

CDK4 和 Geminin 在胶质瘤中的表达及其与预后的关系

田 薇¹, 章建国¹, 刘益飞¹, 王东林^{2*}, 黄 华¹

(¹南通大学附属医院病理科, 江苏 南通 226000; ²南通大学医学院病理教研室, 江苏 南通 226000)

[摘要] 目的:探讨细胞周期依赖性激酶 4(cyclin-dependent kinase 4, CDK4)和 Geminin 在胶质瘤中的表达及其临床病理意义。方法:采用免疫组织化学方法,检测 70 例胶质瘤中 CDK4 和 Geminin 的表达,分析 CDK4 和 Geminin 的表达和其相关性,以及二者与胶质瘤临床病理因素及生存时间的关系。结果:CDK4、Geminin 在胶质瘤中的总阳性率分别为 70.0%(49/70)、75.7%(53/70); II、III、IV 级胶质瘤中 CDK4 阳性率分别为 52.8%(19/36)、84.6%(22/26)、100.0%(8/8), Geminin 阳性率分别为 58.3%(21/36)、92.3%(24/26)、100.0%(8/8), CDK4 和 Geminin 在不同级别胶质瘤中的表达有显著差异 ($P<0.05$)。且二者表达呈正相关; CDK4、Geminin 阳性表达与肿瘤大小及细胞核分裂像多少有关 ($P<0.05$), 与患者年龄、性别以及肿瘤组织有无坏死无关 ($P>0.05$); Kaplan-Meier 单因素统计分析结果显示 CDK4、Geminin 阳性表达组的患者术后生存时间明显短于 CDK4、Geminin 阴性表达组 ($P<0.001$)。结论:CDK4 和 Geminin 表达与胶质瘤的分级、预后有关,联合检测 CDK4 和 Geminin 有助于判断胶质瘤恶性程度及评估预后。

[关键词] 胶质瘤; 周期蛋白依赖性激酶 4; Geminin

[中图分类号] R739.41

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)06-709-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20170611

Expression and prognostic significance of CDK4 and Geminin in human glioma

Tian Wei¹, Zhang Jianguo¹, Liu Yifei¹, Wang Donglin^{2*}, Huang Hua¹

(¹Department of Pathology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226000; ²Department of Pathology, Medical College, Nantong University, Nantong 226000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the difference of expression and prognostic significance of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) and Geminin in gliomas. **Methods:** Immunohistochemical was used to detect the expressions of CDK4 and Geminin in 70 human gliomas. Their relationships with clinicopathologic factors and survival time of patients were also analyzed. **Results:** The positive rates of CDK4 and Geminin in gliomas were 70.0%(49/70) and 75.7%(53/70), respectively. The positive rates of CDK4 in grade II, grade III, grade IV of gliomas were 52.8%(21/36), 84.6%(22/26) and 100.0%(8/8), and the positive rates of Geminin in grade II, III and IV were 58.3%(21/36), 92.3%(24/26) and 100.0%(8/8), respectively. A statistical significance of their expressions was observed among different grades ($P<0.05$). The expressions of them were positively correlated. The positive expressions of Geminin and CDK4 were related to the tumor size and the number of nuclear division ($P<0.05$), and were not related to age, sex and necrosis of tumor tissue ($P>0.05$). Kaplan-Meier univariate statistical analysis showed that the survival time of patients with positive CDK4 and Geminin expression group was significantly shorter than that of the negative CDK4 and Geminin expression group ($P<0.001$). **Conclusion:** The expressions of CDK4 and Geminin are related to the grading of gliomas and prognosis. Combined detection of CDK4 and Geminin is helpful to judge the malignant degree and prognosis of gliomas.

[Key words] glioma; cyclin-dependent kinase 4; Geminin

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(03): 709-713]

胶质瘤是常见的中枢神经系统肿瘤,占原发性中枢神经系统肿瘤的 20%,中枢神经系统恶性肿瘤的 80%^[1-2]。目前,对于胶质瘤的诊断有了很大进步,

其治疗手段也有多种,如手术治疗、放射治疗、辅助化疗。但是关于胶质瘤的具体发病机制仍不清楚,胶质瘤患者的预后依然较差。因此,研究其发病机制可以为临床更好地治疗胶质瘤患者提供帮助^[3]。肿瘤的发生是多因素作用下多阶段多步骤逐步演变的过程,与肿瘤细胞的凋亡及增殖相关。细胞周期依

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81572491)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: donglin@ntu.edu.cn

赖性激酶4 (cyclin-dependent kinase 4, CDK4) 与 Geminin 都是参与细胞周期调控的分子, 它们在乳腺癌、胃癌等多种肿瘤中表达, 与肿瘤细胞增殖、侵袭性生长密切相关^[4]。研究显示与正常脑组织比较, CDK4 在胶质瘤中表达增高, 目前关于 Geminin 的研究尚少。本研究通过免疫组化, 检测 70 例胶质瘤中 CDK4 和 Geminin 的表达情况, 分析二者的表达及相关性, 探讨它们在胶质瘤进展和侵袭中的意义, 及其与临床病理因素的相关性, 并对胶质瘤患者的预后作出评价。

1 材料和方法

1.1 材料

收集南通大学附属医院 2007 年 12 月—2011 年 12 月手术切除的 70 例脑胶质瘤标本, 有完整临床及随访资料。其中男 34 例, 女 36 例, 年龄 15~78 岁, 平均年龄 45.0 岁。按 WHO2007 年神经系统肿瘤分级标准进行分类分级, 其中 II 级(弥漫性星形细胞瘤) 36 例, III 级(间变性星形细胞瘤) 26 例, IV 级(多形性胶质母细胞瘤) 8 例。另取 20 例脑外伤组织作对照组。

鼠抗人 CDK4 单克隆抗体及 SP 免疫组化试剂盒均购自福州迈新生物技术有限公司, 抗体稀释浓度 1:100; 鼠抗人 Geminin 单克隆抗体(1:300 稀释, Abnova 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色

所用标本均以 4% 多聚甲醛固定 24 h, 常规石蜡包埋, 切片厚度 4 μm , 贴附于预先用 1% 多聚赖氨酸处理的载玻片上 65 $^{\circ}\text{C}$ 烤片 1.5 h, 采用 SP 法检测, 按试剂盒说明操作。以已知阳性肺癌组织切片作为阳性对照, 20 例脑外伤组织作为阴性对照。

1.2.2 结果判断

CDK4 和 Geminin 均定位于细胞核, 阳性结果呈棕黄色或棕褐色颗粒。选取代表性区域, 计数 10 个高倍视野下阳性细胞占细胞总数的百分比, 阳性细胞 <5% 为 -, $\geq 5\% \sim 25\%$ 为 +, $\geq 25\% \sim 50\%$ 为 ++, $\geq 50\%$ 为 +++。

1.2.3 随访

采用电话方式进行随访。随访时间 1~40 个月。至随访结束, 生存 23 例, 死亡 47 例。总生存时间(overall survival, OS)为自手术日期至死亡或随访结束日期。

1.3 统计学方法

运用 SPSS 21.0 软件, 对临床病理资料及表达

的差异性采用卡方检验, 与 WHO 分级相关性用趋势卡方检验, 对生存数据采用 Kaplan-Meier 分析并绘制生存曲线, 应用 Log-rank 法检验差异性, 术后生存时间采用多因素回归分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CDK4 与 Geminin 在胶质瘤中的表达

CDK4 与 Geminin 阳性染色皆定位于肿瘤细胞核, 呈棕黄或棕褐色颗粒状(图 1)。70 例胶质瘤标本中, CDK4、Geminin 阳性表达率分别为 70.0% (49/70)、75.7% (53/70); 对照脑组织 CDK4、Geminin 阳性表达分别为 10.0% (2/20)、40.0% (8/20), 差异有统计学意义 ($\chi^2 < 0.001$, $P < 0.05$; $\chi^2 < 0.001$, $P < 0.05$)。

不同胶质瘤病理分级之间, CDK4、Geminin 表达的差异有统计学意义 (CDK4: $\chi^2 = 29.82$, $P < 0.01$; Geminin: $\chi^2 = 68.75$, $P < 0.01$, 表 1), CDK4、Geminin 与胶质瘤的病理分级呈正相关 (Linear by linear association = 20.851, $P < 0.05$, Linear by linear association = 39.580, $P < 0.05$)。

2.2 CDK4 和 Geminin 表达的相关性分析

直线相关性分析显示, 胶质瘤中 CDK4 与 Geminin 表达呈正相关 ($r_s = 0.712$, $P < 0.05$, 表 2)。

2.3 CDK4 和 Geminin 表达与胶质瘤临床病理因素的关系

CDK4 和 Geminin 表达与患者情况 (年龄, 性别), 肿瘤特点 (肿瘤大小、坏死、核分裂) 的关系见表 3。CDK4、Geminin 阳性表达与肿瘤大小及细胞核分裂像多少有关 ($P < 0.05$), 与患者年龄、性别以及肿瘤组织有无坏死无关 ($P > 0.05$)。

2.4 CDK4 和 Geminin 表达与生存时间的关系

CDK4、Geminin 阳性表达组患者术后生存时间明显短于 CDK4、Geminin 阴性表达组 ($P < 0.001$, 图 2)。

2.5 胶质瘤患者术后生存时间多因素回归分析

COX 多因素生存分析显示, 胶质瘤术后生存时间独立预后因子为肿瘤大小、坏死、核分裂、CDK4 及 Geminin 表达(表 4)。

3 讨论

CDK4 基因定位于 12 号染色体 q13~14, 是细胞周期 G1 期重要的调控分子。它的活性取决于它是与周期素依赖性激酶抑制素结合还是与周期素结合, 以及亚细胞定位和磷酸化状态。CDK4 蛋白表达在不同肿瘤中的表现形式不一样, 脑膜瘤不表达

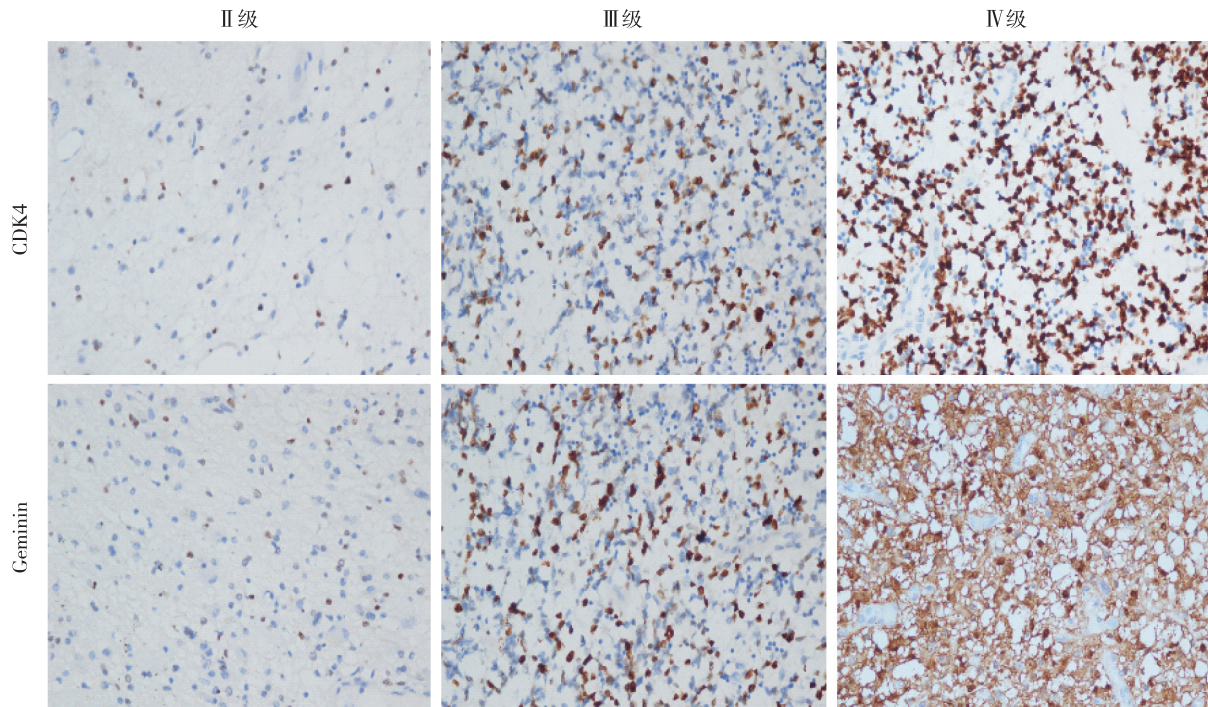


图 1 胶质瘤中 CDK4 和 Geminin 的表达 (SP,×200)

Figure 1 Expressions of CDK4 and Geminin in glioma (SP,×200)

表 1 CDK4,Geminin 蛋白表达及与胶质瘤 WHO 分级的关系

Table 1 Correlation of CDK4,Geminin protein expression and WHO grading of glioma

WHO 分级	例数	CDK4 蛋白表达(例)				CDK4 阳性率(%)	Geminin 蛋白表达(例)				Geminin 阳性率(%)
		-	+	++	+++		-	+	++	+++	
II	36	17	15	4	0	52.8	15	17	4	0	58.3
III	26	4	8	11	3	84.6	2	5	15	4	92.3
IV	8	0	2	4	2	100.0	0	0	0	8	100.0
χ^2 值				29.82					68.75		
Linear by linear association				20.851					39.580		
P 值				<0.05					<0.05		

表 2 脑胶质瘤中 CDK4 与 Geminin 蛋白表达的相关性

Table 2 Correlation between the expression of CDK4 and Geminin in glioma (n)

CDK4 蛋白表达	例数	Geminin 蛋白表达			
		-	+	++	+++
-	21	13	7	1	0
+	25	3	10	9	3
++	19	1	4	9	5
+++	5	0	0	1	4

$\chi^2=25.242, P<0.05; r_s=0.712, P<0.05。$

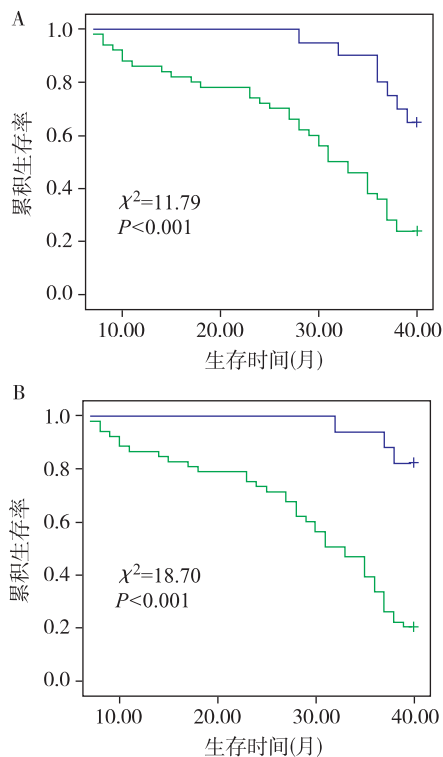
CDK4,88%的肝母细胞瘤过表达 CDK4 [5-6]。曹友红等[7]的研究显示 CDK4 蛋白在胃癌组织中的表达率明显高于癌旁组织,差异有统计学意义。本研究免疫组化结果经统计显示,不同级别胶质瘤间 CDK4 表达有显著差异性,CDK4 表达与胶质瘤病理分级呈正相关,总体相关系数有统计学意义。对 CDK4

表达与临床病理因素(年龄、性别、肿瘤直径、核分裂像、坏死)的分析发现,CDK4 表达与年龄、性别、肿瘤组织有无坏死无关,但是与肿瘤大小及肿瘤细胞核分裂像多少有关。体积大及核分裂像多者 CDK4 阳性表达率高于体积小及核分裂少者。Kaplan-Meier 分析结果显示,CDK4 与胶质瘤患者生存时间的关系有统计学意义,CDK4 阳性表达者的生存时间短于阴性表达者($P<0.05$)。这些结果与一些研究者关于 CDK4 在其他肿瘤中表达情况的研究有相似之处,这提示在胶质瘤细胞生长、迁移等多个过程中有 CDK4 的参与,其表达上调与胶质瘤细胞的侵袭性生物学行为密切相关,是胶质瘤恶性表型的体现。其机制可能为 CDK4 是重要的细胞周期蛋白调控因子,它能够结合某些蛋白限制细胞由 G1 期转化至 S 期的速度[8],当任何原因导致这些基因异常表达

表 3 CDK4、Geminin 表达与胶质瘤临床病理因素的关系

Table 3 Correlation between the expression of CDK4, Geminin and clinical pathologic factors in glioma

临床病理特征	例数	CDK			χ^2 值	P 值	Geminin			χ^2 值	P 值
		阴性 (例)	阳性 (例)	阳性率 (%)			阴性 (例)	阳性 (例)	阳性率 (%)		
年龄					0.292	0.589				0.054	0.816
<50 岁	42	13	29	69.05			10	32	76.19		
≥50 岁	28	7	21	75.00			6	22	78.57		
性别					0.052	0.820				0.068	0.795
男	33	9	24	72.73			8	25	75.76		
女	37	11	26	70.27			9	28	75.68		
大小					5.333	0.021				17.614	<0.001
<4 cm	21	10	11	52.38			12	9	42.86		
≥4 cm	49	10	39	79.59			5	44	89.80		
坏死					3.613	0.057				2.897	0.089
有	8	0	8	100.00			0	8	100.00		
无	62	20	42	67.74			17	45	72.58		
核分裂					15.985	0.001				11.278	0.010
≤2 个	37	20	17	45.95			15	22	59.46		
>2 个	33	3	30	90.91			2	31	93.94		



A:CDK4 阳性组和阴性组的胶质瘤患者生存率;B:Geminin 阳性组和阴性组的胶质瘤患者生存率。

图 2 CDK4 和 Geminin 表达与胶质瘤患者生存时间的关系
Figure 2 Correlation among expressions of CDK4 and Geminin and survival time in glioma

时,细胞周期调节失控,细胞过度增殖,导致肿瘤等疾病的发生和进展^[8-9],CDK4 有望成为评估胶质瘤恶性程度的重要指标。

表 4 胶质瘤患者术后生存时间多因素回归分析

Table 4 Multivariate regression analysis of potential prognostic markers and overall survival of glioma

变量	HR(95%CI)	P 值
肿瘤大小		0.001
<4cm	1	
≥4cm	10.40(2.45~44.08)	
坏死		<0.001
无	1	
有	183.11(21.32~1573.08)	
核分裂		<0.001
无	1	
有	56.69(12.65~254.03)	
CDK4 表达		<0.001
低表达	1	
高表达	9.45(4.17~21.42)	
Geminin 表达		<0.001
低表达	1	
高表达	10.52(4.15~26.63)	

Geminin 是细胞周期相关因子,是 cdc10 依赖性转录因子 1(cell-division cycle 10-dependent transcript 1,cdt1)的抑制因子,它与 cdt1 构成 1 对矛盾体,对细胞周期进行调控,从而保证在 1 个细胞周期, DNA 复制 1 次^[10-12]。研究显示 Geminin 在口腔恶性黑色素瘤中的阳性表达率远远高于黑色素痣^[13],在其他许多恶性肿瘤中也高表达,有望成为判断肿瘤良恶性的特异指标^[14]。本研究 70 例胶质瘤中 Geminin 总阳性表达率为 75.7%(53/70),Ⅲ、Ⅳ级胶质瘤中 Geminin 的阳性表达高于Ⅱ级胶质瘤。不同级别胶

质瘤间,Geminin 表达差异有统计学意义 ($P<0.01$)。Geminin 表达与临床病理因素(年龄、性别、肿瘤直径、核分裂像、坏死)的分析中发现,Geminin 表达与年龄、性别、肿瘤组织有无坏死无关,但是与肿瘤大小及肿瘤细胞核分裂像多少有关($P<0.05$)。Kaplan-Meier 分析结果显示,Geminin 与胶质瘤患者生存时间的关系有统计学意义,Geminin 阳性表达者的生存时间短于阴性表达者($P<0.05$),这提示 Geminin 表达上调与胶质瘤恶性程度相关,促进胶质瘤的浸润性生长,这与乳腺癌中 Geminin 表达情况相似,研究显示肿瘤细胞过表达 Geminin 基因,破坏细胞周期调控,肿瘤细胞出现过度增殖,同时肿瘤细胞的锚定生长能力显著增加^[15]。Geminin 有望成为胶质瘤恶性程度评估的重要指标。

本研究结合 CDK4 蛋白和 Geminin 蛋白表达进行观察,全部病例同时进行 CDK4 和 Geminin 染色。结果显示两者在胶质瘤中的表达有相关性 ($\chi^2=25.242,P<0.05$),且两者呈正相关($r_s=0.712,P<0.05$)。CDK4 和 Geminin 表达与胶质瘤恶性程度呈正相关,与患者的术后生存时间呈负相关,CDK4 和 Geminin 在细胞周期中发挥协同作用,调节细胞增殖,共同促进肿瘤的侵袭性生物学行为。联合检测这两个标记物有助于胶质瘤的诊断及预后评估,两者可作为肿瘤诊断的标志物及胶质瘤治疗的新靶点。

[参考文献]

[1] Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, et al. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005–2009[J]. Neuro Oncol, 2012, 14(Suppl 5):41–49

[2] Parker NR, Khong P, Parkinson JF, et al. Molecular heterogeneity in glioblastoma: potential clinical implications [J]. Front Oncol, 2015, 5(1):55

[3] Stupp R, Hegi ME, Mason WP, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial[J]. Lancet Oncol, 2009, 10 (5):459–466

[4] Shapiro GI. Cyclin-dependent kinase pathways as targets

for cancer treatment [J]. J Clin Oncol, 2006, 24(11): 1770–1783

[5] Thoms HC, Dunlop MG, Stark LA. p38-mediated inactivation of cyclin D1/cyclin-dependent kinase 4 stimulates nucleolar translocation of RelA and apoptosis in colorectal cancer cells[J]. Cancer Res, 2007, 67(4):1660–1669

[6] Nonomura Y, Nagasaka K, Hagiya HA, et al. Direct modulation of rheumatoid inflammatory mediator expression in retinoblastoma protein-dependent and -independent pathways by cyclin-dependent kinase 4/6 [J]. Arthritis Rheum, 2006, 54(7):2074–2083

[7] 曹友红, 马 平, 王福根, 等. CDK 在胃癌中的表达及临床意义[J]. 现代消化及介入诊疗, 2014, 19(5):281–284

[8] Cabrera AR, Cuneo KC, Desjardins A, et al. Concurrent stereotactic radiosurgery and bevacizumab in recurrent malignant gliomas: a prospective trial[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2013, 86(5):873–879

[9] Baker SJ, Reddy EP. CDK4: A key player in the cell cycle, development, and cancer[J]. Genes Cancer, 2012, 3(11/12):658–669

[10] Barry KA, Schultz KM, Payne CJ. Geminin is required for mitotic proliferation of spermatogonia [J]. Dev Biol, 2012, 371(1):35–46

[11] Iliou MS, Kotantaki P, Karamitros DA, et al. Reduced geminin levels promote cellular senescence [J]. Mech Ageing Dev, 2013, 134(1/2):10–23

[12] De Renty C, Kaneko KJ, Depamphilis ML. The dual roles of geminin during trophoblast proliferation and differentiation[J]. Dev Biol, 2014, 387(1):49–63

[13] Andrade BD, León JE, Carlos R, et al. Expression of minichromosome maintenance 2, Ki-67, and geminin in oral nevi and melanoma[J]. Ann Diagn Pathol, 2013, 17(1): 32–36

[14] Tamura T, Shomori K, Haruki T, et al. Minichromosome maintenance-7 and geminin are reliable prognostic markers in patients with oral squamous cell carcinoma: immunohistochemical study[J]. Oral Pathol Med, 2010, 39(4): 328–334.

[15] Montanari M, Boninsegna A, Faraglia B, et al. Increased expression of geminin stimulates the growth of mammary epithelial cells and is a frequent event in human tumors[J]. J Cell Physiol, 2005, 202(1):215–222

[收稿日期] 2016-08-29