

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.21.009

CALML3 鉴别诊断肺腺癌和鳞状细胞癌的潜在价值分析

苏培渊, 杨清, 付兵, 陈岳威, 黄文辉
成都中医药大学附属医院胸心外科, 四川成都 610075

摘要:目的 探讨钙调蛋白样蛋白 3(CALML3)鉴别诊断肺鳞状细胞癌(LUAD)和肺腺癌(LUSC)的潜在价值。方法 采用生物信息学的方法分析 CALML3 在 LUAD 和 LUSC 中的表达情况;分析 LUAD、LUSC 临床特征对 CALML3 表达水平的影响;采用荧光定量 PCR(qPCR)检测 CALML3 mRNA 在 LUAD 和 LUSC 中的表达情况;采用受试者工作特征(ROC)曲线分析 CALML3 对 LUAD、LUSC 的诊断价值。结果 通过对癌症基因组图谱(TCGA)数据分析发现 CALML3 在 LUSC 中表达水平明显升高,在 LUSC 中的改变倍数是 LUAD 中的 7 149 倍。LUSC 患者性别、年龄、吸烟情况、肿瘤分期及淋巴结转移程度对 CALML3 的相对表达水平没有影响($P>0.05$)。CALML3 在 LUSC、LUAD 组织中的相对表达水平高于癌旁正常组织($P<0.05$)。CALML3 在 LUSC 中的曲线下面积(AUC)为 0.837。结论 CALML3 可作为区分 LUAD 和 LUSC 的候选标志物。

关键词:钙调蛋白样蛋白 3; 肺鳞状细胞癌; 肺腺癌; 生物标志物

中图分类号:R734.2

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)21-3105-04

Analysis of the potential value of CALML3 in the differential diagnosis of lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma

SU Peiyuan, YANG Qing, FU Bing, CHEN Yuewei, HUANG Wenhui

Department of Cardiothoracic Surgery, Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, Sichuan 610075, China

Abstract: Objective To explore the potential value of calmodulin-like 3 (CALML3) in the differential diagnosis of lung squamous cell carcinoma (LUAD) and lung adenocarcinoma (LUSC). **Methods** Bioinformatics methods were used to analyze the expression of CALML3 in LUAD and LUSC; the influence of LUAD and LUSC clinical characteristics on the expression of CALML3 was analyzed; fluorescent quantitative PCR (qPCR) was used to detect the expression of CALML3 mRNA in LUAD and LUSC. The receiver operating characteristic (ROC) curve was used to analyze the diagnostic value of CALML3 for LUAD and LUSC. **Results** Through the analysis of the cancer genome atlas (TCGA) data, it was found that the expression level of CALML3 in LUSC was significantly increased, and the fold change in LUSC was 7 149 times that in LUAD. The gender, age, smoking status, tumor stage and lymph node metastasis of LUSC patients had no effect on the relative expression level of CALML3 ($P>0.05$). The relative expression level of CALML3 in LUSC and LUAD tissue was higher than that in the adjacent normal tissue ($P<0.05$). The area under the curve (AUC) of CALML3 in LUSC was 0.837. **Conclusion** CALML3 can be used as a candidate marker to distinguish LUAD from LUSC.

Key words: calmodulin-like 3; lung squamous cell carcinoma; lung adenocarcinoma; biomarker

肺癌是全球范围内对人类健康和生命威胁最大的恶性肿瘤之一,其死亡率位居恶性肿瘤的首位^[1-2]。肺癌患者中约有 85% 的患者为非小细胞肺癌,其中约 50% 的非小细胞肺癌患者组织病理学分类属于肺腺癌(LUAD),约 30% 的患者组织病理学分类属于肺鳞状细胞癌(LUSC)。LUAD 和 LUSC 在转录组水平、细胞网络调控、预后特征及治疗反应中的表现明显不同^[3-4]。因此,准确区分这 2 种亚型对于肺癌的诊断和治疗尤为重要。

近年来,随着医学技术的不断发展和提高,肺癌

的治疗模式已从依据分期制订治疗方案的模式转变为依据基因组学、组织学分类制订精准治疗方案的先进治疗模式。因此,如何精准鉴别 LUAD 和 LUSC,对肺癌的靶向治疗起到关键作用。目前,LUAD 和 LUSC 实验室的鉴别诊断常见标志物主要为甲状腺转录因子-1(TTF-1)、新天门冬氨酸蛋白酶 A(NapsinA)、肿瘤蛋白 p63(TP63)、细胞角蛋白(CK)5/6/7,其对肺癌鉴别诊断的准确率可达到 75% 以上^[3,5]。然而,现有的实验室标志物对肺癌鉴别诊断准确率仍然无法让临床满意,需要发现新的、更高诊断准确率的

作者简介:苏培渊,男,主治医师,主要从事肿瘤相关研究。

本文引用格式:苏培渊,杨清,付兵,等. CALML3 鉴别诊断肺腺癌和鳞状细胞癌的潜在价值分析[J]. 检验医学与临床,2021,18(21):3105-3108.

标志物用于肺癌的鉴别诊断。

钙调蛋白样蛋白 3 (CALML3) 是一种钙敏感蛋白, 其对细胞黏附和运动起重要调控作用。研究发现 CALML3 在乳腺癌、胃癌、肝癌中作为抑癌基因, 在肿瘤组织中表达明显降低^[6]。CHEN 等^[6] 通过免疫组化检测发现, CALML3 在 LUAD 和 LUSC 中表达升高, 且能够作为有效鉴别区分 LUAD 和 LUSC 的免疫组化标志物。但 CALML3 mRNA 在肺癌组织的表达情况, 以及能否作为一个定量生物标志物有效区分 LUAD 和 LUSC 还有待研究。

本研究系统地对癌症基因组图谱 (TCGA) 数据库中 CALML3 测序数据进行综合分析, 探讨 CALML3 mRNA 在 LUAD 和 LUSC 中的表达水平、预后价值, 以明确 CALML3 作为区分 LUAD 和 LUSC 的候选标志物的可能。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2019 年 3—12 月在本院胸心外科接受根治性手术的肺癌患者, 年龄 42~72 岁, 中位年龄 56 岁, 收集患者相关资料如性别、年龄、吸烟情况、肿瘤分期、肿瘤亚型及淋巴结转移程度等。手术留取其癌组织及其癌旁正常组织标本 (距离肿瘤边缘 5 cm 以上)。纳入标准: 标本收集前患者均未接受过手术治疗、化疗或放疗, 且均通过病理学检查确诊为肺癌。排除标准: 多发肿瘤, 肿瘤原发病灶不能明确, 其他器官肿瘤转移至肺部者。最终选取 50 例 LUAD 患者和 50 例 LUSC 患者纳入研究。本研究获得本院医学伦理委员会批准, 且所有参与本研究患者均已签署知情同意书。

1.2 UALCAN 和 GEPIA 数据库差异表达基因分析 采用 UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu>) 和 GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/>) 数据库分析 TCGA 数据库中 LUAD 和 LUSC 实体瘤和相对于癌旁正常组织中差异基因的表达情况, 以改变倍数 $|\log_2FC| \geq 1$, $P < 0.05$ 为标准。

1.3 组织 RNA 的提取与实时荧光定量 PCR (qPCR) 扩增 采用 Trizol 提取试剂盒 (TaKaRa, 大连宝生物工程有限公) 提取组织 RNA, PrimeScriptTM RT II 反转录试剂盒 (TaKaRa, 大连宝生物工程有限公) 将 RNA 反转录为 cDNA。通过 Primer-blast 对 CALML3 和 GAPDH 进行在线引物设计。CALML3 正向: 5'-TGGATGAGCAGGGGATGAGA-3', 反向: 5'-GCTGCCAGCGTATCCATTTG-3'; GAPDH 正向: 5'-ACCCACTCCTCCACCTTTGAC-3', 反向: 5'-TGTTGCTGTAGCCAAATTCGTT-3'。引物序列由上海生工生物工程有限公合成。采用 SYBR[®] Premix Ex Taq II 试剂盒 (TaKaRa, 大连宝生物工程有限公) 进行 PCR 扩增, 反应总体积 20 μ L, 反应条件: 预变性 95 $^{\circ}$ C 30 s 后, 进行 40 个循环反应 (95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s)。应用 ABI 7500 Fast Real-time PCR 扩增仪检测每个扩增循环后 SYBR[®] Green 荧光信号水平, 运用溶解曲线检测扩增产物纯度。采用相对定量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的

方法计算 CALML3 mRNA 的相对表达水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件对数据进行处理和分析, 呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验, 不呈正态分布的计量资料以 $M(P_{25}, P_{95})$ 表示, 组间比较采用秩和检验; 采用 Pearson 相关分析 CALML3 与 LUSC、LUAD 患者生存情况的关系。采用 GraphPad Prism 5.0 对组间差异表达的 CALML3 进行图像绘制。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CALML3 在 LUAD 和 LUSC 中的表达情况 通过使用 UALCAN 数据库对 TCGA 数据进行统计分析, 发现 CALML3 在乳腺癌、肝癌、胰腺癌等多种类型的实体瘤中表达降低, 而在 LUAD、LUSC 及宫颈鳞状细胞癌等肿瘤中表达升高。CALML3 在 LUSC 组织中相对表达水平为 436.059 (105.149, 904.051), 明显高于癌旁正常组织 [0.447 (0.143, 0.810)], 约为癌旁正常组织的 975 倍 ($P < 0.05$), 见图 1A。CALML3 在 LUAD 组织中相对表达水平为 0.061 (0.000, 0.175), 是癌旁正常组织 [0.032 (0.000, 0.093)] 的 1.9 倍 ($P = 0.003$), 见图 1B。与相对应癌旁正常组织相比, CALML3 在 LUSC 中的改变倍数是在 LUAD 中的 7 149 倍。由于设定小于改变倍数阈值 ($|\log_2FC| \geq 1$), 即改变倍数 ≥ 2 具有差异, 而 CALML3 在 LUAD 组织中的相对表达水平仅为癌旁正常组织的 1.9 倍, 因此 CALML3 在 LUAD 组织中的相对表达水平相对于癌旁正常组织没有明显的改变。

为了进一步确认 CALML3 在 LUAD 和 LUSC 中的表达情况, 采用 GEPIA 对 TCGA 数据进行提取分析, 发现与癌旁正常组织相比, CALML3 在 LUSC 组织中表达明显升高, 而在 LUAD 组织中表达无明显差异, 与 UALCAN 分析结果一致, 见图 2。

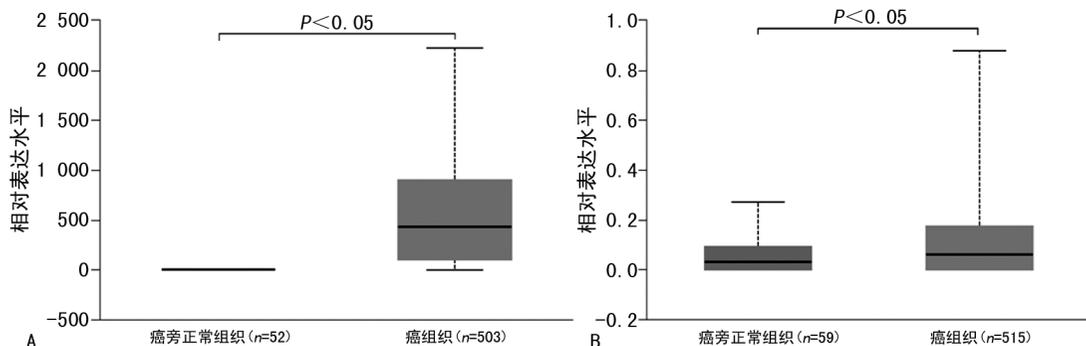
2.2 CALML3 与 LUSC、LUAD 的临床特征分析 LUSC 患者性别、年龄、吸烟情况、肿瘤分期及淋巴结转移程度对 CALML3 的相对表达水平没有影响 ($P > 0.05$)。CALML3 在 61~80 岁的 LUAD 患者中相对表达水平 [0.061 (0.000, 0.175)] 高于 21~40 岁的 LUAD 患者 [0.041 (0.036, 0.046)], 差异有统计学意义 ($P = 0.003$)。此外, LUAD 患者的淋巴结转移程度对 CALML3 的相对表达水平有影响 ($P < 0.05$), 然而肿瘤分期、性别和吸烟情况对 CALML3 的相对表达水平没有影响 ($P > 0.05$)。

2.3 CALML3 与 LUSC、LUAD 患者生存情况的相关性分析 CALML3 与 LUSC、LUAD 患者总体生存期 (OS) 和无病生存期 (DFS) 不具有相关性 ($P > 0.05$)。

2.4 CALML3 对 LUSC 和 LUAD 的鉴别作用 CALML3 在 LUSC 组织中的相对表达水平明显高于癌旁正常组织, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3A。CALML3 在 LUAD 组织中的相对表达水平高于癌旁正常组织, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图

3B。CALML3 在 LUAD 组织中的相对表达水平明

显低于 LUSC 组织(LUSC/LUAD=3.653)。



注:A 为 CALML3 在 LUSC 中的表达情况;B 为 CALML3 在 LUAD 中的表达情况。

图 1 CALML3 在 LUAD 和 LUSC 中的表达情况

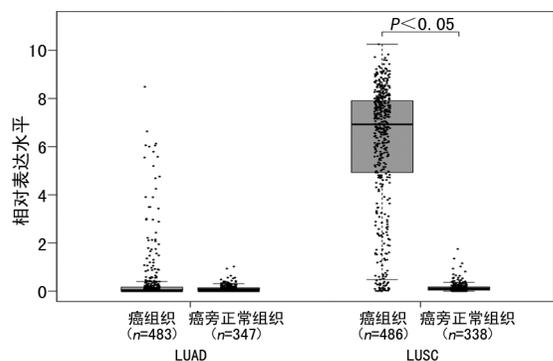
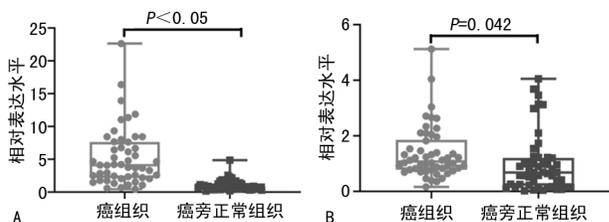


图 2 CALML3 在 LUAD 和 LUSC 中的表达情况



注:A 为 CALML3 在 LUSC 组织中的表达情况;B 为 CALML3 在 LUAD 组织中的表达情况。

图 3 CALML3 在 LUAD 和 LUSC 中的表达情况

2.5 CALML3 对 LUSC 和 LUAD 的诊断价值 以 LUAD 为对照, CALML3 诊断 LUSC 的受试者工作特征(ROC)曲线下面积(AUC)为 0.837, 95%CI: 0.753~0.922, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见图 4。当最佳临界值为 2.155 时, 其灵敏度为 0.720 (95%CI: 0.575~0.838), 特异度为 0.860 (95%CI: 0.733~0.942)。见图 4。

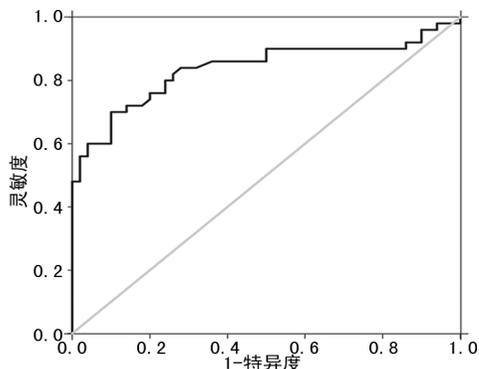


图 4 CALML3 鉴别诊断 LUSC 和 LUAD 的 ROC 曲线

3 讨 论

肺癌的主要病理类型为 LUAD 和 LUSC, 然而它们的分子生物学特征、治疗方法和治疗结果存在很大差异, 因为其靶向治疗取决于组织学的精准分型, 因此准确判断非小细胞肺癌患者的分型, 对患者靶向治疗方案的确定至关重要^[7]。

有研究发现, 桥粒芯蛋白 3 和桥粒胶连蛋白 3 为潜在的 LUSC 生物标志物^[7]。虽然其在鉴别诊断非小细胞肺癌上具有一定的优势, 但仍有许多确诊的肺癌病例对 LUAD 和 LUSC 标志物呈双阳性现象^[7]。因此, 寻找更为准确且能够完全有效区分 LUAD 和 LUSC 的分子诊断标志物, 对于 LUAD 和 LUSC 的鉴别和治疗尤为重要。

CALML3 是一种钙依赖性细胞黏附分子跨膜糖蛋白编码基因, 其作为肌球蛋白 10 的调节剂, 能够与肌球蛋白 10 竞争性结合, 对细胞黏附和运动起重要调控作用。CALML3 已被证实可作为乳腺癌、胃癌、肝细胞癌的新型生物标志物和治疗靶点^[6,8]。然而, CALML3 在肺癌中的表达情况知之甚少。为了明确 CALML3 在肿瘤中的表达情况, 本研究通过 UALCAN 和 GEPIA 两大数据库对 TCGA 数据提取分析, 发现 CALML3 在乳腺癌、肝癌、胰腺癌等肿瘤中表达降低, 而在 LUSC 及宫颈鳞状细胞癌等肿瘤中表达升高, 这说明 CALML3 在肺癌发生发展进程中起着癌基因的作用。

CALML3 与肿瘤的侵袭转移相关^[8]。CALML3 作为肝癌的抑制剂可在体外和体内抑制肝癌的癌变和转移进程的激活, 同时高表达的 CALML3 对肝癌生长和肺转移有明显的抑制作用^[8]。本研究对 CALML3 在 LUSC 和 LUAD 中的表达水平与临床特征进行分析, 发现 LUSC 患者的性别、年龄、吸烟情况、肿瘤分期及淋巴结转移程度对 CALML3 的相对表达水平没有影响, 而 LUAD 患者的年龄、淋巴结转移程度对 CALML3 的相对表达水平有影响。但其具体机制尚不清楚, 后续将深入探究。

CALML3 除了参与肿瘤侵袭转移进程外, 还与肿瘤预后明显相关。LIANG 等^[9]发现低表达的

CALML3 与 CALML3 甲基化及胃癌患者 OS 呈正相关。LI 等^[10]对基于 TCGA 的 RNA 测序和甲基化数据进行综合分析并建立肝癌预后风险模型,同样发现 CALML3 甲基化程度和表达水平与肝癌患者预后具有相关性。为了明确 CALML3 表达水平是否与肺癌患者预后具有相关性,本研究采用 GEPIA 数据库分析发现 CALML3 与 LUSC、LUAD 患者的 OS 和 DFS 不具有相关性。

CALML3 在 LUSC 和 LUAD 中的鉴别作用报道极少,且其在肺癌中的表达和功能更鲜为人知。ZHAN 等^[3]通过对 TCGA 数据库中的 RNA 测序数据进行分析发现,CALML3 在 LUSC 中表达水平改变倍数相当于 LUAD 的 71.17 倍,且 CALML3 鉴别 LUSC 和 LUAD 的 AUC 为 0.964。随后 ZHAN 等^[3]进一步通过免疫组化染色对 CALML3 进行分析发现,CALML3 在 LUSC 和 LUAD 中的表达分布明显不同,CALML3 鉴别 LUSC、LUAD 的灵敏度和特异度分别为 90%和 98%。为了进一步验证 CALML3 在 LUSC 和 LUAD 中的表达情况,以及 CALML3 对 LUSC 和 LUAD 的鉴别作用,本研究通过 qPCR 对 LUSC 和 LUAD 组织中的 CALML3 mRNA 进行检测发现,CALML3 在 LUSC 组织和 LUAD 组织中的相对表达水平高于其癌旁正常组织,且 CALML3 在 LUSC 组织中的相对表达水平改变倍数是 LUAD 组织的 3.653 倍。此外,本研究发现 CALML3 在 LUSC 中的 AUC 为 0.837,灵敏度为 0.720,特异度为 0.860,其能够作为鉴别 LUSC 和 LUAD 的潜在生物标志物。

综上所述,CALML3 可作为鉴别 LUSC 和 LUAD 的一个潜在的生物标志物,但其在肺癌中的表达、功能及临床实用价值有待进一步研究。后期也将继续研究 CALML3 在肺癌患者血液及其他体液中的潜在价值,以明确 CALML3 的实际临床应用,以及能否作为一个无创的生物标志物用于肺癌亚型的鉴别诊断。

参考文献

[1] FERLAY J, COLOMBET M, SOERJOMATARAM I, et

(上接第 3104 页)

[12] CLICK E S, KURBATOVA E V, ALEXANDER H, et al. Isoniazid-and rifampin-resistance mutations associated with resistance to second-line drugs and with sputum culture conversion[J]. *J Infect Dis*, 2020, 221(12): 2072-2082.

[13] ALLAHYARTORKAMAN M, MIRSAEIDI M, HAMZEHLOO G, et al. Low diagnostic accuracy of Xpert MTB/RIF assay for extrapulmonary tuberculosis: a multicenter surveillance[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 18515.

[14] JYOTHY A, VINOD H R, SHIVANAND I, et al. The UTILITY of CSF Xpert MTB/RIF in diagnosis of tubercu-

al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods[J]. *Int J Cancer*, 2019, 144(8): 1941-1953.

[2] 郑荣寿,孙可欣,张思维,等. 2015 年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. *中华肿瘤杂志*, 2019, 41(1): 19-28.

[3] ZHAN C, YAN L, WANG L, et al. Identification of immunohistochemical markers for distinguishing lung adenocarcinoma from squamous cell carcinoma[J]. *J Thorac Dis*, 2015, 7(8): 1398-1405.

[4] RELI V, TREROTOLA M, GUERRA E, et al. Abandoning the notion of non-small cell lung cancer[J]. *Trends Mol Med*, 2019, 25(7): 585-594.

[5] 魏杰,王志国,梁鑫,等. P63、NapsinA、CK7、TTF-1 联合 SCC-Ag 检测对于肺腺癌与鳞癌的鉴别诊断效能分析[J]. *标记免疫分析与临床*, 2018, 25(9): 1313-1317.

[6] CHEN G, YU C, TANG Z, et al. Metformin suppresses gastric cancer progression through calmodulin-like protein 3 secreted from tumor-associated fibroblasts[J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(1): 405-414.

[7] GALINDO I, GÓMEZ-MORALES M, DÍAZ-CANO I, et al. The value of desmosomal plaque-related markers to distinguish squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung[J]. *Ups J Med Sci*, 2020, 125(1): 19-29.

[8] YANG B, LI M, TANG W, et al. Dynamic network biomarker indicates pulmonary metastasis at the tipping point of hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 678.

[9] LIANG Y, ZHANG C, DAI D Q. Identification of DNA methylation-regulated differentially-expressed genes and related pathways using Illumina 450K BeadChip and bioinformatic analysis in gastric cancer[J]. *Pathol Res Pract*, 2019, 215(10): 152570.

[10] LI J, CHEN N, GONG X. Prognostic implications of aberrantly expressed methylation-driven genes in hepatocellular carcinoma: a study based on The Cancer Genome Atlas[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(6): 5304-5314.

(收稿日期: 2021-02-25 修回日期: 2021-06-09)

lar meningitis in children[J]. *Indian J Pediatr*, 2019, 86(12): 1089-1093.

[15] BAHR N C, NUWAGIRA E, EVANS E E, et al. Diagnostic accuracy of Xpert MTB/RIF ultra for tuberculous meningitis in HIV-infected adults: a prospective cohort study[J]. *Lancet Infect Dis*, 2018, 18(1): 68-75.

[16] GUMMA V, DEGRUY K, BENNETT D, et al. Impact of external quality assurance on the quality of Xpert MTB/RIF testing in Viet Nam[J]. *J Clin Microbiol*, 2019, 57(3): e01669-18.

(收稿日期: 2021-02-18 修回日期: 2021-06-09)