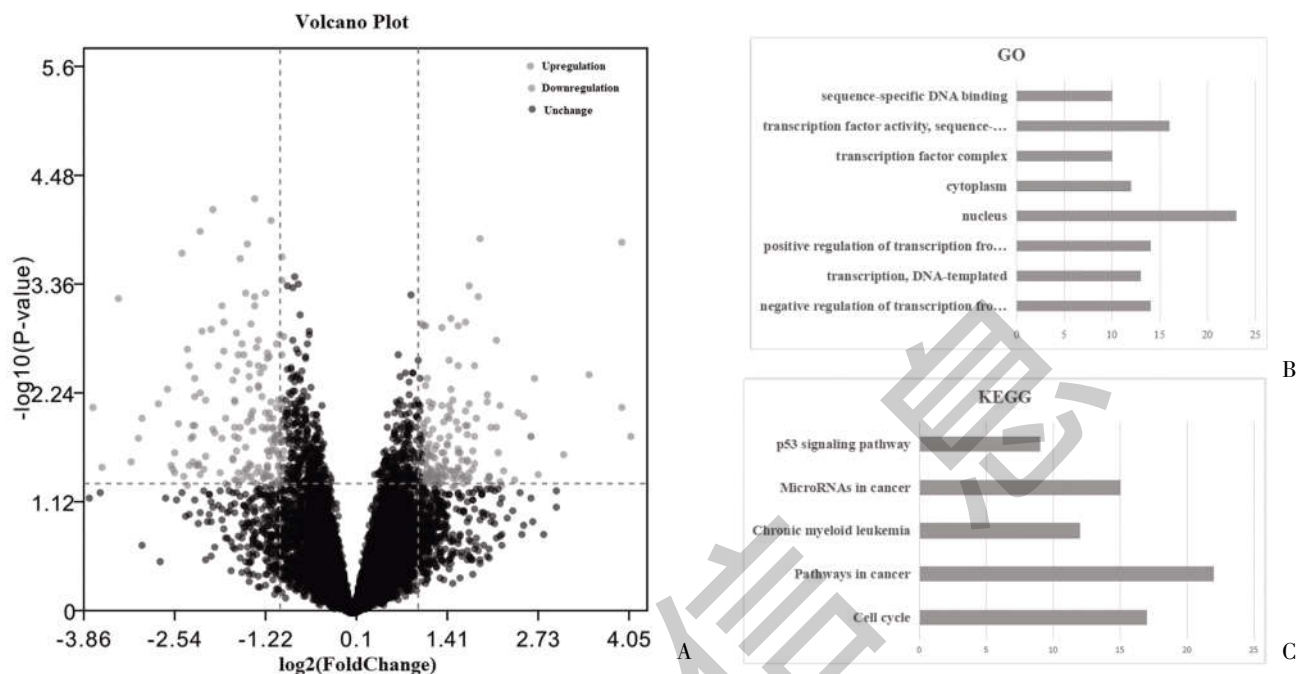


图 5 肾细胞癌 CDKN2A 突变的 GSEA 富集分析



2.4 DEGs 的鉴定和富集分析 共有 350 个基因被鉴定为 DEGs, 包括 170 个下调基因和 180 个上调基因。DEGs 的火山图见图 6A。使用 DAVID 对 DEGs 进行富集分析, GO 分析结果表明, DEGs 主要富集于 RNA 聚合酶 II 启动子、转录、细胞核、细胞质、转

录因子复合物和序列特异性 DNA 结合的转录负调控, 见图 6B。KEGG 通路分析显示, DEGs 主要富集于细胞周期、癌症、慢性髓系白血病、癌症中的 mi-croRNA 和 p53 信号通路, 见图 6C。



注:A:DEGs 表达火山图,上调基因在右侧,下调基因在左侧;B:DEGs 的 GO 富集分析;C:DEGs 的 KEGG 通路分析

图 6 DEGs 的鉴定和富集分析

### 3 讨论

CDKN2A 基因位于染色体 9p21 上, 受调控的 CDKN2A 蛋白包含 156 个氨基酸, 在细胞周期中调节细胞增殖并抑制肿瘤的产生, 该基因的失活可导致细胞分离控制和恶性进展为肿瘤<sup>[9]</sup>。目前研究发现, 该基因在许多肿瘤中丢失或发生突变。CDKN2A 基因失活的机制包括启动子甲基化、纯合缺失和点突变, 平均频率分别为 33%、22% 和 15%; 另外, 研究还发现 9p21 区域杂合性缺失与肿瘤发生有关<sup>[10]</sup>。

CDKN2A 在各种肿瘤的恶性转化中突变类型包括纯合缺失(HD)、杂合性缺失(LOH)、p16INK4a/p14ARF 基因启动子的突变和异常甲基化<sup>[11]</sup>。Ibrahim I 等<sup>[12]</sup>研究了肺癌、卵巢癌和头颈部鳞状细胞癌的 89 个细胞系中 246 个位点的纯合缺失, 发现 CDKN2A 基因的纯合缺失最常见(26%), 且与疾病预后的关系不同。本研究发现, 肾细胞中约 5.00% 的患者携带 CDKN2A 突变, 包括亚基突变、错义突变、截断突变和跨越整个基因的深度缺失, 其中 3.00% 为深度缺失, 2.00% 为错义突变、截断突变和近端突变。Thompson ED 等<sup>[13]</sup>发现, CDKN2A 的总突变率为 93.3%, 启动子异常甲基化占 46.7%, 纯合缺失占 36.7%, 突变占 13.3%。

Ibrahim IS 等<sup>[14]</sup>发现, CDKN2A 启动子甲基化与直肠癌患者的复发和预后相关, 表明 CDKN2A 启动子甲基化可作为预测直肠癌预后的指标。Potjer TP 等<sup>[15]</sup>发现, 胰腺癌患者的肿瘤组织中存在一种特殊的 CDKN2A 突变, 表明 CDKN2A 突变可能被用作胰腺癌的标志物。本研究显示, CDKN2A 突变的肾细胞癌患者总体生存率和无病生存率较差, 这表明 CDKN2A 突变可能有助于肾细胞癌的进展。除此之外, 降低 CDKN2A 表达水平已被证明可增加肿瘤细胞对化疗或放疗的耐受性<sup>[16]</sup>。因此, CDKN2A 可以作为新的抗癌治疗策略的靶点。本研究发现, 与野生型相比, CDKN2A 突变对 Tenovin-6 等药物的敏感性较低, 这表明 Tenovin-6 突变在治疗上的预后较差, 并且在各种癌症和肾细胞癌中, Tenovin-6 对野生型具有显著的选择性。随着组蛋白去乙酰化酶(HDAC)的发展, HDAC 抑制剂(HDACi)已成为抗肿瘤药物的研究热点<sup>[17]</sup>。Tenovin-6 是近年来开发的一种 HDACi, 是脱乙酰酶 SIRT1 的抑制剂, 选择性地抑制Ⅲ类 HDACs 中最常见的 SIRT1 和 SIRT2, 并激活 P53, 具有更大的临床应用价值。Tenovin-6 可以抑制肿瘤细胞的增殖, 促进细胞凋亡和周期阻滞<sup>[18]</sup>。这些研究为肾细胞癌患者个体化应用特异性抗肿瘤

药物提供了额外证据,并为进一步研究提供了基础。

本研究发现,肾细胞癌患者 CDKN2A 突变信号通路主要富集 Wnt-catenin 信号、泛素介导的蛋白水解、紧密连接、TGF- $\beta$  信号、磷脂酰肌醇信号、erbB 信号和粘附连接。已有研究证实<sup>[12]</sup>,CDKN2A 基因的负调控途径是 RB1 途径。CDKN2A 蛋白包含四个连续的锚蛋白重复序列,它们与 CDK4 和 CDK6 结合,而 CDK4 和 CDK6 是一种双周期依赖性蛋白激酶,作用于 CDK4-6 的非催化侧,可抑制 CDK 和细胞周期蛋白 D1 复合物的催化活性<sup>[19]</sup>。CDKN2A 突变可能通过影响多种途径促进肾细胞癌的进展,CDKN2A 突变患者的肿瘤可能更容易进展和远处转移<sup>[20]</sup>。另外,本研究还发现,GO 分析中差异基因主要富集在 RNA 聚合酶 II 启动子、转录的负调控中。

综上所述,多个基因和通路途径可能在 CDKN2A 突变中起关键作用。本研究确定了与肾细胞癌中 CDKN2A 突变相关的主要途径,这可能通过制定肾细胞癌特定 CDKN2A 突变亚型的治疗策略来改善肾细胞癌的预后。另外,肾细胞癌中 CDKN2A 突变的机制和验证仍需临床和分子生物学实验中进一步研究。

#### 参考文献:

- [1]Chen W,Zheng R,Baade PD,et al.Cancer statistics in China, 2015[J].CA Cancer J Clin,2016,66(2):115-132.
- [2]Su D,Singer EA,Srinivasan R.Molecular pathways in renal cell carcinoma: recent advances in genetics and molecular biology[J].Curr Opin Oncol,2015,27(3):217-223.
- [3]Ljungberg B,Bensalah K,Canfield S,et al.EAU guidelines on renal cell carcinoma: 2014 update[J].Eur Urol,2015,67(5):913-924.
- [4]Kamal Y,Cheng C,Frost HR,et al.Predictors of disease aggressiveness influence outcome from immunotherapy treatment in renal clear cell carcinoma [J].Oncoimmunology,2018,8 (1): e1500106.
- [5]Xu J,Li N,Deng W,et al.Discovering the mechanism and involvement of the methylation of cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A) gene and its special locus region in gastric cancer[J].Bioengineered,2021,12(1):1286-1298.
- [6]Hayashi T,Shibata T,Nakamura M,et al.MAFK Polymorphisms Located in 3'-UTR are Associated with Severity of Atrophy and CDKN2A Methylation Status in the Gastric Mucosa [J].Genet Test Mol Biomarkers,2021,25(4):255-262.
- [7]Wang L,Xu L,Wang Y.Huaier Inhibits Proliferation, Migration, and Invasion of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Cells by Inhibiting the Methylation Levels of CDKN2A and TP53[J].Integr Cancer Ther,2021,20:15347354211031646.
- [8]Sumida K,Han Z,Dashputre AA,et al.Association between Nrf2 and CDKN2A expression in patients with end-stage renal disease: a pilot study[J].Aging (Albany NY),2020,12(16):16357-16367.
- [9]Bartels S,van Luttikhuisen JL,Christgen M,et al.CDKN2A loss and PIK3CA mutation in myoepithelial-like metaplastic breast cancer[J].J Pathol,2018,245(3):373-383.
- [10]Frazão L,do Carmo Martins M,Nunes VM,et al.BRAF V600E mutation and 9p21: CDKN2A/B and MTAP co-deletions-Markers in the clinical stratification of pediatric gliomas[J].BMC Cancer,2018,18(1):1259.
- [11]Gironi LC,Colombo E,Pasini B,et al.Melanoma-prone families: new evidence of distinctive clinical and histological features of melanomas in CDKN2A mutation carriers [J].Arch Dermatol Res,2018,310(10):769-784.
- [12]Ibrahim I,Sibinga Mulder BG,Bonsing B,et al.Risk of multiple pancreatic cancers in CDKN2A-p16-Leiden mutation carriers[J].Eur J Hum Genet,2018,26(8):1227-1229.
- [13]Thompson ED,Roberts NJ,Wood LD,et al.The genetics of ductal adenocarcinoma of the pancreas in the year 2020: dramatic progress, but far to go[J].Mod Pathol,2020,33(12):2544-2563.
- [14]Ibrahim IS,Wasser MN,Wu Y,et al.High Growth Rate of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma in CDKN2A-p16-Leiden Mutation Carriers[J].Cancer Prev Res (Phila),2018,11(9):551-556.
- [15]Potjer TP,van der Stoep N,Houwing-Duistermaat JJ,et al.Pancreatic cancer-associated gene polymorphisms in a nationwide cohort of p16-Leiden germline mutation carriers; a case-control study[J].BMC Res Notes,2015,8:264.
- [16]Yang C,Cimera RS,Aryeequaye R,et al.Adverse histology, homozygous loss of CDKN2A/B, and complex genomic alterations in locally advanced/metastatic renal mucinous tubular and spindle cell carcinoma[J].Mod Pathol,2021,34(2):445-456.
- [17]McClure JJ,Li X,Chou CJ.Advances and Challenges of HDAC Inhibitors in Cancer Therapeutics [J].Adv Cancer Res,2018,138:183-211.
- [18]Ke X,Qin Q,Deng T,et al.Heterogeneous Responses of Gastric Cancer Cell Lines to Tenovin-6 and Synergistic Effect with Chloroquine[J].Cancers (Basel),2020,12(2):365.
- [19]Aftab A,Shahzad S,Hussain HMJ,et al.CDKN2A/P16INK4A variants association with breast cancer and their in-silico analysis [J].Breast Cancer,2019,26(1):11-28.
- [20]Sun Q,Chen S,Hou Y,et al.Mutant CDKN2A regulates P16/p14 expression by alternative splicing in renal cell carcinoma metastasis[J].Pathol Res Pract,2021,223:153453.

收稿日期:2022-01-05;修回日期:2022-01-16

编辑/成森