

· 论 著 ·

结直肠癌组织 CALM1 基因表达改变、EGFR 突变情况及其临床意义

张磊 邵峰 李丽军 杜章

[摘要] 目的 探讨结直肠癌组织钙调蛋白 1(CALM1)基因表达改变和表皮生长因子受体(EGFR)突变情况及其临床意义。方法 选择 100 例结直肠癌患者作为研究对象,均行手术治疗。收集所有患者手术切除癌组织和切缘正常组织标本,检测结直肠癌组织和切缘正常组织 CALM1 基因表达及 EGFR 突变情况。比较不同临床病理特征患者癌组织 CALM1 基因表达水平及 EGFR 突变情况。术后随访 3 年,观察患者生存情况,运用 Kaplan-Meier 法对 CALM1 不同表达水平患者及 EGFR 突变型与野生型患者进行生存分析。结果 结直肠癌组织 CALM1 基因表达水平及 EGFR 突变型占比均高于切缘正常组织($t=28.09$, $\chi^2=17.36$, P 均 <0.05);有淋巴结转移、Dukes 分期 C 期、低分化程度患者 CALM1 基因高表达、EGFR 突变型比例高于无淋巴结转移、Dukes 分期 A~B 期、高/中分化程度患者(χ^2 分别 $=11.79$ 、 7.70 、 7.96 、 6.18 、 7.30 、 8.24 , P 均 <0.05);CALM1 基因高表达和 EGFR 突变型患者 3 年生存率低于 CALM1 基因低表达和 EGFR 野生型患者,差异均有统计学意义(χ^2 分别 $=14.85$ 、 13.27 , P 均 <0.05)。结论 结直肠癌组织 CALM1 基因表达水平及 EGFR 突变型占比均高于切缘正常组织,二者均与患者临床病理特征和术后生存情况有关。

[关键词] 结直肠癌; 钙调蛋白 1; 表皮生长因子受体

Changes of CALM1 gene expression and EGFR mutation in colorectal cancer and their clinical significance

ZHANG Lei, SHAO Feng, LI Lijun, et al. Department of Anorectal Surgery, Dongyang People's Hospital, Dongyang 322100, China.

[Abstract] **Objective** To investigate the changes of calmodulin 1 (CALM1) gene expression and epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in colorectal cancer (CRC) and their clinical significance. **Methods** A total of 100 patients with CRC were selected as the research subjects, all of whom underwent surgical treatment. The specimens of surgically resected cancer tissues and normal tissues at the cutting edge of all patients were collected, and the expression of CALM1 gene and EGFR mutation in cancer tissues and normal tissues at the cutting edge were detected. The expression level of CALM1 gene and EGFR mutation in cancer tissues of patients with different clinicopathological characteristics were compared. The patients were followed up for 3 years, the survival of patients with different expression levels of CALM1 and EGFR mutant and wild-type patients were analyzed by Kaplan-Meier method. **Results** The expression level of CALM1 gene and the proportion of EGFR mutant in cancer tissues were higher than those in normal tissues at the cutting edge ($t=28.09$, $\chi^2=17.36$, $P<0.05$). The high expression of CALM1 gene and the proportions of EGFR mutations in patients with lymph node metastasis, Dukes stage C and low differentiation were higher than those without lymph node metastasis, Dukes stage A-B and high/medium differentiation ($\chi^2=11.79$, 7.70 , 7.96 , 6.18 , 7.30 , 8.24 , $P<0.05$). The overall 3-year survival rates of patients with high expression of CALM1 gene and EGFR mutation were statistically lower than the patients with low expression of CALM1 gene and EGFR wild type ($\chi^2=14.85$, 13.27 , $P<0.05$). **Conclusion** The expression level of CALM1 gene and the proportion of EGFR mutation in CRC tissues are higher than those in normal tissues, and both of which were related to the clinicopathological characteristics and postoperative survival of patients.

DOI:10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2023.001.005

作者单位: 322100 浙江东阳, 东阳市人民医院肛肠外科

[Key words] colorectal cancer; calmodulin 1; epidermal growth factor receptor

结直肠癌是常见的胃肠道恶性肿瘤,也是肿瘤界的防治重点^[1]。目前手术切除仍是治疗结直肠癌的首要选择,但如何降低术后死亡率以改善预后仍是临床研究的重点。钙调蛋白1(calmodulin 1, CALM1)是CALM家族的一种钙调蛋白,研究报道CALM1能促进食管癌发展^[2],但其在结直肠癌中的表达及作用机制尚少有文献报道。表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是一个蛋白受体酪氨酸激酶,EGFR突变可导致基因活性异常而参与疾病发生,研究发现EGFR突变与非小细胞肺癌的发生及预后紧密相关^[3],但其在结直肠癌中的突变情况及对预后的影响还需进一步探讨。本次研究探讨结直肠癌患者癌组织CALM1基因表达水平和EGFR突变情况及其与预后的关系,以期临床改善结直肠癌的预后提供参考。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2017年2月至2018年11月期间在东阳市人民医院住院治疗的结直肠癌患者100例作为研究对象,其中男性57例、女性43例;年龄41~89岁,平均(65.16±11.82)岁;肿瘤部位:结肠癌52例、直肠癌48例;最大肿瘤直径:≤5 cm 46例, >5 cm 54例;淋巴结转移53例、未转移47例;Dukes分期:A期20例、B期28例、C期52例;高分化32例、中分化48例、低分化20例。纳入标准包括:①均接受手术治疗且经术后病理检查确诊的原发性结直肠癌;②术前均未接受放疗、化疗。排除:①严重心肝肾功能损伤者;②其他恶性肿瘤病史或其他结直肠疾病者;③严重精神疾病者;④高血压等慢性病史者;⑤凝血功能或认知功能障碍者;⑥既往有腹部手术史者;⑦妊娠或哺乳妇女;⑧病灶广泛侵袭邻近组织无法切除者;⑨存在自身免疫性及感染性疾病者;⑩失访患者;⑪因其他疾病、意外等死亡的患者。本次研究经医院伦理委员会审批,患者或家属均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 CALM1基因表达水平检测 收集患者手术切除癌组织和切缘正常组织标本,按TRIzol裂解抽提法提取总RNA,检测RNA完整性,确定符合逆转录标准,根据CALM1-RNA逆转录试剂盒进行逆转录,条件:37℃ 30 min, 98℃ 5 min, -20℃保存。应用CALM1-RNA逆转录试剂盒对基因特异性引物进行实时荧光定量聚合酶链式反应扩增,条件:

95℃ 1 min, 60℃ 1 min, 75℃ 5 min,共35个循环,所有试验均至少重复3次,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算。本次研究以结直肠癌患者癌组织CALM1基因平均表达水平作为分界线,将CALM1基因≥平均表达水平记为高表达,<平均表达水平记为低表达。

1.2.2 EGFR突变检测方法 将收集的癌组织及切缘正常组织放入液氮中研磨成粉,取50 mg置入2 ml离心管,用DNA提取试剂盒提取DNA,采用ABI 7500实时荧光定量PCR仪检测EGFR基因18~21外显子的共29种突变类型,分析EGFR突变情况,所有操作均严格按照试剂盒说明书。

1.2.3 跟踪随访 所有患者术后均跟踪随访3年,通过电话、门诊复查等方式随访患者生存情况,并进行生存分析。

1.3 统计学方法 采用SPSS 26.0软件进行统计学检验。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 t 检验;计数资料比较采用 χ^2 检验;CALM1基因表达水平及EGFR突变情况总生存率采用Kaplan-Meier法计算,绘制生存曲线并应用Log-rank检验比较组间生存差异。设 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结直肠癌癌组织和切缘正常组织CALM1基因表达水平及EGFR突变情况比较见表1

表1 癌组织和切缘正常组织CALM1基因表达及EGFR突变情况比较

组别	n	CALM1	EGFR/例(%)	
			突变型	野生型
癌组织	100	0.83±0.16*	33(33.00)*	67(67.00)
切缘正常组织	100	0.35±0.06	9(9.00)	91(91.00)

注:*,与切缘正常组织比较, $P<0.05$ 。

由表1可见,结直肠癌癌组织CALM1基因表达水平及EGFR突变型比例高于切缘正常组织,差异均有统计学意义($t=28.09$, $\chi^2=17.36$, P 均 <0.05)。

2.2 不同临床病理特征患者癌组织CALM1基因表达水平及EGFR突变情况比较见表2

由表2可见,不同性别、年龄、肿瘤部位、最大肿瘤直径患者CALM1基因高表达、EGFR突变型比例比较,差异均无统计学意义(χ^2 分别=0.44、0.26; 1.99、3.15; 2.62、2.67; 2.69、3.18, P 均 >0.05);有淋巴结转移、Dukes分期C期、低分化程度患者CALM1基因高表达、EGFR突变型占比高于无淋巴结转移、Dukes分期A~B期、高/中分化程度患者,差异均有

统计学意义(χ^2 分别=11.79、7.70; 7.96、6.18; 7.30、8.24, P 均 <0.05)。

表2 不同临床病理特征患者癌组织 CALM1 基因表达水平及 EGFR 突变情况比较

病理特征		n	CALM1 基因表达		EGFR 突变	
			高表达(n=48)	低表达(n=52)	突变型(n=33)	野生型(n=67)
性别	男	57	29(50.88)	28(49.12)	20(35.09)	37(64.91)
	女	43	19(44.19)	24(55.81)	13(30.23)	30(69.77)
年龄	≤65 岁	51	28(54.90)	23(45.10)	21(41.18)	30(58.82)
	>65 岁	49	20(40.82)	29(59.18)	12(24.49)	37(75.75)
肿瘤部位	结肠	52	29(55.77)	23(44.23)	21(40.38)	31(59.62)
	直肠	48	19(39.48)	29(60.42)	12(25.00)	36(75.00)
最大肿瘤直径	≤5 cm	46	18(39.13)	28(60.87)	11(23.91)	35(76.09)
	>5 cm	54	30(55.56)	24(44.44)	22(40.74)	32(59.26)
淋巴结转移	是	53	34(64.15)	19(35.85)	24(45.28)	29(54.72)
	否	47	14(29.79)	33(70.21)	9(19.15)	38(80.85)
Dukes 分期	A~B 期	48	16(33.33)	32(66.67)	10(20.83)	38(79.17)
	C 期	52	32(61.54)	20(38.46)	23(44.23)	29(55.77)
分化程度	低	20	15(75.00)	5(25.00)	12(60.00)	8(40.00)
	高/中	80	33(41.25)	47(58.75)	21(26.25)	59(73.75)

2.3 随访期间,100 例结直肠癌患者中病死 35 例,余 65 例患者均存活,3 年病死率为 35.00%。

2.4 CALM1 基因高表达与低表达生存曲线和 EGFR 突变型与野生型生存曲线见图 1、图 2

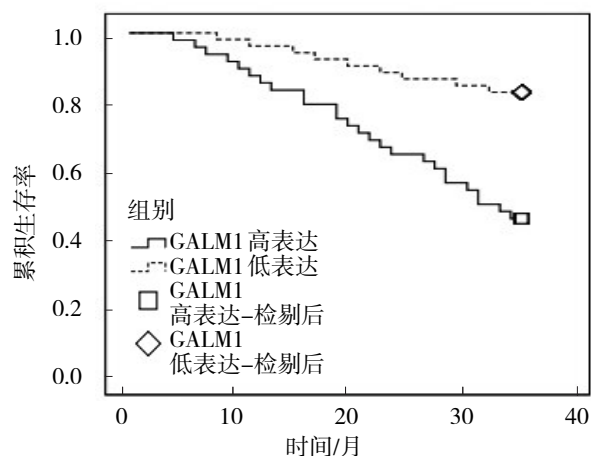


图1 CALM1 基因高表达与低表达患者生存曲线

由图 1、2 可见, CALM1 基因高表达和 EGFR 突变型患者与 CALM1 基因低表达和 EGFR 野生型患者 3 年生存率(45.83%、42.42%vs82.69%、76.12%)比较,差异均有统计学意义(χ^2 分别=14.85、13.27, P 均 <0.05)。

3 讨论

结直肠癌是生物学上高度异质性肿瘤,具有较高的发病率和病死率^[4]。本次研究发现 100 例结直肠癌患者 3 年病死率为 35.00%,略低于张微微等^[5]研究报道的 37.76%,可能与纳入样本量略有差异有

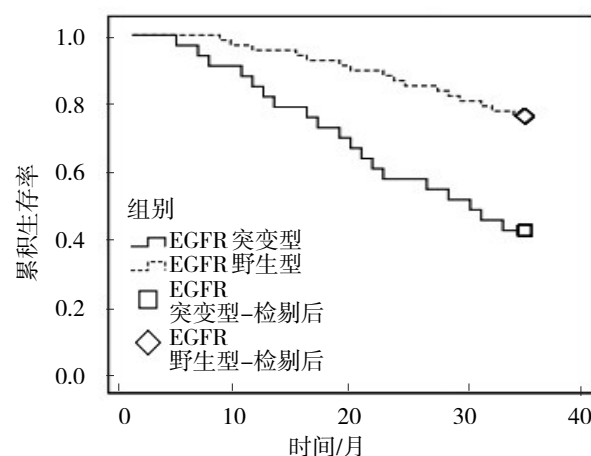


图2 EGFR 突变型与野生型患者生存曲线

关,但均可证实结直肠癌术后病死率较高。因此,探索影响结直肠癌患者手术预后的因素对临床积极干预以提高生存率尤为重要。

CALM1 是 CALM 家族的钙结合受体蛋白,其表达水平与多种癌症相关,参与癌细胞增殖和转移,在肿瘤发生中起到一定作用,研究发现 CALM 家族基因在口腔癌中普遍表达^[6]。EGFR 是受体蛋白酪氨酸激酶,在肿瘤细胞中分布广泛,与特异性配体结合后,通过激活酪氨酸蛋白激酶途径,参与肿瘤细胞增长、迁移、复发等过程^[7]。本次研究发现癌组

组织 CALM1 基因表达水平和 EGFR 突变型比例均高于切缘正常组织,与韩秀娟等^[8]和李美玲等^[9]研究一致,均表明 CALM1 基因表达上调和 EGFR 突变参与肿瘤发生。另本次研究发现淋巴结转移、Dukes 分期 C 期、低分化程度患者 CALM1 基因高表达、EGFR 突变型比例高于无淋巴结转移、Dukes 分期 A~B 期、高/中分化程度患者,提示 CALM1 基因表达水平和 EGFR 突变与结直肠癌患者的临床病理特征关系密切,可能对结直肠癌病情和预后具有评估价值。

本次研究还发现 CALM1 基因高表达、EGFR 突变型患者 3 年生存率低于低表达、野生型患者,提示 CALM1 基因表达水平和 EGFR 突变与结直肠癌患者的生存情况密切相关。CALM 家族基因分别存在于不同的染色体上,但其蛋白质产物是完全相同的,钙调蛋白系统均可参与癌组织和正常组织的生长和增殖。研究显示 CALM 家族成员基因表达上调与胰腺癌^[10]、垂体腺瘤^[11]等多种癌症有关,并且可通过多种途径促进肿瘤的转移和侵害,可根据其基因表达情况判断患者生存情况。故在结直肠癌中 CALM1 基因表达上调可促进癌细胞侵袭和转移,增加患者预后不良和死亡风险。EGFR 是一种跨膜型生长因子受体,可将肿瘤生长信号分子从细胞传递到细胞内,EGFR 突变会引起受体激活,导致机体正常组织细胞生物学特性改变,促进肿瘤细胞侵袭和增长,延缓肿瘤细胞凋亡,影响预后^[12]。由此可见 CALM1 基因高表达、EGFR 突变型在结直肠癌的发生发展中起到协同作用,可共同促进肿瘤的发生,影响患者预后效果。临床可通过早期检测 CALM1 基因高表达和 EGFR 突变型鉴别诊断结直肠癌患者病情,有利于进一步延长患者生存期,提高患者生存质量。

综上所述,结直肠癌组织 CALM1 基因表达水平及 EGFR 突变型占比高于切缘正常组织,二者均与患者临床病理特征和术后生存情况有关。本次研究不足之处在于样本选取量较少,不足以代表全国患者的特点,需在今后研究中扩大样本量,进行更广泛的探索。

参考文献

1 Christodoulides N, Lami M, Malietzis G, et al. Sporadic

- colorectal cancer in adolescents and young adults: A scoping review of a growing healthcare concern[J]. *Int J Colorectal Dis*, 2020, 35(8):1413-1421.
- 2 Liu T, Han X, Zheng S, et al. CALM1 promotes progression and dampens chemosensitivity to EGFR inhibitor in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1):121.
- 3 Li WY, Zhao TT, Xu HM, et al. The role of EGFR mutation as a prognostic factor in survival after diagnosis of brain metastasis in non-small cell lung cancer: A systematic review and meta-analysis[J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1):145.
- 4 Veld JV, Beek KJ, Consten ECJ, et al. Definition of large bowel obstruction by primary colorectal cancer: A systematic review[J]. *Colorectal Dis*, 2021, 23(4):787-804.
- 5 张微微, 王丽娟, 王肖琳. 2008-2014 年鞍山市城区结直肠癌发病和死亡及生存分析[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2021, 28(14):1061-1066.
- 6 Sunitha J, Mahendra J, Mahendra L, et al. Molecular docking studies of a-mangostin with oral cancer targets ARRB1, FLNA, CALM3 and HTT[J]. *Bioinformation*, 2020, 16(8):625-630.
- 7 Melosky B, Kambartel K, Häntschel M, et al. Worldwide prevalence of epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer: A meta-analysis[J]. *Mol Diagn Ther*, 2022, 26(1):7-18.
- 8 韩秀娟, 刘清, 郑树涛, 等. CALM1 在食管鳞癌细胞及组织水平中的表达[J]. *新疆医科大学学报*, 2020, 43(4):439-443, 448.
- 9 李美玲, 张光英. miR-133 和 EGFR 在结肠癌组织中的表达及其临床意义[J]. *医学临床研究*, 2020, 37(8):1213-1215, 1219.
- 10 Lei Y, Yu T, Li C, et al. Expression of CAMK1 and its association with clinicopathologic characteristics in pancreatic cancer[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(2):1198-1206.
- 11 Huang J, Pan Y, Hu G, et al. SRC fine-tunes ADAM10 shedding activity to promote pituitary adenoma cell progression[J]. *FEBS J*, 2020, 287(1):190-204.
- 12 Holleman MS, Al MJ, Zaim R, et al. Cost-effectiveness analysis of the first-line EGFR-TKIs in patients with non-small cell lung cancer harbouring EGFR mutations[J]. *Eur J Health Econ*, 2020, 21(1):153-164.

(收稿日期 2022-08-03)

(本文编辑 高金莲)