

细胞周期蛋白依赖激酶 4/6 抑制剂在膀胱癌治疗中的应用潜能*

佟智超¹ 刘忠清¹ 曲天瑞¹ 徐万海^{1△}

[摘要] 细胞周期进展异常是膀胱癌的重要特征之一。高选择性的细胞周期蛋白依赖激酶(CDK)4/6 抑制剂在膀胱癌中有潜在的应用前景,因为 89% 的膀胱癌患者存在细胞周期进程中关键基因的突变,预临床数据证实了它们作为单一或联合治疗策略的有效性。在这篇文章中,我们讨论了在膀胱癌中靶向 CDK4/6 的生物学原理,回顾了现有的临床证据,并进一步讨论了优化其临床应用所面临的挑战。

[关键词] 细胞周期;细胞周期蛋白依赖激酶 4/6 抑制剂;膀胱癌

doi:10.13201/j.issn.1001-1420.2020.12.017

[中图分类号] R737.14 **[文献标志码]** A

Potential of cell cycle-dependent kinase 4/6 inhibitors in the treatment of bladder cancer

TONG Zhichao LIU Zhongqing QU Tianrui XU Wanhai

(Department of Urology, Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, 150001, China)

Corresponding author: XU Wanhai, E-mail: xuwanhai@hrbmu.edu.cn

Abstract Dysregulated cell cycle progression is one of the key hallmarks of bladder cancer. Selective CDK4/6 inhibitors are promising antitumor agents, for 89% MIBC patients exert mutations among key mediators in cell cycle progression. Pre-clinical data demonstrated their potency as monotherapy or combination therapy strategy. In this article, we discuss the biological rationale for targeting CDK4/6 in bladder cancer, review the available clinical evidence, and further discuss the challenges of optimizing their use.

Key words cell cycle; CDK4/6 inhibitors; bladder cancer

细胞周期是真核生物内高度保守的细胞分裂的必须过程。在复杂的调控网络的监视下,细胞周期的每一个步骤依次进行,失调的细胞周期导致的细胞增殖异常是癌症的重要特征之一。细胞周期从一个阶段到下一个阶段由细胞周期蛋白依赖激酶(CDK)及其对应的细胞周期素(Cyclin)调控。因此,CDK 长期以来被视作癌症治疗的潜在靶点,但许多早期的 CDK 抑制剂并未在临床试验中取得满意的疗效,因为非选择性的泛 CDK 抑制剂对于正常细胞也具有显著的毒性^[1-3]。

这些问题随着高选择性的 CDK4/6 抑制剂的问世而得到显著改善。CDK4 和 CDK6 在结构和功能上具有高度相似性,共同调节细胞周期由 G₀/G₁ 期向 S 期转换。目前,有 3 种 CDK4/6 抑制剂阿贝西利(Abemaciclib),帕博西尼(Palbociclib)及瑞博西尼(Ribociclib)已被 FDA 批准应用于多种肿瘤^[4]。应用这些药物的前提是肿瘤细胞的细胞周期依赖于失调的 RB-E2F 通路,根据目前报道的

规模最大的膀胱癌患者测序结果,87% 的膀胱癌患者具有此通路的突变,提示此类药物应用于膀胱癌患者的巨大潜力^[5]。本文主要讨论在膀胱癌患者中应用 CDK4/6 抑制剂的理论依据,相关临床实验的结果以及联合治疗等优化方案。

1 CDK4/6-RB 通路调控细胞周期及 CDK4/6 抑制剂作用机制

依照目前最经典的细胞周期模型,细胞周期素 D(Cyclin D),包括 Cyclin D1、D2、D3 是细胞周期由 G₁ 期向 S 期转变的始动力,其表达受有丝分裂信号的调控。早在 G₁ 期,有丝分裂前的信号导致 Cyclin D 的表达上调,与之形成复合物的是激活的 CDK4/6。此复合物随后磷酸化抑癌蛋白视网膜母细胞瘤蛋白 RB(retinoblastoma protein)及其他袋状蛋白 p130 和 p107,失去抑制活性的 RB 蛋白与 E2F 转录因子家族解离。同时激发正反馈调节通路,释放的 E2F 转录因子促进细胞周期素 E(Cyclin E)的转录,它可以激活 CDK2、其他 DNA 合成及 S 期起始的重要蛋白。Cyclin-E-CDK2 复合物进一步超磷酸化 RB 蛋白,弱化其对于 E2F 转录因子的抑制,促进细胞周期进入 S 期^[6-8]。在此后的 G₂ 期及 M 期内,RB 均保持超磷酸化状态,直至整个分裂过程结束^[9]。INK4 和 CIP/KIP 负向调节

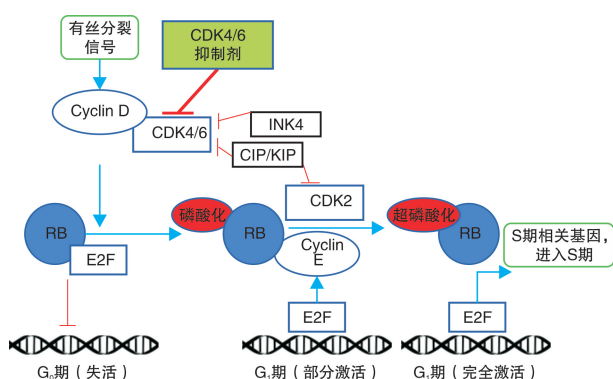
*基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(No: 82002688);哈尔滨医科大学附属第四医院优秀青年项目(No: HYDSYYXQN202004)

¹ 哈尔滨医科大学附属第四医院泌尿外科(哈尔滨,150001)

[△] 审校者

通信作者:徐万海,E-mail: xuwanhai@hrbmu.edu.cn

Cyclin D-CDK4/6 复合物的活性,因而被归类为细胞周期依赖蛋白抑制剂 (CKIs, Cyclin-dependent kinase inhibitors), 其中 INK4 包含 4 种已知的结构相似的蛋白 p15^{INK4B}、p16^{INK4A}、p18^{INK4C} 和 p19^{INK4D} 都可以特异性的结合 Cyclin D-CDK4/6 复合物,但对于其他的 CDKs 亲和力较差^[10]。CIP/KIP 家族由 p27^{KIP1}、p21^{CIP1} 和 p57^{KIP2} 组成,与 INK4 家族不同的是,CIP/KIP 家族所属蛋白均可以广泛结合所有的 CDKs,并且取决于所结合的蛋白,可以起到对细胞周期正向或负向调节。这两类蛋白通过一系列复杂的方式共同参与调节 G₁ 期到 S 期的细胞周期进程^[11-12]。例如,p16^{INK4A} 不仅可以抑制 CDK4 在胞质中通过折叠与热休克蛋白 90 (HSP90) 形成复合物,还可以直接与 CDK4 结合抑制其催化活性^[13]。与之相反,p27^{KIP1} 和 p21^{CIP1} 稳定 Cyclin D-CDK4/6 复合物的形成,可以通过隔绝这些蛋白,促进 CDK2 的激活。高选择性的 CDK4/6 抑制剂,可以通过抑制 CDK4/6 的活性,抑制 RB 蛋白的磷酸化而抑制 E2F 的转录功能,使 S 期所需基因无法表达从而有效地阻滞肿瘤细胞从 G₁ 期进展到 S 期^[14-15] (图 1)。



在有丝分裂信号刺激下,Cyclin D-CDK4/6 复合物磷酸化 RB 蛋白,解除其对于 E2F 的抑制,游离的 E2F 进一步转录 Cyclin E,其又与 CDK2 形成化合物进一步超磷酸化 RB 蛋白,完全释放 E2F,开始 S 期相关基因的转录。INK4 和 CIP/KIP 属于内源性细胞周期依赖蛋白抑制剂,高选择性 CDK4/6 抑制剂则对 CDK4/6 有极强的抑制作用从而使细胞周期停滞在 G₀/G₁ 期。

图 1 图示 CDK4/6-RB 通路调控细胞周期由 G₀/G₁ 向 S 期进展及 CDK4/6 抑制剂作用机制

2 CDK4/6 抑制剂在膀胱癌中的应用潜力

细胞周期的失调是膀胱癌常见的特征之一,根据目前规模最大的肌层侵袭性膀胱癌患者测序结果,p53/Cell Cycle 细胞周期通路在 89% 的患者中处于失调状态。其中,TP53 基因在 48% 患者中处于突变状态,MDM2 基因在 6% 的患者中处于扩增状态(拷贝数>4),在 19% 的患者中处于过表达状

态。17% 的 RB1 基因(编码 RB 蛋白)突变主要为失活突变,与低 mRNA 表达水平相关。CDKN1A 基因(编码 p21^{CIP1} 蛋白)的突变率约为 11%,也主要为失活突变。CDKN2A 基因(编码 p16^{INK4A} 蛋白)的突变率(7%)及纯合子缺失概率(22%)与此前的报道类似^[5,16]。一系列的研究证实了 CDK4/6 抑制剂在膀胱癌中的应用潜能,例如,Sathe 等^[17]率先确认了 Palbociclib 能诱导 RB 蛋白表达阳性的膀胱癌细胞系进入强烈的细胞周期抑制,并造成 RB 蛋白及磷酸化的 RB 蛋白的下调,从而抑制肿瘤的增殖与生长的分子机制,并提出 RB 蛋白的阳性表达以及 p16 的缺可作为分子标志物。而 Rubio 等^[15]在膀胱癌的动物模型中确认了 CDK4/6 抑制剂的有效性。在近年来逐渐得到认可的膀胱癌分子分型方法 UroB Lund 及 TCGA 分类法中,均有适合应用 CDK4/6 抑制剂的分子亚型介绍^[16]。基于以上原因,一系列临床试验正在开展中。

3 在膀胱癌中应用多种 CDK4/6 抑制剂的临床试验

截至 2020 年 1 月,在网站可查询共注册有五个将 CDK4/6 抑制剂应用于膀胱癌的相关临床试验正在开展或已经终止。其中,采用 Palbociclib 作为主要药物的有 3 项:作为单一治疗一线化疗失败后的转移性尿路上皮癌,尽管已经采用了 RB 蛋白阳性表达和 CDKN2A 基因缺失作为患者入组标准,但此试验已经因没有患者取得满意的疗效而终止^[18];与顺铂或卡铂联用方案的临床试验正在招募中;值得更加关注的是最新开展的一项以患者的基因检测结果作为指导用药依据的临床试验,尽管试验组织者并未透露具体的方案,笔者认为根据现有的证据,以及生物标记物的缺乏,尚未有可靠的可预测疗效的精准治疗方案。另外两项临床试验采用 Abemaciclib,均处于招募阶段,尚未有数据或证据可供参考。

4 CDK4/6 抑制剂的其他潜在抗肿瘤机制

除抑制细胞周期进展外,CDK4/6 抑制剂可能还在通过信号通路间的相互作用在其他抗癌机制中发挥作用^[12,19]。

4.1 CDK4/6 抑制剂加强其他信号通路细胞抑制剂的效应

在作者此前的工作中,充分验证了 Palbociclib 与 PI3K、EFGR、FGFR 等联合治疗在膀胱癌中的有效性,因为 CDK4/6 抑制剂本身不是细胞毒类药物,不具备直接杀伤肿瘤细胞的能力,因而联用其他关键信号通路的抑制剂可以取得更好的抗肿瘤效果^[20]。这些潜在的联合治疗方案,亦被其他的研究所证实^[21-22]。这些联合治疗的方案之所以有效,可能是因为屏蔽了不同肿瘤细胞中特定的代偿机制^[23-24]。另有研究指出,PARP 抑制剂与

CDK4/6 抑制剂联合治疗也有较好的协同效应^[25]。

4.2 CDK4/6 抑制剂诱导细胞周期阻滞后导致的细胞衰老

最近很多研究都关注了不同细胞类型在暴露于 CDK4/6 抑制剂后的过程:有些细胞仅仅保持静止而有些则进入衰老。不同于保持静止状态,一旦细胞进入衰老,即使脱离了抑制环境,也无法重新进入正常的细胞周期,即失去了增殖能力。从静止到衰老的转变被称为生长阻滞衰老(senescence after growth arrest, SAGA)^[26]。CDK4/6 抑制剂所导致的衰老可能与 CDK4/6 的底物如插头蛋白 M1(FOX M1)有关^[27]。有脂肪肉瘤的研究观测到非常有趣的现象,在敲除 HRAS 基因后,会预防 CDK4/6 抑制剂所导致的衰老,即使这些细胞仍然受到 CDK4/6 抑制剂细胞周期阻滞的影响^[28]。明确 SAGA 相关的蛋白,可能有助于发现可供联合治疗的新靶点,或者作为生物标志物调整 CDK4/6 抑制剂的治疗方案。尽管衰老可以通过诱导免疫反应和免疫细胞的富集来介导肿瘤清除,但衰老又会导致肿瘤微环境向有利于肿瘤发展的方向改变。因此,充分了解 CDK4/6 抑制剂导致的 SAGA 对于如何通过操纵相关免疫反应来提升治疗效果至关重要^[12]。

4.3 CDK4/6 抑制剂对于细胞代谢的影响

细胞的分裂与细胞的代谢状态息息相关,除了 RB 蛋白外,CDK4/6 还通过与其他靶蛋白作用参与代谢机制。例如,CDK4 可以通过磷酸化 AMPK- $\alpha 2$ 抑制其功能从而抑制脂肪酸氧化^[29]。而 CDK4 磷酸化 GCN5 可以导致 PGC-1 α 的乙酰化从而降低葡萄糖的代谢^[30]。亦有证据表明,应用 CDK4/6 抑制剂后,可以导致肿瘤细胞内 ROS 的增加,或者若联用其他可以导致 ROS 清除减少的抑制剂,从而促进凋亡。CDK4/6 抑制剂带来的后续细胞代谢的改变,针对特定的细胞类型和基因背景,极有可能作为抗肿瘤的新机制^[31]。

4.4 CDK4/6 抑制剂对于肿瘤微环境和免疫应答的作用

肿瘤微环境不仅仅是为肿瘤细胞提供更加良好的生长环境,甚至还可以驱动肿瘤细胞的侵袭性。在一系列的动物实验中,CDK4 不仅是肿瘤增殖的驱动力,也是肿瘤微环境成熟的必要条件。最近的研究证明,CDK4/6 抑制剂所导致的细胞周期阻滞,还可以促进抗原的处理和提呈从而提升肿瘤细胞的免疫原性。而治疗后富集的 CD3⁺ 刺激细胞毒 T 细胞增殖的同时并抑制其相关负调节细胞的增殖^[32]。CDK4/6 抑制剂不仅可以抑制 SPOP 的磷酸化,促进其降解并且封阻 PD-L1 蛋白酶体介导的降解。还可以激发 PD-1 表达的 T 细胞从

而提升 T 细胞浸润,这种效应至少部分是由 CDK6 诱导的 NFAT4 磷酸化引起的^[33]。研究表明,联用 PD-1 抑制剂和 CDK4/6 抑制剂在结肠癌的动物体内实验中取得了良好的疗效。由于 FDA 新近批准了一系列 PD-1/PD-L1 抑制剂应用于膀胱癌作为二线治疗方案,尝试结合 CDK4/6 抑制剂与免疫疗法的时机已经成熟,但相关研究仍然不足。

5 在膀胱癌中临床应用 CDK4/6 抑制剂所面临的挑战

尽管采取了 RB 蛋白阳性表达和 p16^{INK4A} 作为患者的入组标准,但首个在膀胱癌中尝试应用 CDK4/6 抑制剂的临床试验仍然以终止而告终。因此,有效的生物标志物的缺失仍然是限制 CDK4/6 抑制剂临床应用的主要原因。根据最近报道的一项研究结果,在膀胱癌中,甚至 RB1 基因表达与否,都不是决定肿瘤细胞对 CDK4/6 抑制剂是否响应的决定因素^[15]。这不仅提示了膀胱癌中一定存在复杂的 Cyclin D/CDK4/6 的代偿机制,还说明 CDK4/6 抑制剂的效应机制也可能不仅仅是通过 RB 蛋白实现的。因此,进一步阐明 CDK4/6 在膀胱癌中作用的分子机制是临床应用的关键。

6 总结

CDK4/6 抑制剂作为近来被 FDA 批准应用于乳腺癌治疗的靶向治疗药物,其安全性得以保证,结合膀胱癌中细胞周期信号通路的高频率失调,CDK4/6 抑制剂极有希望成为潜在的治疗膀胱癌的靶向药物。尽管预临床实验的结果十分乐观,但在临床试验中的有效率不足。因此,更多的涉及膀胱癌中细胞周期调控机制的研究,尤其是对 CDK4/6 被抑制后的代偿机制,以及 RB 阴性表达细胞中细胞周期的驱动机制可能是突破此难题的关键方向。结合高通量测序技术和多生物标志物共同指导的治疗方案,应为在膀胱癌中应用 CDK4/6 抑制剂的未来研究方向。

[参考文献]

- 1 O'Leary B, Finn RS, Turner NC. Treating cancer with selective CDK4/6 inhibitors[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2016, 13(7): 417-430.
- 2 Peyressatre M, Prevel C, Pellerano M, et al. Targeting cyclin-dependent kinases in human cancers: from small molecules to Peptide inhibitors [J]. Cancers (Basel), 2015, 7(1): 179-237.
- 3 Pan Q, Sathe A, Black PC, et al. CDK4/6 inhibitors in cancer therapy: a novel treatment strategy for bladder cancer[J]. Bladder Cancer, 2017, 3(2): 79-88.
- 4 Petrelli F, Ghidini A, Pedersini R, et al. Comparative efficacy of palbociclib, ribociclib and abemaciclib for ER+ metastatic breast cancer: an adjusted indirect analysis of randomized controlled trials [J]. Breast Cancer Res

- Treat, 2019, 174(3): 597—604.
- 5 Robertson AG, Kim J, Al-Ahmadie H, et al. Comprehensive molecular characterization of muscle-invasive Bladder Cancer[J]. *Cell*, 2017, 171(3): 540—556 e525.
 - 6 Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer; a changing paradigm[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(3): 153—166.
 - 7 Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, et al. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1[J]. *Genes Dev*, 1993, 7(5): 812—821.
 - 8 Hiebert SW, Chellappan SP, Horowitz JM, et al. The interaction of RB with E2F coincides with an inhibition of the transcriptional activity of E2F[J]. *Genes Dev*, 1992, 6(2): 177—185.
 - 9 Harbour JW, Luo RX, Dei Santi A, et al. Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1[J]. *Cell*, 1999, 98(6): 859—869.
 - 10 Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression[J]. *Genes Dev*, 1999, 13(12): 1501—1512.
 - 11 Paternot S, Bockstaele L, Bisteau X, et al. Rb inactivation in cell cycle and cancer: the puzzle of highly regulated activating phosphorylation of CDK4 versus constitutively active CDK-activating kinase[J]. *Cell Cycle*, 2010, 9(4): 689—699.
 - 12 Klein ME, Kovatcheva M, Davis LE, et al. CDK4/6 Inhibitors: the mechanism of action may not be as simple as once thought[J]. *Cancer Cell*, 2018, 34(1): 9—20.
 - 13 Zhang HS, Postigo AA, Dean DC. Active transcriptional repression by the Rb-E2F complex mediates G1 arrest triggered by p16INK4a, TGFbeta, and contact inhibition[J]. *Cell*, 1999, 97(1): 53—61.
 - 14 Iwata H. Clinical development of CDK4/6 inhibitor for breast cancer[J]. *Breast Cancer*, 2018, 25(4): 402—406.
 - 15 Rubio C, Martinez-Fernandez M, Segovia C, et al. CDK4/6 inhibitor as a novel therapeutic approach for advanced bladder cancer independently of RB1 Status[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(1): 390—402.
 - 16 Rentsch CA, Muller DC, Ruiz C, et al. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma: a step closer to clinical translation[J]? *Eur Urol*, 2017, 72(6): 960—961.
 - 17 Sathe A, Koshy N, Schmid SC, et al. CDK4/6 Inhibition Controls Proliferation of Bladder Cancer and Transcription of RB1[J]. *J Urol*, 2016, 195(3): 771—779.
 - 18 Rose TL, Chism DD, Alva AS, et al. Phase II trial of palbociclib in patients with metastatic urothelial cancer after failure of first-line chemotherapy[J]. *Br J Cancer*, 2018, 119(7): 801—807.
 - 19 Goel S, DeCristo MJ, McAllister SS, et al. CDK4/6 Inhibition in Cancer: Beyond Cell Cycle Arrest[J] *Trends Cell Biol*, 2018, 28(11): 911—925.
 - 20 Tong Z, Sathe A, Ebner B, et al. Functional genomics identifies predictive markers and clinically actionable resistance mechanisms to CDK4/6 inhibition in bladder cancer[J] *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 322.
 - 21 Brandao M, Caparica R, Eiger D, et al. Biomarkers of response and resistance to PI3K inhibitors in estrogen receptor-positive breast cancer patients and combination therapies involving PI3K inhibitors[J]. *Ann Oncol*, 2019, 30(Supplement_10): x27—x42.
 - 22 Bonelli MA, Digiacomio G, Fumarola C, et al. Combined Inhibition of CDK4/6 and PI3K/AKT/mTOR Pathways Induces a Synergistic Anti-Tumor Effect in Malignant Pleural Mesothelioma Cells[J]. *Neoplasia*, 2017, 19(8): 637—648.
 - 23 Herrera-Abreu MT, Palafox M, Asghar U, et al. Early Adaptation and Acquired Resistance to CDK4/6 Inhibition in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(8): 2301—2313.
 - 24 Jansen VM, Bholra NE, Bauer JA, et al. Kinome-Wide RNA Interference Screen Reveals a Role for PDK1 in Acquired Resistance to CDK4/6 Inhibition in ER-Positive Breast Cancer[J]. *Cancer Res*, 2017, 77(9): 2488—2499.
 - 25 Konecny GE. Combining PARP and CDK4/6 inhibitors in MYC driven ovarian cancer[J]. *EBioMedicine*, 2019, 43: 9—10.
 - 26 Kovatcheva M, Liao W, Klein ME, et al. ATRX is a regulator of therapy induced senescence in human cells[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 386.
 - 27 Anders L, Ke N, Hydrbring P, et al. A systematic screen for CDK4/6 substrates links FOXM1 phosphorylation to senescence suppression in cancer cells[J]. *Cancer Cell*, 2011, 20(5): 620—634.
 - 28 Yoshida A, Lee EK, Diehl JA. Induction of Therapeutic Senescence in Vemurafenib-Resistant Melanoma by Extended Inhibition of CDK4/6[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(10): 2990—3002.
 - 29 Lopez-Mejia IC, Lagarrigue S, Giralto A, et al. CDK4 Phosphorylates AMPKalpha2 to Inhibit Its Activity and Repress Fatty Acid Oxidation[J]. *Mol Cell*, 2017, 68(2): 336—349 e336.
 - 30 Lee Y, Dominy JE, Choi YJ, et al. Cyclin D1-Cdk4 controls glucose metabolism independently of cell cycle progression[J]. *Nature*, 2014, 510(7506): 547—551.
 - 31 Franco J, Balaji U, Freinkman E, et al. Metabolic Reprogramming of Pancreatic Cancer Mediated by CDK4/6 Inhibition Elicits Unique Vulnerabilities[J]. *Cell Rep*, 2016, 14(5): 979—990.
 - 32 Goel S, DeCristo MJ, Watt AC, et al. CDK4/6 inhibition triggers anti-tumour immunity[J]. *Nature*, 2017, 548(7668): 471—475.
 - 33 Deng J, Wang ES, Jenkins RW, et al. CDK4/6 Inhibition Augments Antitumor Immunity by Enhancing T-cell Activation[J]. *Cancer Discov*, 2018, 8(2): 216—233.