

[文章编号] 1671-587X(2025)06-1638-08

DOI:10.13481/j.1671-587X.20250619

## ANO1和E-钙黏蛋白在人原发性结直肠癌组织中的表达及其意义

吴飞<sup>1</sup>, 杨麒巍<sup>2</sup>, 李馨<sup>2</sup>, 赵林先<sup>3</sup>, 隋玉杰<sup>2</sup>

(1. 吉林大学第二医院妇产科, 吉林 长春 130041; 2. 吉林大学第二医院医学研究中心 吉林省重大疾病分子与化学遗传学重点实验室, 吉林 长春 130041; 3. 吉林大学第二医院普通外科, 吉林 长春 130041)

**[摘要]** **目的:** 探讨钙激活氯通道蛋白1 (ANO1) 和E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 在结直肠癌 (CRC) 组织中的表达及其与CRC患者临床病理特征的关系, 并阐明其临床意义。**方法:** 收集原发性CRC患者的手术组织样本77例。采用免疫组织化学 (IHC) 法检测CRC组织中ANO1和E-cadherin蛋白表达情况, 采用Spearman相关分析法分析二者表达的相关性, 采用PCR荧光探针法检测CRC组织中KRAS/NRAS突变情况, 采用卡方检验或Fisher确切概率法分析ANO1和E-cadherin表达与CRC患者临床病理特征的关系。**结果:** IHC法检测, CRC组织中ANO1阳性表达率为24.7%, E-cadherin阳性表达率为63.6%。Spearman法分析, CRC组织中ANO1与E-cadherin表达呈正相关关系 ( $r=0.458$ ,  $P<0.05$ )。肿瘤部位在结肠的CRC患者癌组织中ANO1阳性表达率明显高于肿瘤部位在直肠的患者 ( $\chi^2=5.499$ ,  $P=0.019$ ); TNM分期I-II期CRC患者癌组织中ANO1阳性表达率明显高于III-IV期的患者 ( $\chi^2=4.774$ ,  $P=0.029$ ); 无淋巴结转移的CRC患者ANO1阳性表达率明显高于有淋巴结转移的患者 ( $P=0.034$ )。T1-T3期CRC患者E-cadherin阳性表达率明显高于T4期的CRC患者 ( $P=0.024$ )。p53阴性、Ki-67 $<90\%$ 、PMS2阴性和KRAS突变型的CRC患者癌组织中ANO1阳性表达率明显高于p53阳性、Ki-67 $\geq 90\%$ 、PMS2阳性和KRAS野生型的CRC患者 ( $P=0.031$ ,  $P=0.036$ ,  $P=0.048$ ,  $P=0.028$ )。**结论:** 患者原发性CRC组织中ANO1与E-cadherin表达呈正相关关系, ANO1及E-cadherin与患者多个临床病理特征存在关联性, ANO1和E-cadherin可能参与CRC的发生和进展过程。

**[关键词]** 结直肠癌; 氯通道蛋白1; E-钙黏蛋白; 免疫组织化学; 临床病理特征

**[中图分类号]** R735.3 **[文献标志码]** A

## Expressions of ANO1 and E-cadherin in human primary colorectal cancer tissue and their significances

WU Fei<sup>1</sup>, YANG Qiwei<sup>2</sup>, LI Xin<sup>2</sup>, ZHAO Linxian<sup>3</sup>, SUI Yujie<sup>2</sup>

(1. Department of Gynecology and Obstetrics, Second Hospital, Jilin University, Changchun 130041, China; 2. Key Laboratory for Molecular and Chemical Genetics of Critical Human Diseases of Jilin Province, Medical Research Center, Second Hospital, Jilin University, Changchun 130041, China; 3. Department of General Surgery, Second Hospital, Jilin University, Changchun 130041, China)

**ABSTRACT Objective:** To explore the expressions of calcium-activated chloride channel protein 1 (ANO1)

[收稿日期] 2024-11-13 [录用日期] 2025-01-09

[基金项目] 吉林省科技厅自然科学基金项目 (YDZJ202201ZYTS026); 吉林省教育厅科技项目 (JJKH20231220KJ)

[作者简介] 吴飞 (1977-), 女, 辽宁省凌源市人, 副主任医师, 医学博士, 主要从事肿瘤侵袭和转移方面的研究。

[通信作者] 隋玉杰, 主任技师 (E-mail: suiyj@jlu.edu.cn)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

and E-cadherin in colorectal cancer (CRC) tissue and their relationships with the clinicopathological characteristics of the CRC patients, and to clarify their clinical significances. **Methods:** The surgical tissue specimens from 77 patients with primary CRC were collected. Immunohistochemistry (IHC) method was used to detect the protein expressions of ANO1 and E-cadherin in CRC tissue; Spearman correlation analysis method was used to analyze the correlation between their expressions; PCR fluorescence probe method was used to detect the *KRAS/NRAS* mutations in CRC tissue; chi-square test or Fisher's exact probability method was used to analyze the relationships between the expressions of ANO1 and E-cadherin and clinicopathological characteristics of the CRC patients. **Results:** The IHC results showed that the positive expression rate of ANO1 in CRC tissue was 24.7%, and the positive expression rate of E-cadherin was 63.6%. The Spearman analysis results showed that the expressions of ANO1 and E-cadherin in CRC tissue were positively correlated ( $r=0.458$ ,  $P<0.05$ ). Compared with the patients with tumor located in rectum, the positive expression rate of ANO1 in cancer tissue of the CRC patients with tumor located in colon was significantly increased ( $\chi^2=5.499$ ,  $P=0.019$ ); compared with the patients with TNM stage III-IV, the positive expression rate of ANO1 in cancer tissue of the CRC patients with TNM stage I-II was significantly increased ( $\chi^2=4.774$ ,  $P=0.029$ ); compared with the patients with lymphnode metastasis, the positive expression rate of ANO1 in the CRC patients without lymphnode metastasis was significantly increased ( $P=0.034$ ). Compared with the CRC patients with T4 stage, the positive expression rate of E-cadherin in the CRC patients with T1-T3 stage was significantly increased ( $P=0.024$ ). Compared with the CRC patients with p53 positive, Ki-67 $\geq 90\%$ , PMS2 positive and *KRAS* wild-type, the positive expression rate of ANO1 in cancer tissue of the CRC patients with p53 negative, Ki-67 $<90\%$ , PMS2 negative and *KRAS* mutant was significantly increased ( $P=0.031$ ,  $P=0.036$ ,  $P=0.048$ ,  $P=0.028$ ). **Conclusion:** The expressions of ANO1 and E-cadherin in primary CRC tissue of the patients are positively correlated; ANO1 and E-cadherin are associated with multiple clinicopathological characteristics of the patients; ANO1 and E-cadherin may be involved in the occurrence and progression of CRC.

**KEYWORDS** Colorectal cancer; Anoctamin 1; E-cadherin; Immunohistochemistry; Clinicopathological characteristics

近年来,随着人们的生活方式和饮食习惯的改变,我国结直肠癌(colorectal cancer, CRC)的发病率和死亡率均呈上升趋势。据2024年国家癌症中心数据<sup>[1]</sup>显示:2020年中国CRC新发病例为56万,死亡病例为29万。尽管手术和化疗等综合治疗取得了重大进展,但由于缺少有效的早期诊断和预后指标,CRC患者的生存率并不理想<sup>[2]</sup>。因此探讨潜在的CRC生物标志物对于提高患者的生存率有重要意义。钙激活氯通道蛋白1(anoctamin 1, ANO1),又称为跨膜蛋白16A(transmembrane protein 16A, TMEM16A),是近年发现的钙激活氯离子通道的分子组分,在多种病理生理过程中发挥重要作用<sup>[3-5]</sup>。既往研究<sup>[6-8]</sup>表明:ANO1在乳腺癌、胃肠道间质瘤、头颈部鳞状细胞癌、肺癌和食管鳞癌等多种恶性肿瘤组织中高表达,而且与肿瘤的发生发展密切相关。E-钙黏蛋白(E-cadherin)是一种钙依赖性的细胞间黏附分

子,在维持上皮细胞之间的稳定性和细胞极性方面发挥重要作用<sup>[9]</sup>。研究<sup>[10]</sup>显示:E-cadherin是上皮间质转化的标志蛋白,其下调与肿瘤细胞的浸润、转移及预后密切相关。ANO1和E-cadherin均为钙依赖的跨膜糖蛋白,但二者在CRC中的表达相关性及其临床意义目前尚不明确。本研究通过检测原发性CRC组织中ANO1和E-cadherin蛋白表达情况,分析二者表达的相关性及其与患者临床病理特征的关系,探讨其内在联系及其在CRC发生发展过程中的作用,为寻找CRC潜在的诊断和预后标志物及有效的治疗靶点提供理论依据。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取2016年6月—2023年6月于吉林大学第二医院确诊的77例原发性CRC患者手术样本。纳入标准:①均符合原发性CRC诊断标准<sup>[11]</sup>;②均接受了原发CRC切除术;③入院前均

未接受辅助治疗;④临床资料完整。排除标准:①意识障碍者;②自身免疫性疾病者;③已经接受过化疗或放疗者;④伴有影响本次研究检测指标疾病者。通过查阅病历和病理报告收集CRC患者临床病理特征参数(手术时年龄、性别、肿瘤部位、组织类型、分化程度、TNM分期、T分期及淋巴结转移)和免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)标志物特征。IHC标志物包括p53、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、Ki-67、分化集群34(cluster of differentiation 34, CD34)分子、尾部同源框蛋白2(caudal type homeobox 2, CDX2)、PMS1同源蛋白2(PMS1 homolog 2, PMS2)、mutL同源物1(mutL homolog 1, MLH1)、mutS同源物2(mutS homolog 2, MSH2)和mutS同源物6(mutS homolog 6, MSH6)。本研究已通过本院伦理委员会批准[审批号:(2018年)研审第(169)号]。

**1.2 主要试剂和仪器** IHC PV-9000通用型二步法检测试剂盒和小鼠抗人ANO1/DOG1多克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司,兔抗人E-cadherin多克隆抗体购自江苏亲科生物研究中心有限公司,4%多聚甲醛组织固定液购自北京兰杰柯科技有限公司,TIANamp基因组DNA提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司,人类KRAS基因7种突变检测试剂盒(PCR荧光探针法,国械注准20173401254)和人类NRAS基因6种突变检测试剂盒(PCR荧光探针法,国械注准20163401331)购自武汉友之友医疗科技股份有限公司。普通光学显微镜(型号:BX51)购自日本Olympus公司,荧光定量PCR(型号:7500 Fast Dx)购自美国应用生物系统有限公司。

**1.3 IHC法检测CRC组织中ANO1和E-cadherin蛋白表达情况**所有的组织标本均采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连结(streptavidin-peroxidase, SP)法,即两步法。4%多聚甲醛常规固定,石蜡包埋,连续切片,切割厚度为4~5  $\mu\text{m}$ ,切片经二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水至水化,然后缓冲液冲洗3次。将切片浸于pH 9.0 EDTA抗原修复缓冲液中高温修复20 min,室温冷却,然后用血清封闭非特异性抗原,室温放置10 min,滴加适量一抗(1:100)后4  $^{\circ}\text{C}$ 过夜,采用PV-9000试剂盒法,应用DAB显色,苏木素染色后脱水,透明,封片。以磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)

代替一抗作为阴性对照,胃肠道间质瘤组织作为阳性对照。用光学显微镜观察组织切片,染色强度由2名有经验的病理学医生在单盲的情况下IHC检查结果进行评价,每张切片400倍显微镜下随机选取5个视野,并采用以下评分系统评分<sup>[12]</sup>:阳性细胞百分率 $\leq 5\%$ 、 $5\% <$ 阳性细胞百分率 $\leq 25\%$ 、 $25\% <$ 阳性细胞百分率 $\leq 50\%$ 、 $50\% <$ 阳性细胞百分率 $\leq 75\%$ 、阳性细胞百分率 $> 75\%$ ,分别判定为0、1、2、3和4分。细胞染色强度评分:细胞强度为无染色、轻度染色(浅黄色)、中度染色(黄棕色)和重度染色(棕色),分别判定为0、1、2和3分。使用综合评分系统对IHC进行评分:总分=阳性细胞占比评分 $\times$ 细胞染色强度评分。总分为0分、1~4分、5~8分和9~12分被视为阴性、弱阳性(低度表达)、阳性(中度表达)和强阳性(高度表达)。胃肠道间质瘤组织染色作为ANO1阳性对照。

**1.4 PCR荧光探针法检测CRC组织KRAS/NRAS基因突变**按照TIANamp基因组DNA提取试剂盒说明书操作,从手术切除的新鲜固体肿瘤组织中提取基因组DNA。按照人类KRAS基因7种突变检测试剂盒说明书检测DNA样本中KRAS基因2号外显子的12号密码子和13号密码子的7种常见突变(12CYS、12SER、12ARG、12VAL、12ASP、12ALA及13ASP)。按照人类NRAS基因6种突变检测试剂盒说明书检测DNA样本中NRAS基因2号外显子的12号密码子和13号密码子、3号外显子的59号密码子和61号密码子、4号外显子的密码子117号密码子和146号密码子的6种常见突变(G12、G13、A59、Q61、K117及A146)。具体步骤:配制含有双荧光探针引物和聚合酶的PCR反应混合液,每孔23  $\mu\text{L}$ 分装至PCR反应管中,然后加入待测样本的基因组DNA,每孔2  $\mu\text{L}$ ,DNA浓度为20  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。最后使用荧光定量PCR仪进行PCR扩增,PCR反应条件:37  $^{\circ}\text{C}$ 、10 min;95  $^{\circ}\text{C}$ 、5 min;95  $^{\circ}\text{C}$ 、15 s,60  $^{\circ}\text{C}$ 、60 s,40个循环。KRAS突变判断标准:12CYS、12ARG、12ASP、12ALA和13ASP突变类型,需同时满足Ct值 $< 38$ 且 $\Delta\text{Ct} < 7$ ,才可判读为阳性;而12SER和12VAL突变类型,需同时满足Ct值 $< 38$ 且 $\Delta\text{Ct} < 8$ ,才可判定为阳性,其余情况均为阴性。NRAS突变判断标准:G12、G13和K117突变类型,需同时满足Ct $\leq 38$ 且 $\Delta\text{Ct} < 8$ ,才能判定为阳性;A59、Q61和

A146突变类型, 需同时满足  $Ct \leq 38$  且  $\Delta Ct < 9$ , 才能判定为阳性, 其余情况均为阴性。  $\Delta Ct =$  样本突变PCR反应液管Ct值 - 样本对应质控PCR反应液管Ct值。

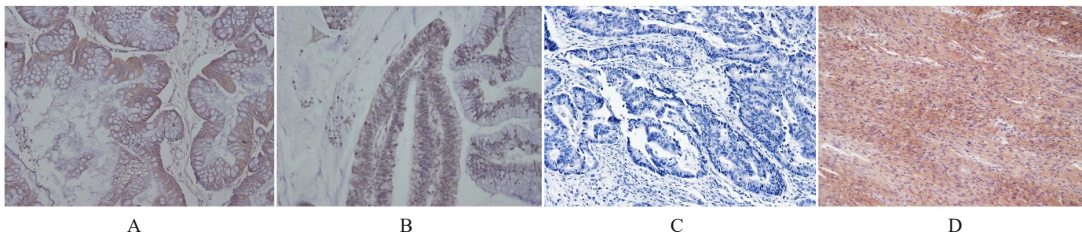
**1.5 统计学分析** 采用GraphPad Prism 8.0软件和SPSS 26.0软件进行统计学分析。ANO1与E-cadherin蛋白表达的相关性采用Spearman等级相关分析; 患者例数等计数资料均以  $n(\%)$  表示; 患者的不同临床病理参数(手术时年龄、性别、TNM分期、分化程度、肿瘤部位、淋巴结转移和组织类型)、不同IHC特征(p53、EGFR、Ki-67、CD34、CDX2、PMS2、MLH1、MSH2和MSH6)及不同KRAS/NRAS基因突变情况的ANO1和E-cadherin阳性表达率组间比较采用 $\chi^2$ 检验; 当样本量 $<40$ 且理论频数 $<5$ 或任何格子的理论频数 $<1$ 时, 采用Fisher确切概率检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计

学意义。

## 2 结果

### 2.1 CRC组织中ANO1和E-cadherin阳性表达率

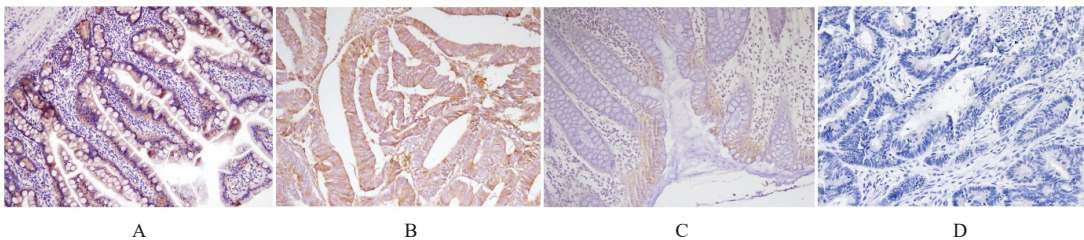
ANO1阳性表达定位于细胞膜和细胞质, 77例CRC组织标本中有19例ANO1阳性表达, 阳性表达率为24.7%, 其中低度表达17例, 中度表达2例, 低、中度表达阳性率分别为22.1%和2.6%, 未发现ANO1高度表达病例。E-cadherin阳性表达定位于细胞膜, 77例CRC组织标本中有49例E-cadherin阳性表达, 阳性表达率为63.6%, 其中低度表达15例, 中度表达15例, 高度表达19例, 低、中和高度表达阳性率分别为19.5%、19.5%及24.6%。Spearman相关分析结果显示: CRC组织中ANO1蛋白表达与E-cadherin蛋白表达呈正相关关系( $r = 0.458$ ,  $P < 0.01$ )。见图1和2。



A: Medium expression of ANO1; B: Low expression of ANO1; C: Negative staining for ANO1; D: Positive staining for ANO1 of gastrointestinal stromal tumor tissue.

图1 IHC法检测人CRC组织中ANO1蛋白表达情况( $\times 200$ )

Fig.1 Expression of ANO1 in human CRC tissue detected by IHC method( $\times 200$ )



A: High expression of E-cadherin; B: Medium expression of E-cadherin; C: Low expression of E-cadherin; D: Negative staining for E-cadherin.

图2 IHC法检测人CRC组织中E-cadherin蛋白表达情况( $\times 200$ )

Fig.2 Expression of E-cadherin in human CRC tissue detected by IHC method( $\times 200$ )

**2.2 不同临床病理特征CRC患者癌组织中ANO1和E-cadherin阳性表达率** 与肿瘤位于直肠的CRC患者比较, 肿瘤位于结肠的CRC患者癌组织中ANO1阳性表达率升高, 差异有统计学意义( $\chi^2 = 5.499$ ,  $P = 0.019$ ); 与TNM分期I - II期的CRC

患者比较, III - IV期的CRC患者癌组织中ANO1阳性表达率降低, 差异有统计学意义( $\chi^2 = 4.774$ ,  $P = 0.029$ ); 不同淋巴转移情况CRC患者ANO1阳性表达率比较差异有统计学意义( $P = 0.034$ ), 无淋巴结转移CRC患者癌组织中ANO1阳性表达率

为35.0%，淋巴结转移N1期CRC患者癌组织中ANO1阳性表达率为15.7%，淋巴结转移N2期CRC患者癌组织中ANO1阳性表达率为11.1%；但ANO1阳性表达率与CRC患者的年龄、性别、组织类型、分化程度和原发肿瘤侵犯深度无相关

性 ( $P>0.05$ )。不同肿瘤浸润程度的CRC患者E-cadherin阳性表达率比较差异有统计学意义 ( $P=0.024$ )，而E-cadherin阳性表达率与CRC患者的年龄、性别、肿瘤部位、组织类型、分化程度、TNM分期和淋巴结转移无明显关联 ( $P>0.05$ )。见表1。

表1 不同临床病理特征CRC患者癌组织中ANO1和E-cadherin阳性表达率

Tab. 1 Positive expression rates of ANO1 and E-cadherin in cancer tissue of CRC patients with different clinicopathological characteristics

Clinicopathological characteristic	Total case	ANO1 positive			E-cadherin positive		
		Number [n(η/%)]	$\chi^2$	P	Number [n(η/%)]	$\chi^2$	P
Age (year)							
<60	32	6(18.8)	1.034	0.309 <sup>a</sup>	20(62.5)	0.031	0.861 <sup>a</sup>
≥60	45	13(28.9)			29(64.4)		
Gender							
Male	52	13(25.0)	0.009	0.924 <sup>a</sup>	35(67.3)	0.933	0.334 <sup>a</sup>
Female	25	6(24.0)			14(56.0)		
Tumor location							
Colon	31	12(38.7)	5.499	0.019 <sup>a</sup>	21(67.7)	0.378	0.539 <sup>a</sup>
Rectum	46	7(15.2)			28(60.9)		
Histological type							
Adenocarcinoma	66	18(27.3)	—	0.275 <sup>b</sup>	42(63.6)	<0.01	>0.999 <sup>a</sup>
Non-Adenocarcinoma	11	1(9.0)			7(63.6)		
Differentiation							
Well+Medium	60	15(25.0)	—	>0.999 <sup>b</sup>	38(63.3)	0.010	0.917 <sup>a</sup>
Poor	17	4(23.5)			11(64.7)		
TNM stage							
I+II	40	14(35.0)	4.774	0.029 <sup>a</sup>	27(67.5)	0.537	0.464 <sup>a</sup>
III+IV	37	5(13.5)			22(59.4)		
T stage							
T1-T3	69	18(26.1)	—	0.671 <sup>b</sup>	47(68.1)	—	0.024 <sup>b</sup>
T4	8	1(12.5)			2(25.0)		
Lymphnode							
N0	40	14(35.0)	—	0.034 <sup>b</sup>	27(67.5)	1.324	0.516 <sup>a</sup>
N1	19	3(15.7)			10(52.6)		
N2	18	2(11.1)			12(66.7)		

a: Chi-square test; b: Fisher's exact test. "—": No data.

**2.3 不同IHC特征CRC患者癌组织中ANO1和E-cadherin阳性表达率** 与p53阴性的CRC患者比较，p53阳性CRC患者癌组织中ANO1阳性表达率明显降低 ( $\chi^2=4.677$ ,  $P=0.031$ )。与Ki-67<90%的CRC患者比较，Ki-67≥90%的CRC患者癌组织中ANO1阳性表达率明显降低 ( $P=0.036$ )。与PMS2阳性CRC患者比较，PMS2阴性CRC患者癌组织中ANO1阳性表达率明显升高 ( $P=0.048$ )。

CRC患者癌组织中ANO1蛋白表达与EGFR、CD34、CDX2、MLH1、MSH2和MSH6蛋白表达均无明显关联 ( $P>0.05$ )。CRC患者癌组织中E-cadherin蛋白阳性表达率与p53、EGFR、Ki-67、CD34、CDX2、PMS2、MLH1、MSH2和MSH6蛋白表达均无明显关联 ( $P>0.05$ )。见表2。

**2.4 不同KRAS/NRAS基因突变状态CRC患者癌组织中ANO1和E-cadherin阳性表达率** 与KRAS野

生型CRC患者比较, *KRAS*突变型CRC患者癌组织中ANO1阳性表达率明显升高 ( $\chi^2=4.845$ ,  $P=0.028$ ), ANO1蛋白阳性表达率与*NRAS*基因突变

无明显关联 ( $P>0.05$ )。E-cadherin蛋白阳性表达率与*KRAS*和*NRAS*基因突变均无明显关联 ( $P>0.05$ )。见表3。

表2 不同IHC特征CRC患者癌组织中ANO1和E-cadherin阳性表达率

Tab. 2 Positive expression rates of ANO1 and E-cadherin in cancer tissue of CRC patients with different IHC features

IHC feature	Total case	ANO1 positive			E-cadherin positive		
		Number [n( $\eta$ /%)]	$\chi^2$	P	Number [n( $\eta$ /%)]	$\chi^2$	P
p53							
Positive	52	9(17.3)	4.677	0.031 <sup>a</sup>	30(57.7)	2.445	0.118 <sup>a</sup>
Negative	25	10(40.0)			19(76.0)		
EGFR							
Positive	55	12(21.8)	0.968	0.325 <sup>a</sup>	37(67.3)	1.736	0.188 <sup>a</sup>
Negative	18	6(33.3)			9(50.0)		
Ki67							
$\geq 90\%$	32	4(12.5)	—	0.036 <sup>b</sup>	18(56.3)	1.632	0.201 <sup>a</sup>
$< 90\%$	44	15(34.1)	—		31(70.5)		
CD34							
Positive	22	4(18.2)	—	0.123 <sup>b</sup>	12(54.5)	2.975	0.085 <sup>a</sup>
Negative	27	11(40.7)	—		21(77.8)		
CDX2							
Positive	73	19(26.0)	—	0.569 <sup>b</sup>	46(63.0)	1.721	0.190 <sup>b</sup>
Partially positive	3	0(0.0)	—		3(100.0)		
PMS2							
Positive	71	16(24.2)	—	0.048 <sup>b</sup>	45(63.4)	—	$>0.999^b$
Negative	4	3(75.0)	—		3(75.0)		
MLH1							
Positive	66	16(26.7)	—	0.684 <sup>b</sup>	42(63.6)	0.031	0.859 <sup>b</sup>
Negative	9	3(33.3)	—		6(66.7)		
MSH2							
Positive	73	17(23.3)	—	0.061 <sup>b</sup>	46(63.0)	—	0.533 <sup>b</sup>
Partially positive	2	2(100.0)	—		2(100.0)		
MSH6							
Positive	66	16(24.2)	—	0.684 <sup>b</sup>	42(63.6)	—	$>0.999^b$
Negative	9	3(33.3)	—		6(66.7)		

a: Chi-square test; b: Fisher's exact test. "—": No data.

表3 不同*KRAS/NRAS*突变CRC患者癌组织中ANO1和E-cadherin蛋白阳性表达率

Tab. 3 Positive expression rates of ANO1 and E-cadherin in cancer tissue of CRC patients with different *KRAS/NRAS* mutation

Gene mutation	Item	n	ANO1 positive			E-cadherin positive		
			Number [n( $\eta$ /%)]	$\chi^2$	P	Number [n( $\eta$ /%)]	$\chi^2$	P
<i>KRAS</i> (codon 12/13)	Mutant type	32	12(37.5)	4.845	0.028 <sup>a</sup>	20(62.5)	0.031	0.861 <sup>a</sup>
	Wild type	45	7(15.6)			29(64.4)		
<i>NRAS</i> (codon12/13 /59/61/117/46)	Mutant type	3	1(33.3)	—	$>0.999^b$	3(100.0)	—	0.297 <sup>b</sup>
	Wild type	74	18(24.3)			46(62.2)		

a: Chi-square test; b: Fisher's exact test. "—": No data.

### 3 讨论

CRC是全球较常见和危害性较大的恶性肿瘤之一,其发生发展与多基因发生突变或表达异常密切相关<sup>[13]</sup>。CRC标志物对CRC的早期筛查、预后评估及个体化治疗疗效判断等都具有重要意义。由于肿瘤具有异质性,CRC患者个体差异较大,单一的肿瘤标志物往往难以评估和预测CRC的进展和预后。因此,寻找有效的预测CRC发生发展和预后评估的新型标志物具有重要的临床意义。

ANO1基因定位于染色体11q13.3,该区段是人类肿瘤及相关不良预后发生中最常见的扩增染色体区段之一。既往研究<sup>[14-16]</sup>表明:ANO1在头颈部鳞状细胞癌、乳腺癌、胰腺癌和前列腺癌等多种恶性肿瘤组织中过度表达,并且在肿瘤的发生发展过程中发挥一定作用。本研究结果显示:ANO1在CRC组织中阳性表达率较低(24.7%),并且大部分为低度表达(22.1%)。ANO1主要定位于肿瘤细胞的细胞膜和细胞质,与ANO1在其他肿瘤细胞中的表达定位一致<sup>[15-17]</sup>。ANO1在肿瘤组织中表达上调,但关于ANO1表达与肿瘤分化程度、淋巴结转移和患者预后等关系的研究结果却存在差异。OKUYAMA等<sup>[6]</sup>报道:ANO1在头颈部鳞状细胞癌的过表达不仅与肿瘤分级、转移、低生存率和预后不良有关,还与铂类化疗后的临床结果恶化有关。CHEN等<sup>[15]</sup>发现:ANO1在乳腺癌的过表达与患者的淋巴结转移和预后相关。JANSEN等<sup>[17]</sup>通过大规模研究发现:ANO1在很多类型肿瘤(乳腺癌、膀胱癌、卵巢癌、子宫内膜癌、胃癌和甲状腺癌)中高表达,但ANO1阳性与肿瘤分期、淋巴结转移及组织学分级无关,与乳腺癌患者的预后也无关。本研究结果显示:ANO1蛋白表达与肿瘤位置、TNM分期及淋巴结转移存在明显关联,在TNM分期晚、有淋巴结转移的CRC患者癌组织中ANO1阳性表达率明显降低,提示ANO1蛋白可能参与了CRC的发生发展的早期阶段。IHC标志物的检测对判断肿瘤来源、类型、恶性程度、预后及耐药都提供了重要价值<sup>[18-20]</sup>。关于ANO1蛋白表达与结直肠癌IHC标志物的相关性研究国内外鲜有报道。本研究结果显示:ANO1蛋白表达与p53、Ki67、PMS2及KRAS突变状态存在关联,在p53阴性、Ki-67<90%、PMS2阴性和KRAS突变的CRC患者癌组织中ANO1阳性表达率明显升高,提示ANO1可能参与了CRC的发生和进展。ANO1与p53、

Ki67、PMS2及KRAS突变状态的联合检测对CRC的早期诊断、临床治疗指导及预后评估具有一定的参考意义。

E-cadherin是钙依赖性黏附分子,属于钙黏蛋白超家族,由位于染色体16q22.1上的钙黏蛋白1(cadherin 1, CDH1)基因编码<sup>[21]</sup>。既往文献<sup>[9]</sup>报道:E-cadherin在正常组织细胞中保持高水平表达,从而保持细胞之间的黏附功能;组织细胞中E-cadherin蛋白表达水平降低导致上皮细胞之间的黏附性降低,癌细胞就可脱离原发灶而发生侵袭和转移。E-cadherin蛋白的完整性是上皮极化和分化过程的基础,E-cadherin功能丧失经常与各种癌症患者的预后不良和生存率有关,但E-cadherin在CRC中的价值目前仍无统一定论<sup>[22-23]</sup>。左汪洋等<sup>[24]</sup>发现:E-cadherin与浸润深度和淋巴结转移等临床病理参数有关,在CRC的发生发展过程中参与侵袭和转移的生物学行为,可作为判断预后的标志物。本研究结果表明:E-cadherin蛋白表达与CRC的浸润程度明显关联,浸润程度深的CRC患者E-cadherin阳性表达率更低,提示E-cadherin表达可能与CRC进展密切相关。但本研究未发现E-cadherin蛋白表达与CRC患者分化程度、TNM分期和淋巴结转移有关。本实验结果与其他文献<sup>[25]</sup>报道的研究结果有所差异,可能与病例的选取、样本量、试剂及IHC检测方法等多种因素的差异有关。

综上所述,ANO1和E-cadherin蛋白在CRC中的表达存在临床相关性,均在CRC的发生发展过程中发挥一定作用。ANO1蛋白表达与CRC患者的肿瘤位置、TNM分期、淋巴结转移、p53、Ki-67、PMS2及KRAS突变密切相关,提示ANO1可能在CRC的早期诊断、预后评估和靶向用药方面具有潜在的应用价值。

#### 利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

#### 作者贡献声明:

吴飞参与研究设计、数据分析和论文撰写,杨麒麟参与论文数据整理和论文撰写,李馨参与实验过程和数据整理,赵林先参与样本采集和实验过程,隋玉杰参与研究设计、实验过程、数据分析和论文审核。

#### [参考文献]

- [1] ZHENG R S, CHEN R, HAN B F, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2022 [J]. Zhonghua

- Zhong Liu Za Zhi, 2024, 46(3): 221-231.
- [2] SHIN A E, GIANCOTTI F G, RUSTGI A K. Metastatic colorectal cancer: mechanisms and emerging therapeutics[J]. Trends Pharmacol Sci, 2023, 44(4): 222-236.
- [3] JIANG F L, JIA K R, CHEN Y, et al. ANO1-mediated inhibition of cancer ferroptosis confers immunotherapeutic resistance through recruiting cancer-associated fibroblasts[J]. Adv Sci, 2023, 10(24): 2300881.
- [4] AL-HOSNI R, ILKAN Z, AGOSTINELLI E, et al. The pharmacology of the TMEM16A channel: therapeutic opportunities [J]. Trends Pharmacol Sci, 2022, 43(9): 712-725.
- [5] TAMMARO P. The TMEM16A anion channel as a versatile regulator of vascular tone[J]. Sci Signal, 2023, 16(811): eadk5661.
- [6] OKUYAMA K, YANAMOTO S. TMEM16A as a potential treatment target for head and neck cancer[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2022, 41(1): 196.
- [7] LI S T, WANG Z C, GENG R L, et al. TMEM16A ion channel: a novel target for cancer treatment[J]. Life Sci, 2023, 331: 122034.
- [8] DENG C M, ZHANG G G, LIU Q W, et al. ANO1 reprograms cholesterol metabolism and the tumor microenvironment to promote cancer metastasis [J]. Cancer Res, 2023, 83(11): 1851-1865.
- [9] CORSO G, FIGUEIREDO J, DE ANGELIS S P, et al. E-cadherin deregulation in breast cancer[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(11): 5930-5936.
- [10] KIELBIK M, SZULC-KIELBIK I, KLINK M. E-cadherin expression in relation to clinicopathological parameters and survival of patients with epithelial ovarian cancer[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(22): 14383.
- [11] 龙 明, 张松峰. 外科学[M]. 8版. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 387-394.
- [12] 郭超杰, 张佳佳, 曾 洁, 等. PLOD1在口腔鳞状细胞癌组织和细胞中的表达及其意义[J]. 吉林大学学报(医学版), 2024, 50(4): 1035-1043.
- [13] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2020[J]. CA A Cancer J Clin, 2020, 70(1): 7-30.
- [14] ZHANG G N, SHU Z H, YU J, et al. High ANO1 expression is a prognostic factor and correlated with an immunosuppressive tumor microenvironment in pancreatic cancer [J]. Front Immunol, 2024, 15: 1341209.
- [15] CHEN W J, GU M, GAO C B, et al. The prognostic value and mechanisms of TMEM16A in human cancer[J]. Front Mol Biosci, 2021, 8: 542156.
- [16] 刘 军, 汪 玲, 姜钰环, 等. 免疫原性细胞死亡基因风险模型的建立及其对肝细胞癌预后和肿瘤微环境特征的预测价值[J]. 临床肝胆病杂志, 2024, 40(12): 2473-2483.
- [17] JANSEN K, FARAHI N, BÜSCHECK F, et al. DOG1 expression is common in human tumors: a tissue microarray study on more than 15, 000 tissue samples[J]. Pathol Res Pract, 2021, 228: 153663.
- [18] 中国临床肿瘤学会(CSCO)结直肠癌专家委员会. 结直肠癌分子标志物临床检测中国专家共识[J]. 中华胃肠外科杂志, 2021, 24(3): 191-197.
- [19] YUAN C F, HUANG J N, WANG Y Z, et al. Exploration and validation of the Ki67, Her-2, and mutant P53 protein-based risk model, nomogram and lymph node metastasis model for predicting colorectal cancer progression and prognosis [J]. Front Oncol, 2023, 13: 1236441.
- [20] ZHU G M, PEI L J, XIA H W, et al. Role of oncogenic KRAS in the prognosis, diagnosis and treatment of colorectal cancer[J]. Mol Cancer, 2021, 20(1): 143.
- [21] 陈劲松, 王 丹. 肿瘤新抗原在肿瘤免疫治疗中的应用研究进展[J]. 解放军医学杂志, 2024, 49(10): 1213-1220.
- [22] WONG S H M, FANG C M, CHUAH L H, et al. E-cadherin: Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2018, 121: 11-22.
- [23] CHANG K B, JIANG L, SUN Y F, et al. Effect of E-cadherin on prognosis of colorectal cancer: a meta-analysis update[J]. Mol Diagn Ther, 2022, 26(4): 397-409.
- [24] 左汪洋, 孙佳春, 王蓓蕾, 等. 环氧化酶-2、 $\beta$ -连环蛋白和E-钙黏蛋白在结直肠癌中的表达及临床意义[J]. 中国肛肠病杂志, 2022, 42(12): 1-5.