

· 综 述 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2023.14.026

DNA 基因甲基化检测在大肠癌诊断中的研究进展*

张德文¹, 张 丽²综述, 朱喜丹³审校

1. 自贡市第三人民医院检验科, 四川自贡 643020;
2. 内江卫生与健康职业学院基础医学部, 四川内江 641100;
3. 西南医科大学附属医院医学检验部, 四川泸州 646000

摘 要: DNA 基因甲基化检测是近年来用于大肠癌(CRC)诊断的新手段之一。目前, 与 CRC 发生和发展有关的高甲基化基因的研究较多。该文就 CRC 中常见的高甲基化基因, 如黏结蛋白聚糖 2 基因、胞裂蛋白 9 基因、分泌型卷曲相关蛋白 1 基因及甲基化基因与其他常见技术联合检测的相关进展进行综述, 旨在为后续探讨对 CRC 诊断有利的手段提供一定理论基础。

关键词: DNA 基因甲基化; 大肠癌; 诊断; 研究进展

中图法分类号: R735.3

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2023)14-2100-04

Research progress of DNA gene methylation detection in the diagnosis of colorectal cancer*ZHANG Dewen¹, ZHANG Li², ZHU Xidan³

1. Department of Clinical Laboratory, Zigong Third People's Hospital, Zigong, Sichuan 643020, China;
2. Department of Basic Medicine, Neijiang Hygiene and Health Vocational College, Neijiang, Sichuan 641100, China;
3. Department of Laboratory Medicine, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China

Abstract: DNA gene methylation detection is one of the new methods used in the diagnosis of colorectal cancer (CRC) in recent years. At present, there are many researches on hypermethylated genes related to the occurrence and development of CRC. This article reviews the progress of the common hypermethylated genes in CRC, such as syndecan 2 gene, cleaved protein 9 gene, secreted frizzled-related protein 1 gene and methylated genes combined with other common techniques, in order to provide a theoretical basis for the subsequent exploration of beneficial diagnostic methods for CRC.

Key words: DNA gene methylation; colorectal cancer; diagnosis; research progress

大肠癌(CRC)作为常见的恶性肿瘤, 包括结肠癌和直肠癌。据国家癌症中心 2022 年发布的数据显示, 肺癌、结肠癌、胃癌、肝癌和乳腺癌是排名前 5 的癌症, 占新发病例总数的 57.4%^[1]。有研究表明, CRC 患者在早期无明显临床症状, 85% 以上的患者一经发现就已是晚期。CRC 患者早期进行临床治疗, 约 90% 的患者不需要化疗, 5 年生存率可达 95%^[2], 由此提示开展有组织的早期筛查有助于降低 CRC 的病死率。现代肿瘤学研究认为, 肿瘤的发生与抑癌基因的丢失和失活有关, 发生表观遗传学的累积改变, 该改变可以在癌症早期通过高灵敏度技术检测到^[3]。DNA 甲基化是目前最早被发现、研究最深入的表观遗传调控机制之一^[4]。抑癌基因启动子区域胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤(CpG)岛的高甲基化, 是诸多癌症发生早期的重要事件之一。因此, DNA 甲基化相关标志物的检测有望成为 CRC 早期诊断的重要手段。本文就

近年来 DNA 甲基化在 CRC 早期诊断中的应用展开综述, 以期后续研究 CRC 的早期诊断提供相关理论依据。

1 表观遗传学、甲基化及其在 CRC 中的作用

广义的表观遗传学是指在不改变 DNA 序列的情况下, 通过 DNA 甲基化、组蛋白修饰和 miRNA 表达等方式发生可遗传的表型变化。表观遗传学控制的基因表达模式破坏会导致自身免疫性疾病、癌症和各种其他疾病。表观遗传的畸变在疾病早期就可以被检测出来^[5], 并且相比遗传变化的难以逆转, 表观遗传所导致的变化可以在药物干预下发生一定逆转。随着靶向基因表达调控中所涉及的特定表观遗传机制药物的发展, 表观遗传工具的开发和利用是一种可应用于各种疾病治疗的有效方法。因此, 表观遗传学可作为新兴工具用于癌症的诊断和治疗。

DNA 甲基化是生物体内普遍存在的表观遗传调

* 基金项目: 自贡市重点科技计划项目(2020ZC20)。

节方式^[6]。甲基化是 DNA 重要的修饰方式之一,是指在 DNA 甲基化转移酶的作用下,S-腺苷甲硫氨酸中的甲基基团共价结合到基因组 DNA 序列上 CpG 岛的二核苷酸胞嘧啶的 5' C 端,进而转变为 5-甲基胞嘧啶的过程^[7]。其中 CpG 岛是指基因组中一段含有大量 C 和 G 的重复序列区域。CRC 抑癌基因中的 CpG 岛甲基化通常位于基因组 C、G 含量大于 50% 的启动子区域^[8]。相对于结肠镜检查,CRC 中基因甲基化的检测具有无创伤性、无侵入性、无饮食限制等优点,并且与早期诊断、预后、复发情况均密切相关^[9]。

2 CRC 早期诊断的常用 DNA 甲基化基因

2.1 黏结蛋白聚糖 2(SDC2)基因

SDC2 基因属于 Syndecans 家族,该家族由进化保守的 4 个不同基因编码的 I 型跨膜蛋白聚糖构成,其中 SDC2 由糖胺聚糖链共价连接的蛋白质核心组成^[8]。有研究表明,SDC2 主要在间充质细胞,如成纤维细胞和平滑肌细胞中表达,具有调节组织发育与稳态的功能,包括细胞增殖、分化、黏附、细胞骨架组织、迁移、伤口愈合、细胞基质通信、血管生成,还与炎症反应和癌症的发生有关^[9-10]。众所周知,大多数癌症是由息肉引起的,息肉癌变过程需要 10~15 年,开始于异常的隐窝,演变为肿瘤前期病变(息肉),最终发展为结直肠癌^[3]。2017 年,OH 等^[11]通过单向线性靶标富集(LTE)和 SDC2 的定量甲基化特异性实时聚合酶链反应(qM-SP)检测不同分期(I~IV 期)CRC 患者($n=50$)和癌前病变患者($n=21$)及健康体检者($n=22$)粪便中 SDC2 甲基化的 DNA,其检测 CRC 的总体灵敏度为 90.0%,检测小息肉的总体灵敏度为 33.3%,特异度为 90.9%。HAN 等^[12]通过对 245 例 CRC 患者粪便 DNA 中 SDC2 基因进行 LTE 和 qMSP 检测,CRC (0~IV 期)的总体灵敏度为 90.2%,特异度为 90.2%;早期(0~II 期)的灵敏度为 89.1%(114/128);晚期和非晚期腺瘤的检出率分别为 66.7%(2/3)和 24.4%(10/41),表明 SDC2 甲基化具备作为 CRC 早期检测的潜力。

梁霞等^[13]通过比较 56 例原发性 CRC 患者与 50 例健康体检者的 SDC2 甲基化表达量、癌胚抗原(CEA)、糖类抗原 19-9(CA19-9)水平发现,SDC2 甲基化基因在 CRC 组织中呈高表达,并且 SDC2 甲基化基因诊断 CRC 的灵敏度和特异度均高于 CEA、CA19-9 及 CEA 联合 CA-199 的诊断结果。同时,MA 等^[14]以一种新的实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)检测试剂用于 102 例 CRC 患者中 SDC2 CpG 岛中含有 2 个差异甲基化区域的检测,结果显示,单独通过甲基化 SDC2-A 检测 CRC 的灵敏度为 85.3%,特异度为 96.2%;单独甲基化 SDC2-B 检测

的灵敏度为 83.3%,特异度为 97.7%。然而,当甲基化 SDC2-A 和甲基化 SDC2-B 合并时,检测 CRC 的灵敏度提高至 87.3%,特异度降低为 94.6%。这预示着对 SDC2 CpG 岛中多个差异甲基化区域进行同时检测将更有助于 CRC 的早期诊断,并且检测结果相比肿瘤标志物更准确。事实上,CRC 发生前期,肿瘤细胞脱落到结直肠腔的频率是正常大肠细胞的 4~5 倍,且早于血管侵袭^[15],因此,从理论上讲,粪便 SDC2 基因检测比血液更适合作为早期发现大肠肿瘤的标本,NIU 等^[7]的研究结果也证明了这一结论。

2.2 胞裂蛋白 9(SEPT9)基因

SEPT9 基因属于细胞骨架三磷酸鸟苷结合蛋白家族^[16]。目前,在哺乳动物中已鉴定出 13 个 SEPT 基因(SEPT1~SEPT12 和 SEPT14),可以分为 4 个亚组(SEPT2、SEPT3、SEPT6 和 SEPT7)。其中 SEPT9 是一种细胞周期相关蛋白,在细胞分裂过程中协调肌球蛋白和运动蛋白^[17]。当 SEPT9 基因在体内异常表达或出现缺失时,细胞分裂会受到严重影响,在一定程度上导致恶性肿瘤发生。AMIR 等^[18]提出,SEPT9 过表达可抑制缺氧诱导因子-1(HIF-1)的泛素化和降解,提高 HIF-1 的转录活性和下游基因,如血管内皮生长因子的表达。血管内皮生长因子过表达会促进肿瘤组织的血管生成,这为肿瘤的增殖和浸润奠定了基础。在 CRC 中,当 SEPT9 基因启动子区域 CpG 岛出现高度甲基化时,会阻断 SEPT9 基因的表达,导致其抗癌功能丧失。2008 年以来,已有许多研究团队发表了一系列通过检测 SEPT9 基因甲基化来监测 CRC 的临床数据。TÓTH 等^[19]使用 EpiproColon2.0 RT-PCR 定性检测 93 例结直肠癌患者和 94 例健康体检者的血标本,相对于粪便隐血试验、癌胚抗原(CEA)和 EpiproColon1.0 RT-PCR 的检测,EpiproColon2.0 RT-PCR 检测 CRC 的灵敏度为 79.3%,特异度为 98.9%,其中对 I 期 CRC 的灵敏度为 95.6%,特异度为 84.8%,对 II~IV 期 CRC 的灵敏度可达 100.0%,特异度为 98.9%。这表明 SEPT9 基因比粪便隐血试验和 CEA 更敏感和特异,也更适合于 CRC II~IV 期患者的评估。

2.3 分泌型卷曲相关蛋白 1(SFRP1)基因

SFRP1 基因属于 SFRPs 家族,是新近发现的对 Wnt 信号通路有抑制作用的候选抑癌基因^[20]。SFRP1 基因启动子区域的高度甲基化是基因失活的重要原因,Wnt 信号通路的异常激活会使 CRC 中细胞凋亡受到抑制,肿瘤细胞出现大量增殖^[21]。SFRP1 基因不仅在早期 CRC 中会出现高度甲基化,而且在大肠息肉患者中也会出现。银广悦等^[22]选取 32 例健康体检者(对照组)与 50 例 CRC 患者(CRC 组)、30 例大肠增生性息肉

患者(增生组)、36例大肠腺瘤患者(腺瘤组)作为研究对象,分析粪便中Wnt抑制因子-1(WIF-1)及SFRP1基因甲基化情况后发现,CRC组WIF-1及SFRP1基因甲基化率为60.0%及64.0%,增生组为20.0%及20.0%,腺瘤组为44.4%及52.8%。联合WIF-1及SFRP1检测对大肠腺瘤及CRC的灵敏度分别为66.7%及76.0%,且2个基因在腺瘤组及CRC组中的甲基化水平均高于对照组及增生组。

3 DNA甲基化基因与其他技术联合诊断CRC

目前,CRC的诊断方法较多,包括粪便隐血试验、结肠镜检查、血清肿瘤标志物筛查、粪便DNA检查、病理组织活检等。DNA甲基化作为近年来越来越受认可的CRC诊断方法,虽然其具备无创性、无侵入性、较高的灵敏度和特异度,但是标本质量容易受到患者饮食、药物等因素的影响,且标本处理,尤其是粪便标本的处理较为复杂,限制其用于大范围人群的筛查。因此,采用DNA甲基化检测与其他检测方法联合诊断CRC,可提高检测的诊断价值。

潘辉等^[23]经过对64例CRC患者粪便标本进行甲基化特异性PCR检测后,粪便基因SDC2和BMP3联合检测结肠癌的效能优于BMP3检测。谭琪等^[24]采用荧光PCR同步检测外周血血浆游离SEPT9、SDC2、支链氨基酸氨基转移酶1(BCAT1)3种基因中甲基化状态发现,血浆SEPT9、SDC2、BCAT1甲基化联合检测在CRC组中I~IV期的阳性率分别为72.7%(16/22)、87.2%(34/39)、85.7%(30/35)和96.0%(24/25),其在结肠癌I~III期阳性率明显高于CEA,差异均有统计学意义($P < 0.05$),在此研究中可以发现,联合分子标记物检测可在一定程度上提高灵敏度,但临床早期CRC的诊断还需要结合其他检测方法和临床症状进行综合判断。

李建等^[25]通过收集47例CRC患者和33例非结肠癌体检者的外周血对其进行SFRP1、SEPT9基因甲基化和粪便隐血试验结合检测,结果显示,SFRP1和SEPT9基因甲基化诊断结肠癌的灵敏度为80.0%,特异度为95.3%,粪便隐血试验的灵敏度为86.3%,特异度为54.3%,二者联合检测的灵敏度为97.6%,特异度为96.8%,明显高于单项检测。李建等^[25]研究表明,DNA甲基化与粪便隐血试验联合检测具有无创、采样简单、依从性好、实验方法稳定等特点,更适合于临床。吴秀方等^[26]评估对照组、腺瘤组、早期癌组、进展期癌组患者血浆中SEPT9基因甲基化、血清CEA单项及二者联合检测后发现,早期癌组患者血浆SEPT9甲基化和血清CEA检测的阳性率分别为33.3%和16.7%,二者联合检测的阳性率可提高至41.7%;进展期癌组患者血浆SEPT9甲基

化和血清CEA检测的阳性率分别为88.9%和55.6%,二者联合检测的阳性率可达到100.0%,表明血浆SEPT9甲基化单项检测用于鉴别腺瘤和早期癌症价值有限,在早期和进展期CRC患者中,血浆SEPT9甲基化检测阳性率均高于血清CEA,二者联合检测的诊断价值更高。高海锋等^[27]在血浆SEPT9甲基化、血清CEA的基础上,联合糖类抗原(CA)724诊断CRC发现,血清CEA检测诊断CRC的灵敏度不及血浆SEPT9基因甲基化,但特异度和阴性预测值均最高,可以弥补SEPT9基因甲基化和CA724诊断过程中误诊率高的不足;CA724检测虽然灵敏度较低,但特异度较SEPT9基因甲基化高,亦可弥补SEPT9基因甲基化误诊率高的不足。SEPT9甲基化、血清CEA、CA724联合检测,很好地实现了优势互补,快速、准确、灵敏度高、患者依从性好及适于普查等优点,极大地提高了CRC的诊断效率。

梁霞等^[13]经过比较SDC2和SEPT9基因甲基化检测的阳性率及二者联合结肠镜检查对进展性CRC的检出率,在1000例筛查对象中,粪便SDC2基因甲基化检测阳性率明显高于血浆SEPT9基因甲基化,粪便SDC2基因甲基化检测联合结肠镜检查的检出率均明显高于血浆SEPT9基因甲基化检测联合结肠镜检查的筛查率,表明粪便SDC2甲基化检测联合结肠镜检查可作为CRC早期筛查的策略之一。龚志贇等^[28]选取结肠癌患者51例、结肠腺瘤患者22例、健康体检者39例的粪便和血清标本,分析结果后发现,血清CEA联合粪便SDC2基因甲基化检测可将SDC2基因甲基化单项检测CRC阳性率从84.3%提高至90.2%,有效提升了CRC的检出率。

4 小 结

CRC是目前中国男性发病率排名第3的癌症^[1],以早期无明显的临床病理症状,一经发现就已经是中晚期为主要特点,对其进行有效早期诊断、预后、复发的检测十分必要。目前,虽然检测方法较多,但各有优缺点。粪便隐血试验诊断CRC的特异度较低,且检测结果易受到食物、药物等因素的影响而不稳定;结肠镜是侵入性检查,患者依从性较差,且易引起肠穿孔、感染等并发症,不易被患者接受;血清肿瘤标志物检测虽然是常规筛查手段,但其灵敏度和特异度较低,对于早期病变诊断价值不大;DNA甲基化无创伤、无侵入,灵敏度和特异度较高,但标本质量容易受到患者饮食、药物等因素的影响。SDC2甲基化在早期结肠癌患者的血液和粪便标本中检出率高,并且粪便标本SDC2甲基化具备更易检出,可作为CRC早期检测指标。但SDC2甲基化单位点检测的特异度、灵敏度不如多位点,即联合检测诊断能更快、更准确

地监测 CRC 的发生和发展。本研究认为,采用 DNA 甲基化多位点与其他方法联合检测对 CRC 进行诊断,可提高早期诊断价值。

参考文献

- [1] ZHENG R, ZHANG S, ZENG H, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2016[J]. J National Cancer Center, 2022, 2(1): 1-9.
- [2] 王倩倩, 周汝杨, 张小琴. 早期大肠癌内镜治疗 5 年生存情况及中药干预作用研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2019, 26(2): 35-37.
- [3] DEKKER E, TANIS P J, VLEUGELS J L, et al. Colorectal cancer [J]. Lancet, 2019, 394(10207): 1467-1480.
- [4] LONG H N, GOEL A, CHUNG D C. Pathways of colorectal carcinogenesis[J]. Gastroenterology, 2019, 158(2): 291-302.
- [5] JONES P A, BAYLIN S B. The fundamental role of epigenetic events in cancer[J]. Nat Rev Genet, 2002, 3(6): 415-428.
- [6] DAWSON M A, KOUZARIDES T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy [J]. Cell, 2012, 150(1): 12-27.
- [7] NIU F, WEN J, FU X, et al. Stool DNA test of methylated syndecan-2 for the early detection of colorectal neoplasia[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2017, 26(9): 1411-1419.
- [8] 刘晓龙. 粪便 Syndecan-2 基因甲基化与结直肠癌的相关性研究[D]. 桂林: 桂林医学院, 2019.
- [9] 张姗. Septin 9 甲基化在结直肠癌诊断及复发监测中的应用研究[D]. 泰安: 泰山医学院, 2018.
- [10] AFRATIS N A, NIKITOVIC D, MULTHAAPT H A, et al. Syndecans-key regulators of cell signaling and biological functions[J]. FEBS J, 2017, 284(1): 27-41.
- [11] OH T J, OH H I, SEO Y Y, et al. Feasibility of quantifying SDC2 methylation in stool DNA for early detection of colorectal cancer[J]. Clin Epigenetics, 2017, 9: 126.
- [12] HAN Y D, OH T J, CHUNG T H, et al. Early detection of colorectal cancer based on presence of methylated syndecan-2 (SDC2) in stool DNA [J]. Clin Epigenetics, 2019, 11(1): 51.
- [13] 梁霞, 李锦, 伍文. SDC2 甲基化基因在结直肠癌组织中表达的临床意义分析[J]. 临床合理用药杂志, 2021, 14(14): 148-149.
- [14] MA L, QIN G, GAI F, et al. A novel method for early detection of colorectal cancer based on detection of methylation of two fragments of syndecan-2 (SDC2) in stool DNA[J]. BMC Gastroenterol, 2022, 22(1): 191.
- [15] AHLQUIST D A, TAYLOR W R, MAHONEY D W, et al. The stool DNA test is more accurate than the plasma septin 9 test in detecting colorectal neoplasia [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2012, 10(3): 272-277.
- [16] MOSTOWY S, COSSART P. Septins: the fourth component of the cytoskeleton[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012, 13(3): 183-194.
- [17] EL AMINE N, KECHAD A, JANANJI S, et al. Opposing actions of septins and sticky on anillin promote the transition from contractile to midbody ring [J]. J Cell Biol, 2013, 203(3): 487-504.
- [18] AMIR S, WANG R, MATZKIN H, et al. MSF-A interacts with hypoxia-inducible factor-1alpha and augments hypoxia-inducible factor transcriptional activation to affect tumorigenicity and angiogenesis [J]. Cancer Res, 2006, 66(2): 856-866.
- [19] TÓTH K, SIPOS F, KALMÁR A, et al. Detection of methylated SEPT9 in plasma is a reliable screening method for both left- and right-sided colon cancers [J]. PLoS One, 2012, 7(9): e46000.
- [20] FUKUI T, KONDO M, ITO G, et al. Transcriptional silencing of secreted frizzled related protein 1 (SFRP 1) by promoter hypermethylation in non-small-cell lung cancer [J]. Oncogene, 2005, 24(41): 6323-6327.
- [21] MALCOMSON F C, WILLIS N D, MATHERS J C. Is resistant starch protective against colorectal cancer via modulation of the WNT signalling pathway? [J]. Proc Nutr Soc, 2015, 74(3): 282-291.
- [22] 银广悦, 刘创建, 周志伟, 等. SFRP1 及 WiF-1 基因启动子甲基化检测在结直肠癌早期筛查中的价值[J]. 山东医药, 2016, 60(41): 54-56.
- [23] 潘辉, 黄琰璿, 王国新, 等. 粪便基因 SDC2 和 BMP3 甲基化联合检测在结直肠癌筛查中的价值[J]. 中国医药导报, 2020, 17(11): 15-19.
- [24] 谭琪, 宗明, 虞珊珊, 等. 联合检测外周血游离 Septin9、SDC2、BCAT1 基因甲基化在结直肠癌诊断中的意义[J]. 中华检验医学杂志, 2021, 44(3): 204-211.
- [25] 李建, 樊华, 贺晓斌, 等. 血浆 SFRP1 和 Septin9 基因甲基化检测对结直肠癌诊断的临床价值[J]. 中南医学科学杂志, 2019, 47(5): 517-519.
- [26] 吴秀方, 南京, 张晓红, 等. 血浆 SEPT9 甲基化检测对结直肠癌诊断价值的临床研究[J]. 中国全科医学, 2021, 24(15): 1915-1919.
- [27] 高海锋, 薛挺, 穆建强. 血浆 SEPT9 基因甲基化联合血清癌胚抗原、糖类抗原 724 对结直肠癌的诊断价值[J]. 肿瘤研究与临床, 2022, 34(5): 370-374.
- [28] 龚志贇, 江铭磊, 施卫忠, 等. 粪便 SDC2 基因甲基化检测在结直肠癌辅助诊断中的价值[J]. 检验医学, 2022, 37(4): 325-329.