

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.12.008

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.12.008

CDK4 与 Ki-67 在非小细胞肺癌中的表达及其意义

尹信¹, 夏靖华², 王磊²

(1. 延安大学咸阳医院放疗科, 陕西 咸阳 712000; 2. 空军军医大学第二附属医院胸腔外科, 西安 710038)

[摘要] 目的: 探讨CDK4和Ki-67在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)组织中的表达及其意义。方法: 收集胸腔外科手术切除的NSCLC组织及相应正常肺组织标本271例, 应用免疫组织化学法检测CDK4和Ki-67在NSCLC中的表达并进行统计学分析。结果: CDK4和Ki-67主要表达于细胞核中, 在NSCLC、腺癌、鳞癌组织中的总阳性表达率高于相应正常组织(均 $P < 0.001$); 在腺癌、鳞癌组间CDK4与Ki-67表达差异均无统计学意义; 在分化程度、TNM分期及淋巴结是否转移组间, CDK4与Ki-67表达差异显著(均 $P < 0.01$); 且在总NSCLC、腺癌、鳞癌中CDK4与Ki-67表达呈正相关, 相关系数 r 分别是0.520, 0.544, 0.501, 均 $P < 0.001$; CDK4和Ki-67表达强度为-/+的NSCLC患者较表达强度为++/+++的NSCLC患者中位生存时间长, 差异有统计学意义(分别 $P = 0.0019$, $P = 0.0227$)。Cox单因素回归分析显示分化程度、TNM分期、淋巴结是否转移及CDK4与Ki-67的表达是影响NSCLC临床预后的因素(均 $P < 0.01$); 而Cox多因素回归分析显示TNM分期和CDK4表达是影响NSCLC预后的风险因素(分别 $P = 0.001$, $P = 0.033$)。结论: CDK4的过表达可能与NSCLC的发生、发展和转移具有一定的关系, 联合检测CDK4与Ki-67的表达可能有助于NSCLC的早期诊断和预后判断。

[关键词] 非小细胞肺癌; CDK4; Ki-67

Expressions and clinical significance of CDK4 and Ki-67 in non-small cell lung cancer patients

YIN Xin¹, XIA Jinghua², WANG Lei²

(1. Department of Radiation Oncology, Xianyang Hospital, Yan'an University, Xianyang Shaanxi 712000; 2. Department of Thoracic Surgery, Second Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an 710038, China)

Abstract **Objective:** To explore the expressions and significances of CDK4 and Ki-67 in non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods:** We collected 271 cases of surgically resected NSCLC tissues and corresponding normal tissue, which admitted to Department of Thoracic Surgery. The expressions of CDK4 and Ki-67 were detected by immunohistochemistry. The correlation between CDK4 and Ki-67 expressions as well as the clinical significances were analyzed by statistical method. **Results:** Positive staining of CDK4 and Ki-67 were mainly in nucleus. The positive expressions of CDK4 and Ki-67 in NSCLC, adenocarcinoma and squamous cell carcinoma were higher than those in the corresponding normal tissue (all $P < 0.001$). The expressions of CDK4 and Ki-67 were no

收稿日期 (Date of reception): 2018-08-24

通信作者 (Corresponding author): 夏靖华, Email: ixiaozhao@163.com; 王磊, Email: tuodi1986@126.com

significant differences respectively between in the groups of adenocarcinoma and squamous cell lung cancer (all $P>0.05$), but there were significant differences in the groups of grades, clinical stages and lymph node metastasis or not of NSCLC (all $P<0.01$). The CDK4 expression showed positive correlation with Ki-67 expression in NSCLC, adenocarcinoma and squamous cell carcinoma respectively ($r=0.520, 0.544, 0.501$, all $P<0.001$). The patients with ++/+++ expression CDK4 and Ki-67 have shorter survival time compared with those with -/+ expression, $P=0.0019$, $P=0.0227$ respectively. In univariate analysis, factors including CDK4 and Ki-67 expression, grade of differentiation, TNM stage and lymph node metastasis showed a significantly higher hazard ration for a poor prognosis (all $P<0.01$). Moreover, in multivariate analysis, the factors including TNM stage and CDK4 expression were independent prognostic factor ($P=0.001, P=0.033$). **Conclusion:** The higher expression of CDK4 may be correlate with the occurrence, development, and metastasis of NSCLC. Combined detection of CDK4 and Ki-67 proteins expressions may be valuable for early diagnosis and prognosis of NSCLC.

Keywords non-small cell lung cancer; CDK4; Ki-67

肺癌是全球致死率最高的恶性肿瘤^[1], 非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)占所有肺癌的75%~80%, 其5年生存率低于15%^[2]。CDK4作为一种细胞周期正向调节因子已被证实是一种癌基因, 在多种常见肿瘤中出现基因扩增和过表达^[3]。Ki-67是与细胞增殖相关的核蛋白, 与肿瘤增殖、侵袭性密切相关^[4]。NSCLC中CDK4和Ki-67的表达及临床意义的研究相对较少, 本文通过免疫组织化学法检测NSCLC组织及相应正常组织中CDK4和Ki-67蛋白的表达, 并结合临床病理学特征进行分析, 旨在探讨二者在NSCLC中的表达及临床意义。

1 对象与方法

1.1 对象

收集2006年3月至2011年12月空军军医大学第二附属医院胸腔外科手术切除的NSCLC组织及相应正常肺组织标本271例。患者术前均未接受化、放疗及其他抗癌治疗。其中男204例, 女67例; 年龄36~78(中位61)岁; 腺癌115例, 鳞癌156例; 高分化15例, 中分化185例, 低分化71例; I期69例, II期101例, III期98例, IV期3例; 淋巴结转移150例, 淋巴结未转移121例。本研究通过空军军医大学第二附属医院医学伦理委员会批准, 患者或其家属均已签署知情同意书。

1.2 免疫组织化学法及结果判断

EnVision二步法免疫组织化学试剂盒购自西安基因公司的DAKO产品。CDK4蛋白抗体为GeneTex商品化兔源性抗体, Ki-67为Thermo商品化兔源性

抗体。

组织经中性甲醛溶液固定, 脱水、透明、包埋后, 切成4 μm 厚切片。二甲苯脱蜡, 梯度乙醇水化; 3 mol/L尿素消化; 柠檬酸缓冲液微波修复, 冷却至室温; 3% H_2O_2 溶液阻断内源性过氧化物酶; 10%山羊血清封闭; 加一抗4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 37 $^{\circ}\text{C}$ 复温; 加二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温反应(除血清封闭外, 其余各步均需需用PBS漂洗3 min \times 3); DAB显色。苏木精复染, 1%盐酸乙醇分化, 水洗返蓝, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 光镜下观察。用已知阳性表达的组织作为阳性对照, 以PBS代替一抗作为空白对照。

切片均经2位有经验的病理医师采用双盲法阅片, 用阳性细胞染色强度和阳性细胞在癌细胞中的比例来判定染色结果^[5]。染色强度评分: 无显色为0分, 浅黄色或黄色为1分, 棕黄色为2分, 棕褐色为3分。以染色细胞的阳性比例评分 $<5\%$ 为0分, 6%~25%为1分, 26%~50%为2分, 51%~75%为3分, $>75\%$ 为4分。上述2项积分相乘, 积分0分为阴性(-), 1~4分为弱阳性(+), 5~8分为阳性(++), 9~12分为强阳性(+++)。

1.3 统计学处理

采用SPSS 17.0统计软件进行数据分析: CDK4, Ki-67在NSCLC组织和正常组织中表达的差异性及在腺癌与鳞癌、淋巴结是否转移组间差异性用Mann-Whitney U 秩和检验; 在组织病理分级、临床TNM分期组间表达的差异性用Kruskal-Wallis H 检验; 两蛋白表达的相互关系用Spearman秩相关检验, 秩相关系数用 r 表示; 应用GraphPad Prism分析软件log-rank(Mantel-Cox)检验进行生存分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CDK4 与 Ki-67 在 NSCLC 组织中的定位及表达

CDK4与Ki-67在NSCLC中主要表达于细胞核中(图1);在NSCLC、腺癌、鳞癌组织中CDK4的阳性表达率分别为91.9%(249/271), 89.6%(103/115), 93.6%(146/156),而在相应正常组织中的阳性表达率分别为15.5%(42/271), 20.0%(23/115), 12.2%(19/156),癌组织中CDK4表达明显高于正常组织,差异均有统计学意义($P<0.001$);Ki-67在NSCLC、腺癌、鳞癌组织中的阳性表达率分别为95.6%(259/271), 96.5%(111/115), 94.9%(148/156),而在相应正常组织中的阳性表达率分别为4.8%(13/271), 5.2%(6/115), 4.5%(7/156),差异均有统计学意义($P<0.001$,表1)。

2.2 CDK4 和 Ki-67 在 NSCLC 临床病理分组中表达的差异性

在腺癌、鳞癌组间CDK4与Ki-67表达差异无统计学意义($P=0.431$, $P=0.460$);在NSCLC分化程度、临床TNM分期及淋巴结是否转移组间CDK4与Ki-67的表达差异性均有统计学意义(均

$P<0.01$,表2)。

2.3 CDK4 与 Ki-67 蛋白在 NSCLC 组织中表达的相关性

经Spearman秩相关检验,在总NSCLC、腺癌、鳞癌组织中CDK4和Ki-67蛋白表达秩相关系数 r 分别是0.520, 0.544, 0.501,均 $P<0.001$,即二者存在正相关(表3)。

2.4 CDK4 和 Ki-67 表达程度与 NSCLC 患者生存分析

144例CDK4表达强度为++/+++的NSCLC患者,中位生存时间为19个月,127例CDK4表达强度为-/++的NSCLC患者,中位生存时间为39个月,CDK4表达强度为-/++的NSCLC患者较表达强度为++/+++的NSCLC患者的生存时间明显延长,差异有统计学意义($P=0.0019$);95例Ki-67表达强度为-/++的NSCLC患者,中位生存时间为40个月,176例Ki-67表达强度为++/+++的NSCLC患者,中位生存时间为21.5个月,Ki-67表达强度为-/++的NSCLC患者较表达强度为-/++的NSCLC患者的生存时间明显延长,差异有统计学意义($P=0.0227$);242例CDK4与Ki-67同时为阳性的患者中位生存时间为24个月(图2)。

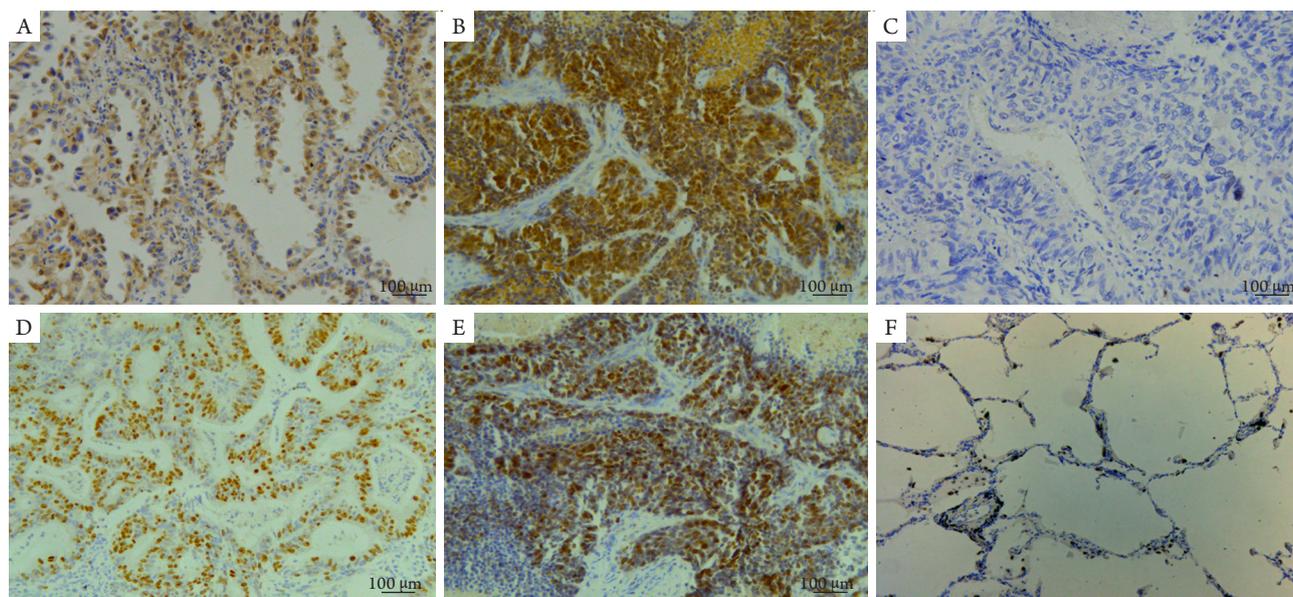


图1 CDK4和Ki-67在NSCLC中的表达

Figure 1 Expression of CDK4 and Ki-67 in NSCLC

(A)CDK4在腺癌中表达;(B)CDK4在鳞癌中表达;(C)空白对照;(D)Ki-67在腺癌中表达;(E)Ki-67在鳞癌中表达;(F)CDK4在正常组织中未表达(EnVision, F: $\times 100$,其余为 $\times 200$)。

(A) CDK4 expression in adenocarcinoma; (B) CDK4 expression in squamous caner; (C) Negative control; (D) Ki-67 expression in adenocarcinoma; (E) Ki-67 expression in squamous caner; (F) Blank (EnVision, F: $\times 100$; the others were $\times 200$).

表1 CDK4和Ki-67在肺癌组织和相应正常组织中表达的差异性

Table 1 Difference expressions of CDK4 and Ki-67 in lung cancer and corresponding normal tissue

组织来源	n	CDK4 表达				阳性率 /%	Z	P
		-	+	++	+++			
NSCLC vs 正常肺组织	271	22/229	105/41	130/1	14/0	91.9/15.5	-18.237	<0.001
腺癌 vs 正常肺组织	115	12/92	45/22	51/1	7/0	89.6/20.0	-11.082	<0.001
鳞癌 vs 正常肺组织	156	10/137	60/19	79/0	7/0	93.6/12.2	-14.488	<0.001

组织来源	Ki-67 表达				阳性率 /%	Z	P
	-	+	++	+++			
NSCLC vs 正常肺组织	12/258	83/13	159/0	17/0	95.6/4.8	-20.568	<0.001
腺癌 vs 正常肺组织	4/109	40/6	64/0	7/0	96.5/5.2	-13.422	<0.001
鳞癌 vs 正常肺组织	8/149	43/7	95/0	10/0	94.9/4.5	-15.563	<0.001

表2 CDK4和Ki-67在NSCLC不同分组中表达的差异性

Table 2 Difference expression of CDK4 and Ki-67 in every groups of NSCLC

临床病理特征	n	CDK4 表达				Ki-67 表达								
		-	+	++	+++	Z	P	-	+	++	+++	Z	P	
病理类型						-0.788	0.431						-0.739	0.460
腺癌	115	12	45	51	7			4	40	64	7			
鳞癌	156	10	60	79	7			8	43	95	10			
分化程度						33.936	<0.001						50.394	<0.001
高	15	4	11	0	0			2	13	0	0			
中	185	15	78	88	4			9	65	103	8			
低	71	3	16	42	10			1	5	56	9			
TNM分期						16.629	0.001						-24.337	<0.001
I	69	10	32	26	4			6	29	31	3			
II	101	8	44	43	6			6	36	52	7			
III	98	4	29	60	5			0	18	75	5			
IV	3	0	0	1	2			0	0	1	2			
淋巴结是否转移						-3.032	0.002						-4.053	<0.001
转移	150	7	53	79	11			5	32	100	13			
未转移	121	15	52	51	3			7	51	59	4			

2.5 Cox 比例风险回归模型分析影响 NSCLC 临床预后的因素

Cox 比例风险回归模型中分析了 NSCLC 的几个临床病理因素和 CDK4 与 Ki-67 的表达对 NSCLC 临床预后的影响。单因素回归分析显示：分化程度、TNM 分期、淋巴结是否转移及

CDK4 与 Ki-67 的表达是影响 NSCLC 临床预后的因素 (均 $P < 0.01$)；对以上影响 NSCLC 预后的因素进行多因素回归分析，结果显示 TNM 分期和 CDK4 表达是影响 NSCLC 预后的风险因素 (分别 $P = 0.001$, $P = 0.033$ ；表 4)。

表3 CDK4和Ki-67在NSCLC、腺癌、鳞癌中表达的相关性

Table 3 Correlation of CDK4 expression with Ki-67 expression in NSCLC, lung adenocarcinoma and squamous cell cancer

CDK4	Ki-67																	
	NSCLC						腺癌						鳞癌					
	-	+	++	+++	r	P	-	+	++	+++	r	P	-	+	++	+++	r	P
-	5	13	4	0	0.631	<0.001	3	6	3	0	0.615	<0.001	2	7	1	0	0.711	<0.001
+	7	59	39	0			1	27	17	0			6	32	22	0		
++	0	11	113	6			0	7	42	2			0	4	71	4		
+++	0	0	18	3			0	0	2	5			0	0	1	6		

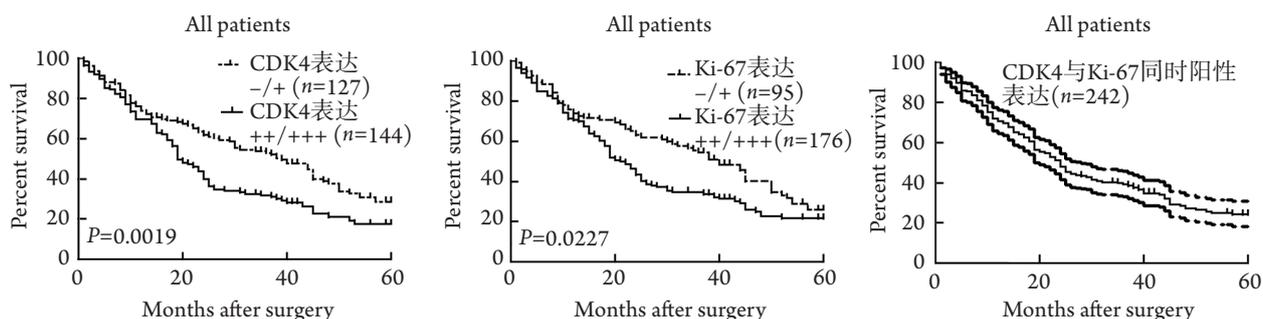


图2 CDK4及Ki-67的表达程度与NSCLC患者生存时间的相关性

Figure 2 Expression of CDK4 and Ki-67 relevance to NSCLC patients' survival time

表4 Cox比例风险回归模型分析NSCLC临床预后的因素

Table 4 Cox proportional hazards model analysis of variables affecting survival in NSCLC patients

变量	单因素分析		多因素分析	
	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P
性别(男/女)	0.922 (0.667-1.274)	0.622		
年龄(≤61岁/>61岁)	0.901 (0.681-1.192)	0.465		
组织学类型(腺癌/鳞癌)	0.994 (0.749-1.319)	0.965		
分化程度(高-中/低)	0.567 (0.416-0.771)	<0.001	0.744 (0.537-1.031)	0.076
TNM分期(I-II/III-IV)	0.424 (0.319-0.564)	<0.001	0.564 (0.397-0.802)	0.001
淋巴转移(是/否)	1.991 (1.485-2.669)	<0.001	1.399 (0.981-1.995)	0.064
Ki-67表达(--~/+++~+++)	0.662 (0.490-0.895)	0.007	1.150 (0.774-1.706)	0.489
CDK4表达(--~/+++~+++)	0.599 (0.449-0.799)	<0.001	0.674 (0.468-0.969)	0.033

3 讨论

NSCLC的发生发展涉及多种分子机制, 其中细胞周期紊乱是引发NSCLC发生的重要因素^[6]。CDK4是细胞周期G₁期的正调控因子^[7], 它与细胞周期素(cyclin D)结合, 形成CDK-cyclin D复合

物, 促进细胞周期从G₁期进入S期^[8]。CDK4在多种肿瘤中表达失调^[9], 其异常表达可促进肿瘤的发展^[10]。本研究结果显示: CDK4蛋白主要表达于细胞核内, 在NSCLC组织中的表达水平高于正常肺组织中的表达水平。在肺癌细胞系A549中抑制CDK4表达可引起细胞周期阻滞, 抑制肿瘤细胞增

殖^[11], 说明CDK4的高表达可能会促进NSCLC细胞的增殖, 提示CDK4过表达可能对NSCLC的发生、发展具有促进作用。CDK4的表达在腺癌、鳞癌组间无差异性, 说明CDK4表达与NSCLC病理类型不相关; 在分化程度、TNM分期及淋巴结是否转移组间差异有统计学意义, 即CDK4表达与上述NSCLC的临床病理特点相关, CDK4表达水平高, NSCLC分化程度低、TNM分期高、淋巴结转移, 提示CDK4的过表达可能会加速细胞增殖, 从而促进NSCLC病程进展, 使肿瘤恶性程度增高, 侵袭和转移能力增强。

Ki-67分布于细胞核内, 属于IgG家族, 是一种可能与细胞周期蛋白密切相关的核增殖标志基因, 能可靠而迅速反映恶性肿瘤的增殖, 通常作为肿瘤细胞增殖的标志物^[12-13]。研究^[14]表明: Ki-67表达水平与肿瘤恶性程度基本一致, 随着恶性程度的发展而增高, 与恶性肿瘤的发展、转移和预后高度相关。本研究结果显示: 在NSCLC组织中Ki-67主要表达于细胞核, 其在癌组织中的表达明显高于相应正常组织, 呈过表达状态; 在腺癌与鳞癌组间, Ki-67表达差异无统计学意义; 在分化程度、TNM分期及淋巴结是否转移组间, Ki-67表达差异有统计学意义, 即Ki-67表达高低与NSCLC的分化程度、TNM分期及淋巴转移有关。NSCLC分化程度低, TNM分期高, 淋巴结转移时, Ki-67表达程度高, 即Ki-67表达与NSCLC分化程度呈负相关, 与TNM分期呈正相关, 提示Ki-67的高表达与NSCLC细胞增殖活跃、侵袭性强、易发生转移、预后不良等特点相关。因此, Ki-67能客观反映NSCLC的增殖活性, 可作为评价NSCLC发生、发展的重要指标之一。本研究发现: CDK4和Ki-67在总NSCLC、腺癌和鳞癌组织中的表达进行相关性分析, 二者表达的秩相关系数 r 分别为0.520, 0.544, 0.501(均 $P < 0.001$), 即存在正相关性, 进一步说明CDK4过表达可能促进NSCLC细胞增殖, CDK4表达可作为评价NSCLC发生发展进程的指标。

生存分析结果显示: CDK4和Ki-67表达强度为-/+的NSCLC患者中位生存期较表达强度为++/+++的患者明显延长, 差异有统计学意义。提示CDK4过表达可能降低NSCLC肺癌患者的生存期, 很可能是NSCLC发生发展的风险因子。Cox比例风险回归分析显示CDK4表达是影响NSCLC预后的风险因子, 说明CDK4表达能促进NSCLC发生发展。

综上所述, CDK4在NSCLC中的过表达可促进NSCLC的发生发展, 降低NSCLC肺癌患者的生存期, 联合监测CDK4和Ki-67的表达, 对评价NSCLC的发生发展有一定的临床价值。

参考文献

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
2. Torre LA, Siegel RL, Jemal A. Lung cancer statistics[J]. Adv Exp Med Biol, 2016, 893: 1-19.
3. 陈衍, 麦春平, 姚开泰, 等. CDK4 mRNA 在鼻咽癌的表达及临床意义[J]. 广东药学院学报, 2013, 29(1): 89-92.
CHEN Yan, MAI Chunping, YAO Kaitai, et al. Correlation of CDK4 mRNA expression with the clinicopathologic feature of nasopharyngeal carcinoma[J]. Academic Journal of Guangdong College of Pharmacy, 2013, 29(1): 89-92.
4. Tan QX, Qin QH, Yang WP, et al. Prognostic value of Ki-67 expression in HR-negative breast cancer before and after neoadjuvant chemotherapy[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(10): 6862-6870.
5. Yang G, Wang XJ, Huang LJ, et al. Hi ABCG4 expression is associated with poor prognosis in non-small-cell lung cancer patients treated with cisplatin-based chemotherapy[J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0135576.
6. Papay J, Krenacs T, Moldyay J, et al. Immunophenotypic profiling of nonsmall cell lung cancer progression using the tissue microarray approach[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2007, 15(1): 19-30.
7. Wu A, Wu B, Guo J, et al. Elevated expression of CDK4 in lung cancer[J]. J Transl Med, 2011, 9(38): 1-9.
8. Lu D, Wu Y, Wang Y, et al. CREPT accelerates tumorigenesis by regulating the transcription of cell-cycle-related genes[J]. Cancer Cell, 2012, 21(1): 92-104.
9. Chen TJ, Lee SW, Lin LC, et al. Cyclin-dependent kinase 4 overexpression is mostly independent of gene amplification and constitutes an independent prognosticator for nasopharyngeal carcinoma[J]. Tumour Biol, 2014, 35(7): 7209-7216.
10. 宋吉, 李玛琳. CyclinD1、P16及CDK4基因与胃癌相关性的研究进展[J]. 昆明医科大学学报, 2013, 34(10): 148-151.
SONG Ji, LI Malin. Research progression of CyclinD1, P16 and CDK4 in gastric cancer[J]. Journal of Kunming Medical University, 2013, 34(10): 148-151.
11. 贾文芝, 赵小平, 赵丽, 等. CDK4基因沉默对非小细胞肺癌A549增殖和代谢的影响[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(24): 4609-4614.
JIA Wenzhi, ZHAO Xiaoping, ZHAO Li, et al. The effects of CDK4

- gene silencing on the proliferation and metabolism in A549 cells[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2016, 16(24): 4609-4614.
12. Böger C, Behrens HM, Röcken C. Ki67—an unsuitable marker of gastric cancer prognosis unmasks intratumoral heterogeneity[J]. *J Surg Oncol*, 2016, 113(1): 46-54.
13. Li LT, Jiang G, Chen Q, et al. Ki-67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(3): 1566-1572.
14. Masubuchi T, Tada Y, Maruya S, et al. Clinicopathological significance of androgen receptor, HER2, Ki-67 and EGFR expressions in salivary duct carcinoma[J]. *Int J Clin Oncol*, 2015, 20(1): 35-44.

本文引用: 尹信, 夏靖华, 王磊. CDK4与Ki-67在非小细胞肺癌中的表达及其意义[J]. *临床与病理杂志*, 2018, 38(12): 2576-2582. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.12.008

Cite this article as: YIN Xin, XIA Jinghua, WANG Lei. Expressions and clinical significance of CDK4 and Ki-67 in non-small cell lung cancer patients[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2018, 38(12): 2576-2582. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.12.008