

• 论 著 •

CDKN3 在口腔鳞状细胞癌中的预后价值及免疫细胞浸润分析^{*}朱 慧, 陆欢平, 李天佑, 陈 婧[△]

上海交通大学医学院附属第九人民医院检验科, 上海 200011

摘要:目的 分析细胞周期蛋白依赖性激活因子 3(CDKN3)对口腔鳞状细胞癌(OSCC)预后的预测价值及其与免疫细胞浸润的关系,探索 CDKN3 在 OSCC 发生发展中发挥的生物学功能。方法 从癌症基因组图谱和基因表达综合数据库中获取 OSCC 相关 RNAseq 数据,通过 R 语言和统计学方法整合分析 CDKN3 的表达水平、预后价值及与临床病理特征、免疫细胞浸润的关系。通过基因富集分析 CDKN3 在 OSCC 中的生物学作用。结果 与正常组织比较,CDKN3 在 OSCC 肿瘤组织中高表达($P < 0.01$),受试者工作特征曲线的曲线下面积为 0.955。CDKN3 高表达的 OSCC 患者预后差($P = 0.024$),CDKN3 的表达与病理分期($P < 0.05$)和组织学分级($P < 0.001$)存在相关性。免疫细胞浸润分析发现 CDKN3 的高、低表达组间免疫细胞浸润水平比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。功能富集分析结果显示,CDKN3 与细胞周期密切相关。结论 CDKN3 可能是 OSCC 潜在的致癌风险因子,与患者临床病理特征、预后及免疫细胞浸润有关,可能是 OSCC 的诊断生物标志物和潜在治疗靶点。

关键词:口腔鳞状细胞癌; 细胞周期蛋白依赖性激活因子 3; 免疫浸润

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2024.11.005

文章编号:1673-4130(2024)11-1302-06

中图法分类号:R739.85

文献标志码:A

**Prognostic value of CDKN3 and analysis of immune cell infiltration
in oral squamous cell carcinoma^{*}**

ZHU Hui, LU Huanping, LI Tianyou, CHEN Jing[△]

Department of Clinical Laboratory, Shanghai Ninth People's Hospital Affiliated to
Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China

Abstract: Objective To analyze the predictive value of cyclin-dependent activator 3 (CDKN3) in the prognosis of oral squamous cell carcinoma (OSCC) and its relationship with immune cell infiltration, and to explore the biological function of CDKN3 in the occurrence and development of OSCC. **Methods** RNAseq data related to OSCC were obtained from the Cancer Genome Atlas and Gene Expression Omnibus database. The expression level of CDKN3, prognostic value, clinicopathological features and immune cell infiltration were analyzed by R language and statistical methods. Gene enrichment analysis was used to analyze the biological role of CDKN3 in OSCC. **Results** Compared with normal tissues, CDKN3 was highly expressed in OSCC tumor tissues ($P < 0.01$), and the area under curve for the receiver operating characteristic curve was 0.955. The patients with high expression of CDKN3 had a poor prognosis ($P = 0.024$). The expression of CDKN3 was correlated with pathological stage ($P < 0.05$) and histological grade ($P < 0.001$). There was a significant difference in the level of immune cell infiltration between the CDKN3 high and low expression groups ($P < 0.05$). Functional enrichment analysis showed that CDKN3 was closely related to cell cycle. **Conclusion** CDKN3 may be a potential carcinogenic risk factor of OSCC, which is related to the clinicopathological characteristics, prognosis and immune cell infiltration of patients. CDKN3 may be a diagnostic biomarker and a potential therapeutic target for OSCC.

Key words:oral squamous cell carcinoma; cyclin-dependent activator 3; immune infiltration

头颈肿瘤是全球第六大常见癌症,口腔鳞状细胞癌(OSCC)是口腔黏膜鳞状上皮细胞异常增生所致的

恶性肿瘤,占口腔颌面肿瘤的 90%以上,是头颈部肿瘤中最常见的肿瘤类型,早期即可发生转移,且预后

* 基金项目:上海市卫生健康委员会课题计划(20234Y0131)。

作者简介:朱慧,女,技师,主要从事肿瘤发生机制及生物信息学研究。△ 通信作者, E-mail:chenjingyes0909@163.com。

网络首发 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.r.20240523.2102.006.html>(2024-05-27)

较差。目前治疗手段主要包括手术、放疗及化疗,然而治疗效果并不理想,患者的 5 年生存率在 40%~50%,早期确诊率也低于 40%^[1-3]。有研究发现,提高早期确诊率能够使 OSCC 患者的 5 年生存率提升至 85%^[4]。因此,近年来研究人员一直致力于探索 OSCC 潜在的治疗新靶点,以期提高患者的早期确诊率和生存率。

细胞周期蛋白依赖性激活因子 3(CDKN3)是一种细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂,其编码的蛋白属于双特异性蛋白磷酸酶家族,其能够结合细胞周期蛋白依赖性激酶 CDK1/2 使其去磷酸化失活。大量研究表明,CDKN3 的异常表达与胰腺癌^[5]、膀胱癌^[6]、食管癌^[7]等多种肿瘤密切相关。目前 CDKN3 在 OSCC 中的表达和生物学功能尚不清楚,因此,本研究拟通过生物信息学方法,分析 OSCC 中 CDKN3 的表达水平、预后价值及其与免疫细胞浸润的相关性,以期为 OSCC 寻找有效的诊断和预后标志物,同时为阐明 OSCC 发病机制和开发更有效的治疗策略提供新的线索。

1 资料与方法

1.1 数据收集 癌症基因组图谱(TCGA)数据库(<https://cancergenome.nih.gov/>)获取 OSCC 相关 TPM 格式的 RNAseq 数据(共 362 例,包含 32 例患者癌旁组织和 330 例患者肿瘤组织)。从基因表达综合(GEO)数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/>)获取 GSE30784 数据集(其中 167 例患者肿瘤组织,45 例患者正常组织)和 GSE74530 数据集(癌旁组织和肿瘤组织各 6 例)。

1.2 受试者工作特征(ROC)曲线分析 使用 R 语言 pROC 包进行 ROC 曲线分析,ggplot2 包用于 ROC 曲线结果可视化。曲线下面积(AUC)在 0.5~<0.7 时有较低准确性,AUC 在 0.7~0.9 时有一定准确性,AUC>0.9 时有较高准确性。

1.3 生存分析 根据 CDKN3 基因的表达水平,将 OSCC 患者分为 CDKN3 高表达组和低表达组。通过

生存曲线比较分析两组患者生存率的差异。使用 R 语言 survival 包进行生存分析,分析结果使用 survminer 包和 ggplot2 包可视化。

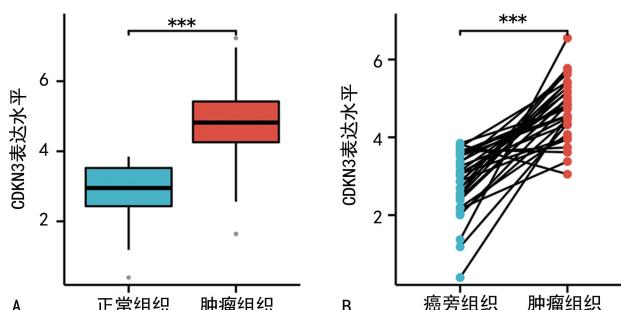
1.4 相关性基因功能富集分析 使用 Spearman 方法进行相关性分析。使用 R 语言 Cluster Profiler (4.4.4) 包对 CDKN3 相关性基因进行基因本体(GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,分析结果用 ggplot2(3.3.6) 包进行可视化。

1.5 免疫浸润分析 使用 R 语言 GSVA 包内置算法 ssGSEA,利用文献[8]提供的 24 种免疫细胞的标志物分析 OSCC 免疫细胞浸润情况。并使用 estimate 算法评估 OSCC 组织中免疫细胞的分数。通过 stats 包及 car 包分析 CDKN3 高低表达组间免疫细胞浸润差异性,分析结果采用 ggplot2(3.3.6) 包进行可视化。

1.6 统计学处理 使用 R 软件进行数据分析,采用 Shapiro-Wilk normality test 进行正态性检验分析,采用 Mann-Whitney U 检验和 t 检验分别对非配对样本和配对样本 CDKN3 表达水平进行分析。通过 χ^2 检验分析 CDKN3 的表达与临床病理特征的相关性。采用单因素和多因素 Cox 回归模型分析 CDKN3 和临床病理参数对 OSCC 患者总生存期的影响。采用 Kaplan-Meier 方法比较不同组间生存率的差异。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CDKN3 在 OSCC 中的表达 对 TCGA 数据库来源的 OSCC 数据分析发现,CDKN3 在肿瘤组织中的表达高于正常组织($P<0.001$);与配对癌旁组织比较,其在肿瘤组织中也明显高表达($P<0.001$)。同时,对 GEO 数据库中 GSE30784 和 GSE74530 数据集分别进行分析,结果与上述一致,CDKN3 在肿瘤组织中的表达高于正常组织($P<0.05$)。ROC 曲线分析结果显示,AUC 为 0.955,提示 CDKN3 对 OSCC 具有良好的诊断效力。见图 1、2。

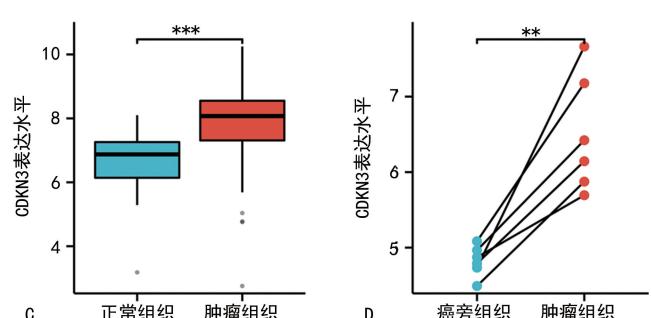


注: A 为 TCGA 数据库中 CDKN3 在 OSCC 非配对样本中的表达分析; B 为 TCGA 数据库中 CDKN3 在 OSCC 配对样本中的表达分析; C 为 GSE30784 数据集中 CDKN3 在 OSCC 非配对样本中的表达分析; D 为 GSE74530 数据集中 CDKN3 在 OSCC 配对样本中的表达分析; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图 1 CDKN3 的表达分析

2.2 CDKN3 表达水平与 OSCC 临床病理特征的关

系 本研究发现 CDKN3 表达水平与 OSCC 患者病



理分期和组织学分级有关,并且病理分期Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ期($P<0.05$),组织学分级G2($P<0.001$)及G3、G4($P<0.001$)患者的CDKN3表达水平较高,见图3。

2.3 CDKN3表达水平与OSCC患者预后的关系 生存分析结果显示,CDKN3高表达的OSCC患者总生存期较差($P=0.024$)。此外,结果还发现在Ⅲ、Ⅳ期($P=0.027$)、无淋巴管侵袭($P=0.003$)和淋巴结颈部清扫($P=0.007$)亚组中高表达CDKN3的OSCC患者均表现出较差的总生存期。单因素Cox回归分析显示,CDKN3表达($P=0.025$)、病理T分期($P<0.001$)、淋巴管侵袭($P=0.012$)是OSCC患者生存的预后因素;多因素Cox回归分析显示,CDKN3表达是OSCC的独立预后因素($P=0.029$)。见表1、图4。

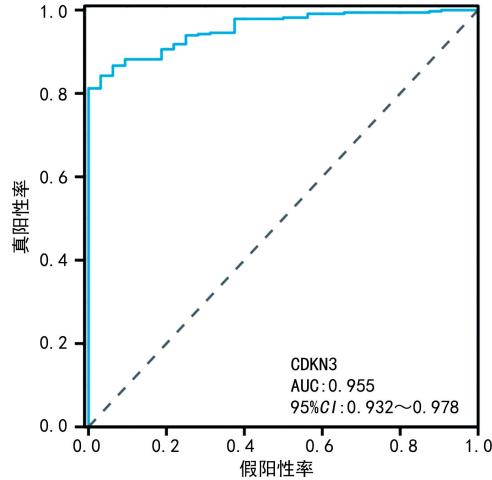
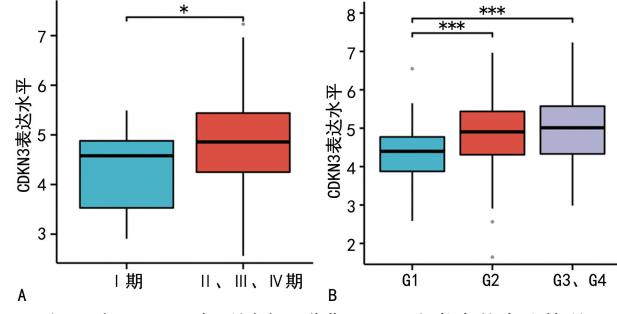


图2 CDKN3的ROC曲线分析

2.4 CDKN3表达水平与OSCC免疫细胞浸润的相关性 本研究通过estimate算法评估了OSCC样本肿瘤纯度,结果表明,免疫评分($P<0.05$)、基质评分($P<0.01$)和肿瘤纯度评分($P<0.01$)在CDKN3

高、低表达组间比较,差异有统计学意义,提示CDKN3影响OSCC免疫和基质细胞浸润,见图5。

使用ssGSEA算法评估CDKN3的表达与24种免疫细胞浸润的相关性,结果显示CDKN3的表达与Th2细胞($r=0.418, P<0.001$)、辅助性T细胞($r=0.189, P<0.001$)呈正相关,与肥大细胞($r=-0.382, P<0.001$)、Th17细胞($r=-0.270, P<0.001$)呈负相关。对CDKN3高、低表达组的免疫细胞富集程度分析发现,CDKN3高表达组辅助性T细胞($P<0.01$)和Th2细胞($P<0.001$)富集显著升高,而肥大细胞($P<0.001$)、Th17细胞($P<0.001$)富集显著降低。见图6。



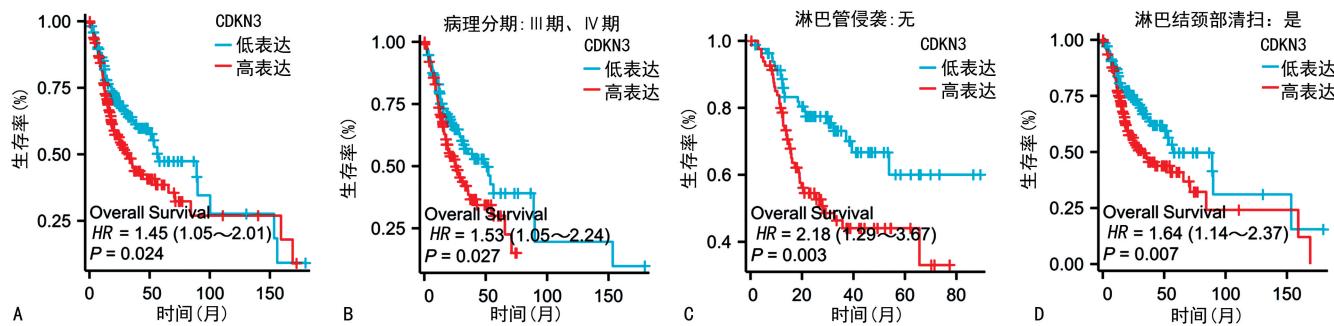
注:A为CDKN3在不同病理分期OSCC患者中的表达情况;B为CDKN3在不同组织学分级OSCC患者中的表达情况;* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图3 CDKN3在不同临床病理特征OSCC患者中的表达

2.5 CDKN3相关基因功能富集分析 通过相关性分析,筛选到227个CDKN3相关性基因($|r|>0.6, P<0.05$)。图7A为排前10位的CDKN3相关基因的共表达热图。通过GO富集分析和KEGG通路富集分析预测了CDKN3潜在的生物学功能与通路,KEGG通路富集分析显示,这些基因参与细胞周期相关通路。GO富集分析显示,CDKN3参与细胞有丝分裂、细胞周期等生物学过程,见图7B。

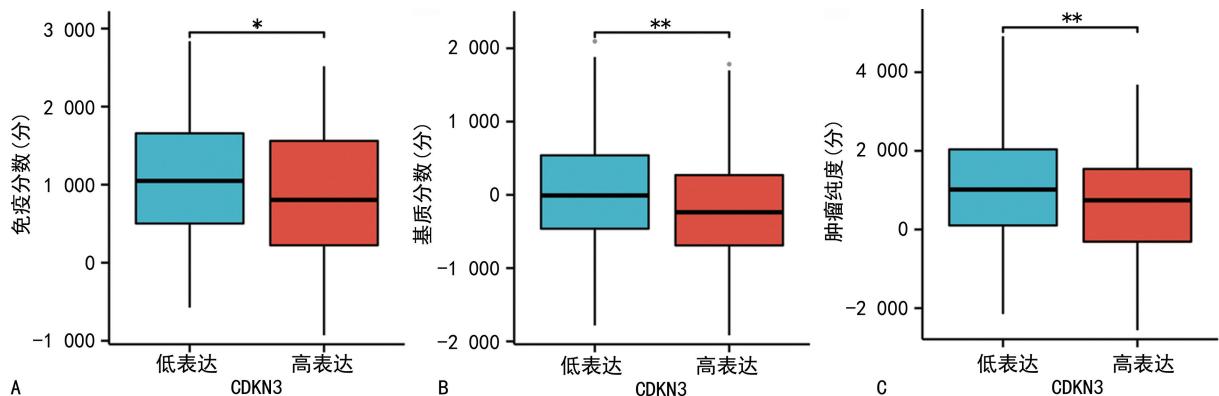
表1 CDKN3表达水平和临床病理特征与OSCC患者总生存期的Cox回归分析

特征	n	单因素分析		多因素分析	
		HR(95%CI)	P	HR(95%CI)	P
病理T分期	303				
T1、T2	128	参考组		参考组	
T3、T4	175	2.399(1.642~3.506)	<0.001	3.261(1.763~6.034)	<0.001
病理N分期	274				
N0	117	参考组		参考组	
N1	50	0.747(0.400~1.395)	0.360	0.737(0.341~1.593)	0.438
N2、N3	107	2.224(1.502~3.293)	<0.001	1.836(1.073~3.142)	0.027
淋巴管侵袭	238				
无	164	参考组		参考组	
有	74	1.672(1.120~2.498)	0.012	1.410(0.870~2.285)	0.163
淋巴结颈部清扫	326				
无	45	参考组		参考组	
有	281	0.676(0.446~1.025)	0.065	0.098(0.036~0.271)	<0.001
CDKN3	328				
低表达	164	参考组		参考组	
高表达	164	1.451(1.048~2.008)	0.025	1.641(1.051~2.562)	0.029



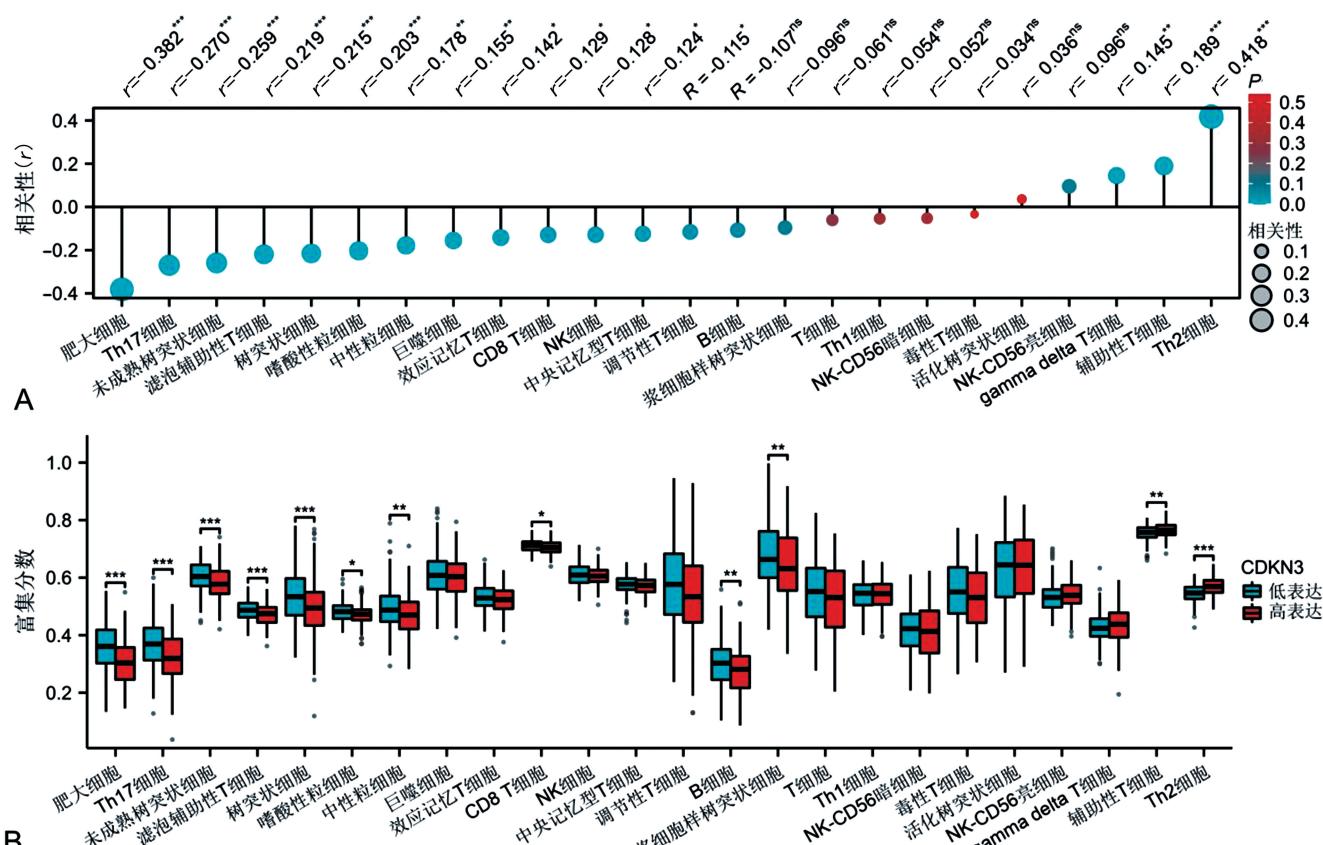
注: A~D 分别为 CDKN3 表达水平和临床病理特征与 OSCC 患者总生存期的生存分析。

图 4 CDKN3 表达与 OSCC 预后分析



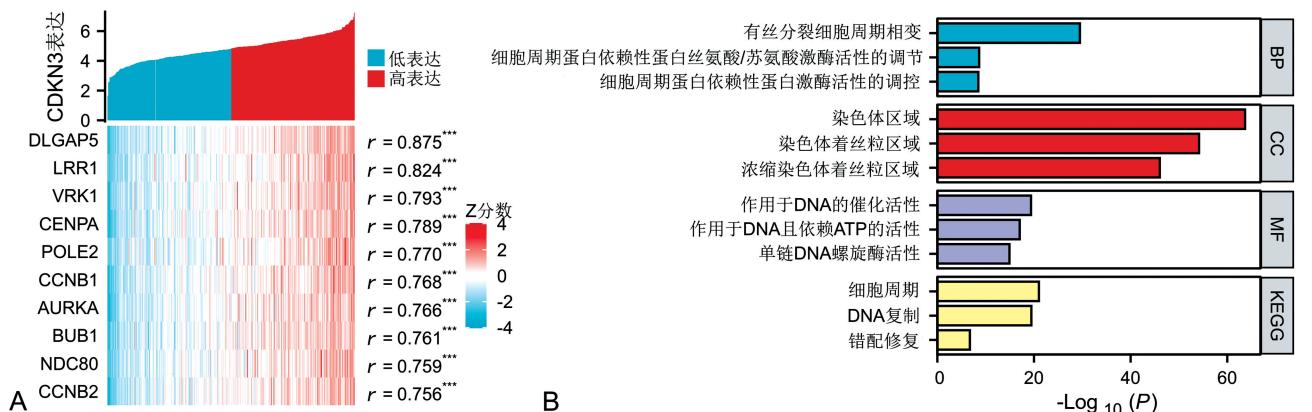
注: A 为 CDKN3 表达与 OSCC 样本的免疫评分; B 为 CDKN3 表达与 OSCC 样本的基质评分; C 为 CDKN3 表达与 OSCC 样本肿瘤纯度的评分; * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001。

图 5 estimate 评分与 CDKN3 表达的相关性分析



注: A 为 CDKN3 表达水平与免疫细胞的相关性分析; B 为 CDKN3 高、低表达组间不同免疫细胞富集水平; * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001。

图 6 CDKN3 表达与免疫细胞相关性分析



注: A 为排名前 10 位 CDKN3 相关性基因共表达热图; B 为 CDKN3 相关性基因 KEGG 通路和 GO 富集分析, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; BP 为生物学过程; CC 为细胞成分; MF 为分子功能。

图 7 CDKN3 相关性基因分析

3 讨 论

OSCC 是一种常见的发病率高、预后差、发病机制复杂的口腔恶性肿瘤, 好发于舌、牙龈、颤部、颊部及口底等部位, 因其解剖结构特殊, OSCC 患者往往在确诊时多已呈中晚期甚至发生淋巴结转移, 导致其 5 年生存率低于 50%^[3], 目前临床最常用的治疗手段仍然是外科手术结合术后放化疗, 但极易复发。近年来, 靶向治疗逐渐应用于肿瘤的治疗^[9], 虽然针对表皮生长因子受体靶点的药物已用于治疗部分复发或常规治疗失败的 OSCC 患者, 但整体治疗效果欠佳, 仅有小部分患者获益^[10]。因此探索新的潜在治疗靶点是目前亟须解决的临床问题。

CDKN3 是一种 CDK1/2 相关的双特异性磷酸酶, 早期研究发现 CDKN3 通过结合细胞周期蛋白依赖性激酶 CDK1 和 CDK2, 使其激活的环苏氨酸残基去磷酸化, 从而降低了 CDKs 的底物和 ATP 的结合活性^[11], 故当时研究者提出 CDKN3 是 CDK1 和 CDK2 的负调控因子。由于 CDK 驱动的细胞周期对癌细胞的增殖是必不可少的, 而 CDKN3 抑制 CDK 的活性, 因此 CDKN3 最早被认为是肿瘤抑制因子, 但矛盾的是, 在食管癌中, CDKN3 通过 RAD51 促进肿瘤的进展并赋予顺铂耐药性^[7]。LI 等^[12]发现, 通过抑制 CDKN3 的转录活性可以抑制肾细胞癌的疾病进展^[12]。据此可见, 在不同的肿瘤组织中 CDKN3 的表达及其发挥的作用不同, 甚至可能截然相反, 这也说明了 CDKN3 在细胞生命活动中的重要性和复杂性。然而 CDKN3 在 OSCC 中的表达和生物学功能尚不清楚。本研究通过对 TCGA 和 GEO 数据库来源的 OSCC 表达数据分析, 发现 OSCC 肿瘤组织中 CDKN3 的表达增加, CDKN3 的表达与 OSCC 的临床病理特征有关, 包括病理分期、组织学分级; ROC 曲线分析表明, CDKN3 是 OSCC 相对准确的诊断指标。生存分析发现, CDKN3 的表达是 OSCC 的独立预后

因素, CDKN3 高表达与 OSCC 患者不良预后密切相关。以上结果提示 CDKN3 可作为 OSCC 发生发展的潜在生物标志物。

CDKN3 是细胞周期有丝分裂期的重要调节器^[13], 与已有研究报道一致, 本研究对 CDKN3 及其相关性基因进行了 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析, 结果发现 CDKN3 及其相关性基因主要富集在细胞周期信号通路上, 该发现验证了 CDKN3 的功能。由于细胞周期失调是肿瘤细胞异常增殖的关键原因, 该研究结果提示, CDKN3 可能通过干扰 OSCC 细胞分裂影响疾病的发生与进展。

研究表明, 口腔肿瘤的发生发展与肿瘤微环境密不可分, 其中免疫细胞在肿瘤微环境中扮演重要角色, 肿瘤组织中免疫细胞浸润会影响肿瘤的发展和患者预后。肿瘤浸润性免疫细胞与肿瘤的发生和血管形成及肿瘤细胞的生长和转移具有相关性, 同时肿瘤细胞可调节免疫细胞的浸润丰度和分化程度^[14-16]。为了评估 CDKN3 作为 OSCC 免疫干预因素的可能性, 本研究通过 estimate 算法分析发现, CDKN3 影响 OSCC 免疫和基质细胞浸润水平。ssGSEA 算法分析发现, CDKN3 的表达与肥大细胞呈负相关, 与 Th2 细胞呈正相关。已知, 肥大细胞在许多实体肿瘤如 OSCC 中异常浸润^[17], 并且影响肿瘤患者预后^[14, 18]。此外, 有研究指出 Th2 细胞在肿瘤发生发展及侵袭中起着重要的作用。例如, BOIERI 等^[15]证明 Th2 细胞的高度浸润可引起乳腺肿瘤细胞表观遗传学重编程, 并抑制乳腺肿瘤的发生。局部 Th2 炎症的启动可以抑制肿瘤免疫微环境, 促进肿瘤进展^[16]。这些研究提示, CDKN3 可能通过改变 OSCC 的免疫微环境中肥大细胞和 Th2 细胞的浸润影响肿瘤的进展和预后, 为 CDKN3 成为 OSCC 免疫干预因素提供了理论依据。目前国内外关于 CDKN3 在 OSCC 中表达情况的相关研究极少。还需要大量的临床标本结合临床资料

随访来明确 CDKN3 表达与 OSCC 患者各种临床病理特征的相关性及 CDKN3 对 OSCC 肿瘤微环境中免疫细胞潜在的调控机制。

综上所述,本研究发现 CDKN3 在 OSCC 中高表达,并且 CDKN3 表达水平与 OSCC 患者预后、免疫细胞浸润有关,表明 CDKN3 在 OSCC 发生发展中发挥重要的作用,可能是 OSCC 诊断和预后评估的潜在生物标志物,为后续的机制研究和临床治疗提供了新的思路。

参考文献

- [1] 邱乐宏, 邓伟, 王涛. lncRNA HOTAIR 通过 miR-126/ADAMTS-4 轴抑制口腔鳞状细胞癌细胞增殖与侵袭的机制研究[J]. 国际检验医学杂志, 2022, 43(9): 1025-1032.
- [2] SIEVILÄINEN M, ALMAHMOUDI R, AL-SAMADI A, et al. The prognostic value of immune checkpoints in oral squamous cell carcinoma[J]. Oral Dis, 2019, 25(6): 1435-1445.
- [3] WANG L, CHEN Y, YAN Y, et al. miR-146a overexpression in oral squamous cell carcinoma potentiates cancer cell migration and invasion possibly via targeting HTT [J]. Front Oncol, 2020, 10: 585976.
- [4] TAKAHASHI H, YANAMOTO S, YAMADA S, et al. Effects of postoperative chemotherapy and radiotherapy on patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity and multiple regional lymph node metastases[J]. Int J Oral Maxillofac Surg, 2014, 43(6): 680-685.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] WANG J, CHE W, WANG W, et al. CDKN3 promotes tumor progression and confers cisplatin resistance via RAD51 in esophageal cancer [J]. Cancer Manag Res, 2019, 11: 3253-3264.
- [8] BINDEA G, MLECNIK B, TOSOLINI M, et al. Spatio-temporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer[J]. Immunity, 2013, 39(4): 782-795.
- [9] LI H, ZHANG Y, XU M, et al. Current trends of targeted therapy for oral squamous cell carcinoma[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2022, 148(9): 2169-2186.
- [10] CHANG J W, KANG S U, SHIN Y S, et al. Combination of NTP with cetuximab inhibited invasion/migration of cetuximab-resistant OSCC cells: involvement of NF-κB signaling[J]. Sci Rep, 2015, 5: 18208.
- [11] BARRETINA J, CAPONIGRO G, STRANSKY N, et al. The cancer cell line encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity[J]. Nature, 2012, 483(7391): 603-607.
- [12] LI A, CAO C, GAN Y, et al. ZNF677 suppresses renal cell carcinoma progression through N6-methyladenosine and transcriptional repression of CDKN3[J]. Clin Transl Med, 2022, 12(6): e906.
- [13] NALEPA G, BARNHOLTZ-SLOAN J, ENZOR R, et al. The tumor suppressor CDKN3 controls mitosis[J]. J Cell Biol, 2013, 201(7): 997-1012.
- [14] LICHTERMAN J N, REDDY S M. Mast cells: a new frontier for cancer immunotherapy[J]. Cells, 2021, 10(6): 1270.
- [15] BOIERI M, MALISHKEVICH A, GUENNOUN R, et al. CD4⁺ T helper 2 cells suppress breast cancer by inducing terminal differentiation[J]. J Exp Med, 2022, 219(7): e20201963.
- [16] FASSLER M, DIEM S, MANGANA J, et al. Antibodies as biomarker candidates for response and survival to checkpoint inhibitors in melanoma patients[J]. J Immunother Cancer, 2019, 7(1): 50.
- [17] GUDISEVA S, SANTOSH A, CHITTURI R, et al. The role of mast cells in oral squamous cell carcinoma[J]. Contemp Oncol (Pozn), 2017, 21(1): 21-29.
- [18] FAKHRJOU A, NIROUMAND-OSCOEI S M, SOMI M H, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating mast cells in outcome of patients with esophagus squamous cell carcinoma[J]. J Gastrointest Cancer, 2014, 45(1): 48-53.

(收稿日期:2023-11-02 修回日期:2024-02-09)